

Einfluss der Expression der long-non-coding-RNA NEAT1 auf die Sensitivität von MCF-7 und MCF-TAM Brustkrebszellen gegenüber Tamoxifen

Hans Klose¹, Ghufan Al-shboul², Thomas Kalinski^{1,2}, Norbert Naß^{1,2}

¹Medizinische Hochschule Brandenburg
²Institut für Pathologie, UK-Brandenburg

Hintergrund

Mit jährlich 2,3 Millionen Neudiagnosen weltweit ist Brustkrebs die häufigste Krebserkrankung bei Frauen und stellt eine erhebliche medizinische und gesellschaftliche Herausforderung dar.

Die leitliniengerechte, zum Teil sehr komplexe, Individualtherapie sämtlicher Brustkrebsformen richtet sich hierbei nach Faktoren wie der Tumorhistologie, Tumorstadium, Biomarkern und genetischer Abnormalitäten.

Neben Klassifikationssystemen wie dem TNM-System und der histopathologischen Differenzierung maligner Neoplasien ist eine Bestimmung und anschließende Analyse des Expressionsmusters verschiedener tumorassoziierter Gene innerhalb der Brustkrebsdiagnostik essenziell. Zur praktischen Anwendung wird eine approximative Zuordnung mittels immunhistochemischer Marker für Östrogen- und Progesteronrezeptoren (HR), HER2 und Proliferationsfraktion (Ki67) empfohlen.

Subtyp	Expression von:			Häufigkeit	Prognose
	HR	HER2	Ki67		
Luminal A	positiv	negativ	niedrig	40%	gut
Luminal B (HER2 negativ)	positiv	negativ	hoch	10%	mäßig
Luminal B (HER2 positiv)	positiv	positiv	beliebig	10%	mäßig
HER2-"enriched"	negativ	positiv	beliebig	10-15%	mäßig
Triple-negativ/ Basaltyp	negativ	negativ	beliebig	15-20%	schlecht

Tabelle 1: Klassifikation, Häufigkeit und Prognose verschiedener Brustkrebssubtypen nach Expression von Hormonrezeptoren (HR), HER2 und Proliferationsfraktion Ki67⁽¹⁾

Für hormonrezeptorpositive Mammakarzinome stellt die adjuvante Behandlung mit Tamoxifen eine essenzielle Therapieoption dar, deren Erfolg maßgeblich zu einer positiven Prognose beiträgt. Tamoxifen zählt zur Gruppe der „selektiven Östrogenrezeptormodulatoren“ (SERM) und wirkt durch selektive Bindung und der daraus resultierender kompetitiver Blockade, von Östrogenrezeptoren auf den Tumorzellen. Eine solche Blockade soll östrogenabhängige Wachstumsprozesse und Genexpression inhibieren, Tumorzellapoptose induzieren und einer Metastasierung vorbeugen.

Trotz seiner Bedeutung als first-line Medikation zeigen 20-30% der Luminal A und B Tumoren eine bereits vor der Therapie bestehende (de-novo), oder sich im Verlauf entwickelnde Resistenz gegen Tamoxifen.

Die Gründe hierfür sind bisher noch unbekannt. Ein vielversprechender Anwärter auf die Rolle eines potenziell negativ prädiktiven Biomarkers nimmt die Expression der long-non-coding RNA NEAT1 ein, welche in tamoxifenresistenten MCF-TAM Zellen um ein vielfaches überexprimiert wird.

NEAT1

NEAT1 (nuclear paraspeckle assembly transcript 1) ist eine in zwei Isoformen vorkommende long-non-coding-RNA (lncRNA), die, anders als mRNA, nicht translatiert wird, sondern direkt mit ihren Zielstrukturen interagiert.

