

Seyedeh Maryam Kazemi

Dr. sc. hum.

Gene expression of human LS174T colorectal cancer cells implanted into the large bowel and liver of nude rats.

Fach: Pharmakologie und Toxikologie

Doktorvater: PD Dr. Hassan Adwan

Diese Studie hatte zum Ziel, die Genexpressionsmuster von LS174T-Darmkrebszellen zu analysieren, während sie sich im Lebergewebe von Nacktratten über definierte Zeitintervalle hinweg vermehren. Die LS174T-Zellen wurden zunächst in die Mesenterialvene der Ratten injiziert, um ihr anschließendes Wachstum in der Leber zu ermöglichen. Um den experimentellen Prozess zu optimieren und eine präzise Tumorerkennung zu bestimmten Zeitpunkten (Tagen 3, 6, 9, 14 und 21) sicherzustellen, wurden die LS174T-Zellen mit einem Luciferase-Marker-Gen für die Biolumineszenzbildgebung transfiziert. Zur effizienten Reisolierung der Tumorzellen wurde eine Perfusion der Rattenleber durchgeführt, gefolgt von der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS) und der anschließenden Kultivierung für weitere Analysen. Die aus den reisolierten LS174T-Zellen extrahierte Gesamt-RNA wurde einer Chip-Array-Analyse unterzogen, wobei die reisolierten Zellen mit denen verglichen wurden, die ursprünglich vor der Implantation kultiviert wurden. Zusätzlich wurden miRNA-Profile aus den reisolierten Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten bestimmt. Die Datenanalyse erfolgte mit zwei Ansätzen: der Analyse unter Verwendung der Programmiersprache R und der Ingenuity Pathways Analysis (IPA). Die R-Analyse konzentrierte sich auf die Identifizierung von Genkategorien, die mit dem metastatischen Fortschreiten und wichtigen miRNAs im Zusammenhang mit dem Tumorfortschritt verbunden sind. IPA wurde verwendet, um Schlüssel-Signalwege und funktionelle Annotationen zu

identifizieren, die mit dem Fortschreiten der LS174T-Zellen in der Leber zusammenhängen, wobei Chip-Array-Datensätze einer Ratten-Darmkrebszelllinie (CC531) und Ratten-/menschlichen Pankreas-Krebszellen (ASML und Suit2-007) verglichen wurden. Die Analyse mit dem R-Programm zeigte Expressionsmuster von 21.448 Genen zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums von LS174T-Zellen in der Leber auf. Genkategorien, die mit dem Tumorfortschritt verbunden sind, wurden identifiziert, darunter solche, die im Laufe der Zeit abnahmen, während der frühen Stadien hochreguliert waren (Early up), im Laufe der Zeit zunahmen oder eine späte Aufregulierung (Late up) zeigten. Ausgewählte Gene, die im Laufe der Zeit zunahmen, wurden mittels qPCR und Western Blot bestätigt, darunter MGST1, FTL und RAB15. Darüber hinaus wurden verschiedene Kategorien von miRNA identifiziert, von denen einige ähnliche Expressionsmuster wie die genannten Gene aufwiesen, wie z.B. miR-200b-3p und miR-141-3p. Eine weitere Kategorie von miRNA, die als 'früh herunterreguliert' eingestuft wurde, umfasste unter Anderem miR-141-3p, miR-200c-3p und miR-17-5p. Interessanterweise zeigte miRNA-1260a, die während der späten Stadien (Tage 14 & 21) herunterreguliert war, eine negative Korrelation mit MGST1, FTL und RAB15, die alle im Laufe der Zeit zunahmen. Die IPA-Analyse identifizierte 20 Signalwege und funktionelle Annotationen auf der Grundlage signifikanter Z-Werte, darunter der S100-Familienweg, der Tumor-Mikroumwegungsweg und der Darmkrebsweg. Zusätzlich wurden gemeinsame Funktionen identifiziert, die für Metastasen relevant sind, wie Zellüberleben, Migration, Proliferation und Angiogenese. Insgesamt liefert diese Studie wertvolle Erkenntnisse für zukünftige Forschungen, insbesondere zur Identifizierung von Zielgenen für die Therapie von Darmkrebs.