In seiner Rolle als „competing endogenous RNA“ (ceRNA) ist NEAT1 dazu in der Lage microRNAs reversibel in Form molekularer „Sponges“ zu binden. Diese verlieren so die Fähigkeit ihre Zieltranskripte zu hemmen oder deren Translation zu unterdrücken. Dies führt zu einer verstärkten Aktivität des, zuvor durch die miRNA inhibierten, Zielproteins.⁽³⁾

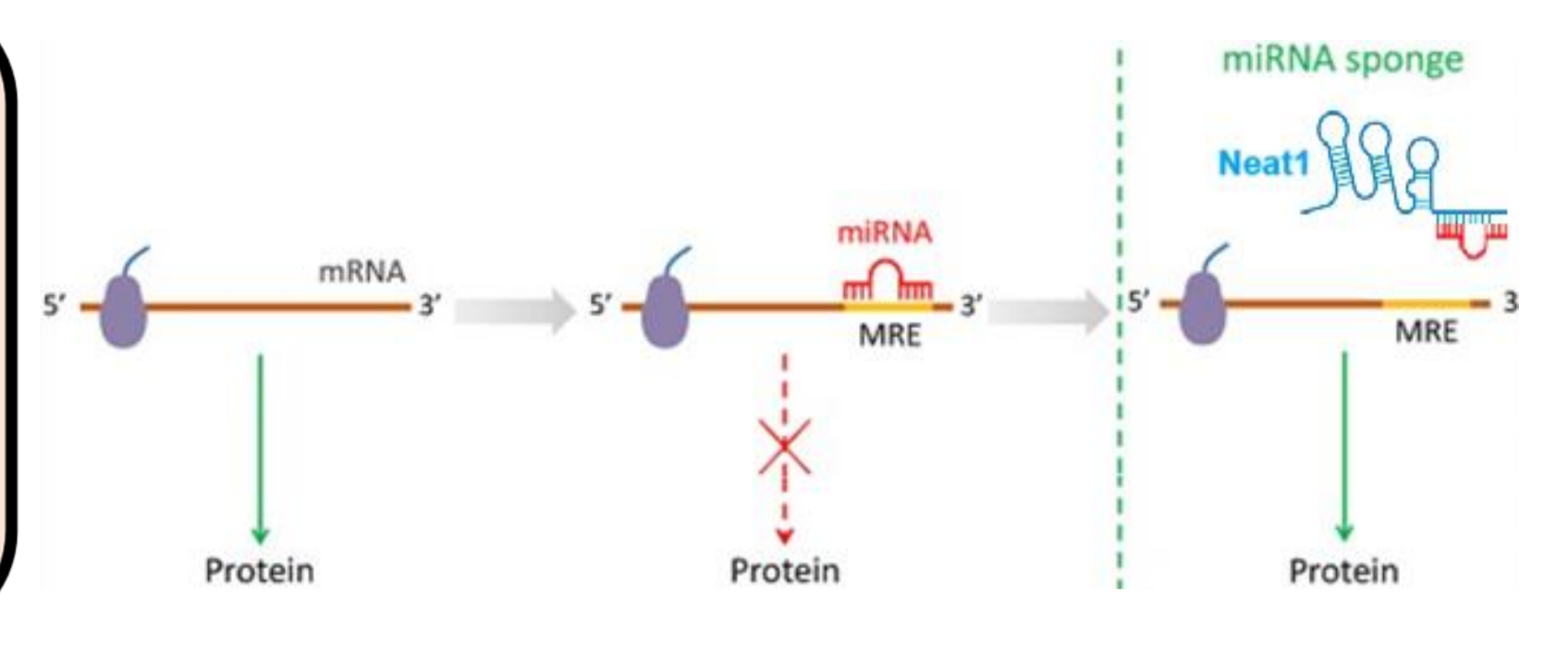
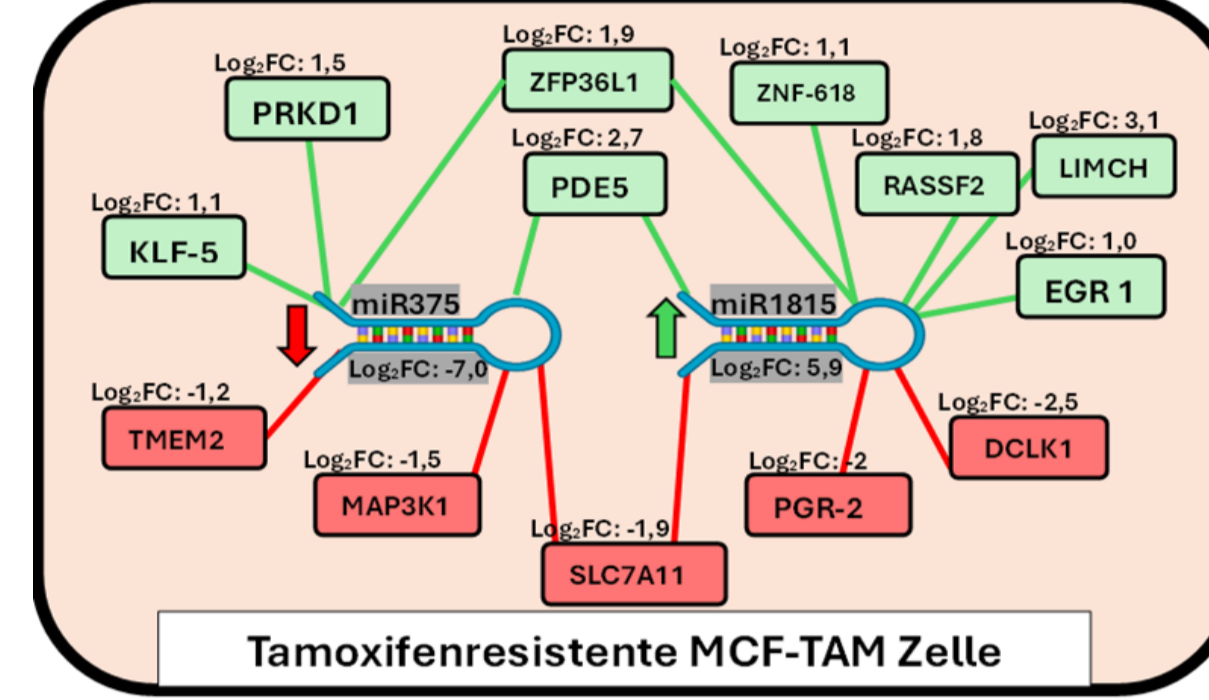


Abbildung 1: miRNA abhängige Genexpression⁽²⁾

Abbildung 2: Neat1 in seiner Funktion als miRNA-sponge⁽²⁾

Methoden

Teil 1: In vitro NEAT1-Expressionsmanipulation, von tamoxifensensitiven MCF-7 und tamoxifenresistenten MCF-TAM Zellen, durch transiente Lipotransfektion mit Überexpressionsplasmiden (P26, P14), Antisenseplasmiden und siRNA. Zielvorstellung war die Kreation von Zelllinien mit einer NEAT1-Hochregulation (P14, P26) oder NEAT1-Runterregulation (Antisense, siRNA)

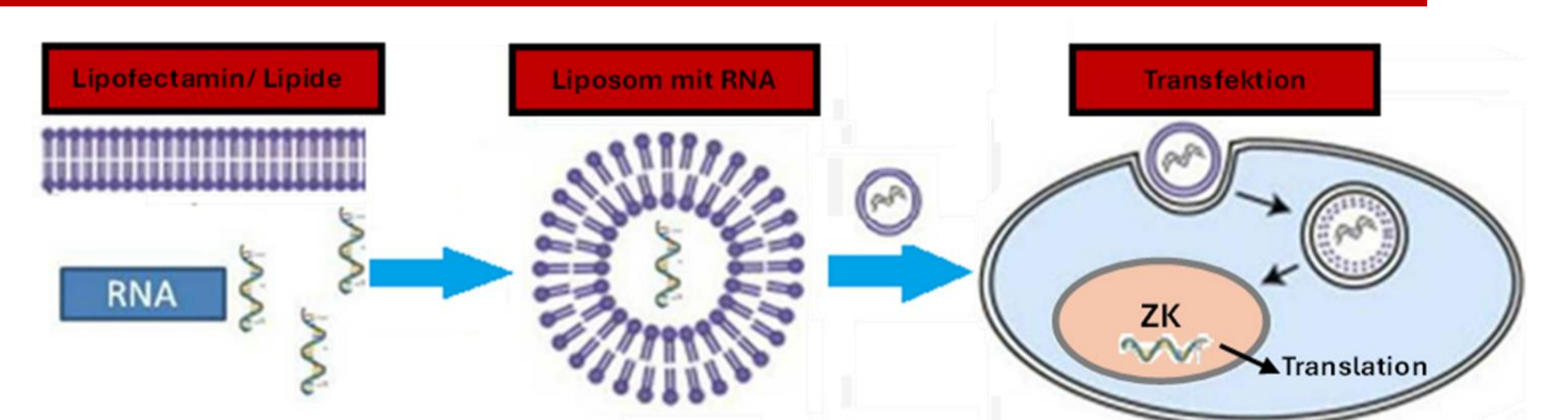


Abbildung 3: Einbringen von DNA/RNA in Zielzellen

Teil 2: Überprüfung der relativen NEAT1 Expression in transfizierten Zellen durch RNA-Extraktion, reverse Transkription und anschließenden Q-PCR.

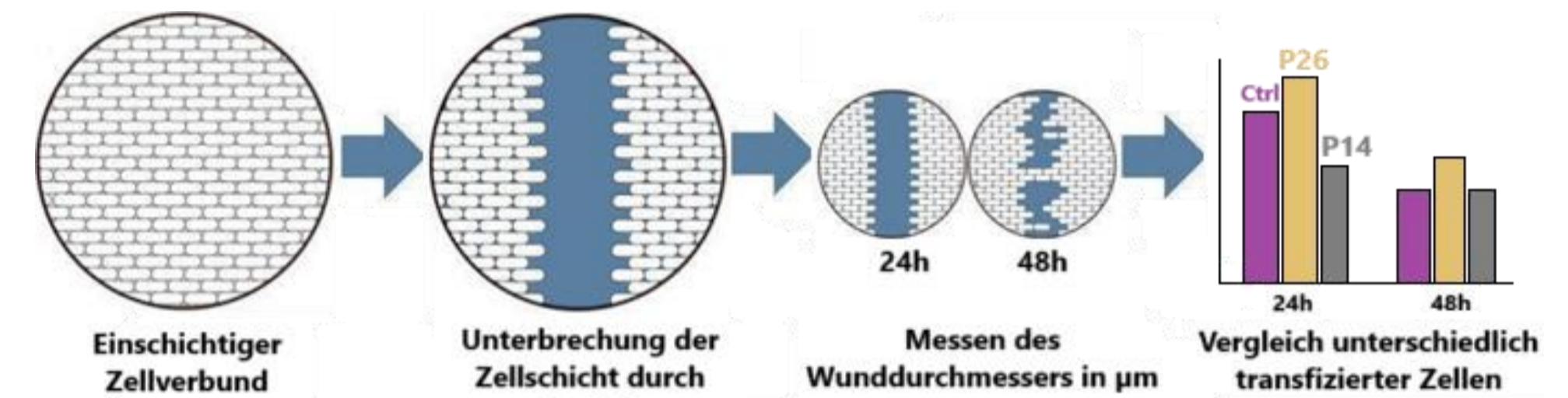


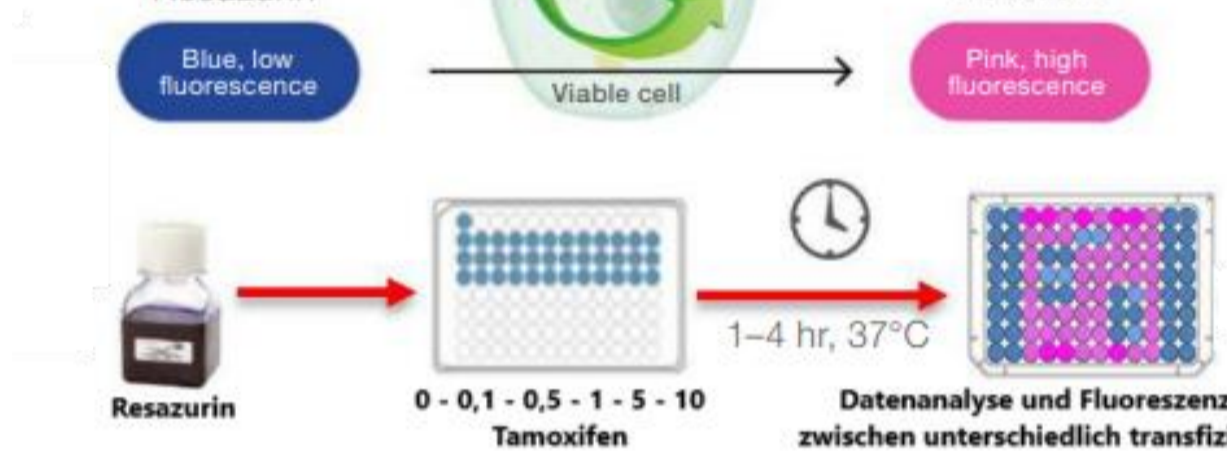
Abbildung 4 (oben): Konzept eines Scratchassays

Teil 3: Vergleichende Untersuchung der Zelllinien im Hinblick auf Wachstums-/Proliferationsrate und Viabilität mittels Scratch-Assay und Viabilitäts-assay. Darstellung der Zellaktivität transfizierter Zellen im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen, in welchen die NEAT1-Expression nicht verändert wurde.



Abbildung 5 (links): Ablauf und Funktion eines resazurinbasierten Zell-Viabilitäts-Assays⁽⁴⁾

Teil 4: Toxizitätstests an erfolgreich transfizierten Zelllinien mit unterschiedlichen Tamoxifenkonzentrationen und anschließender Viabilitätskontrolle via Fluoreszenzassay. Veränderungen im Ansprechen auf Tamoxifen können durch relative Unterschiede innerhalb des Redoxstatus der Zellen quantifiziert werden.



Ergebnisse

NEAT1 Runterregulation in MCF-TAM

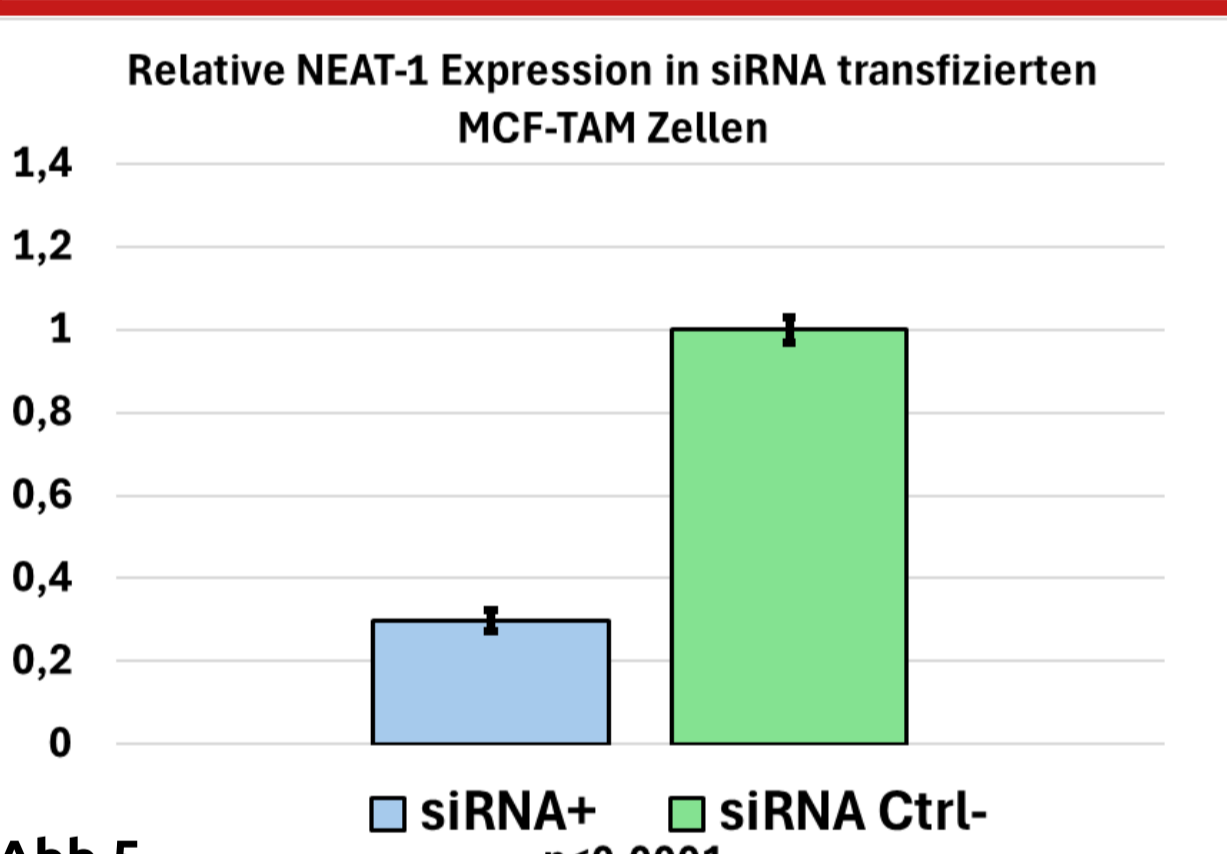


Abb.5

NEAT1 Runterregulation in MCF-7

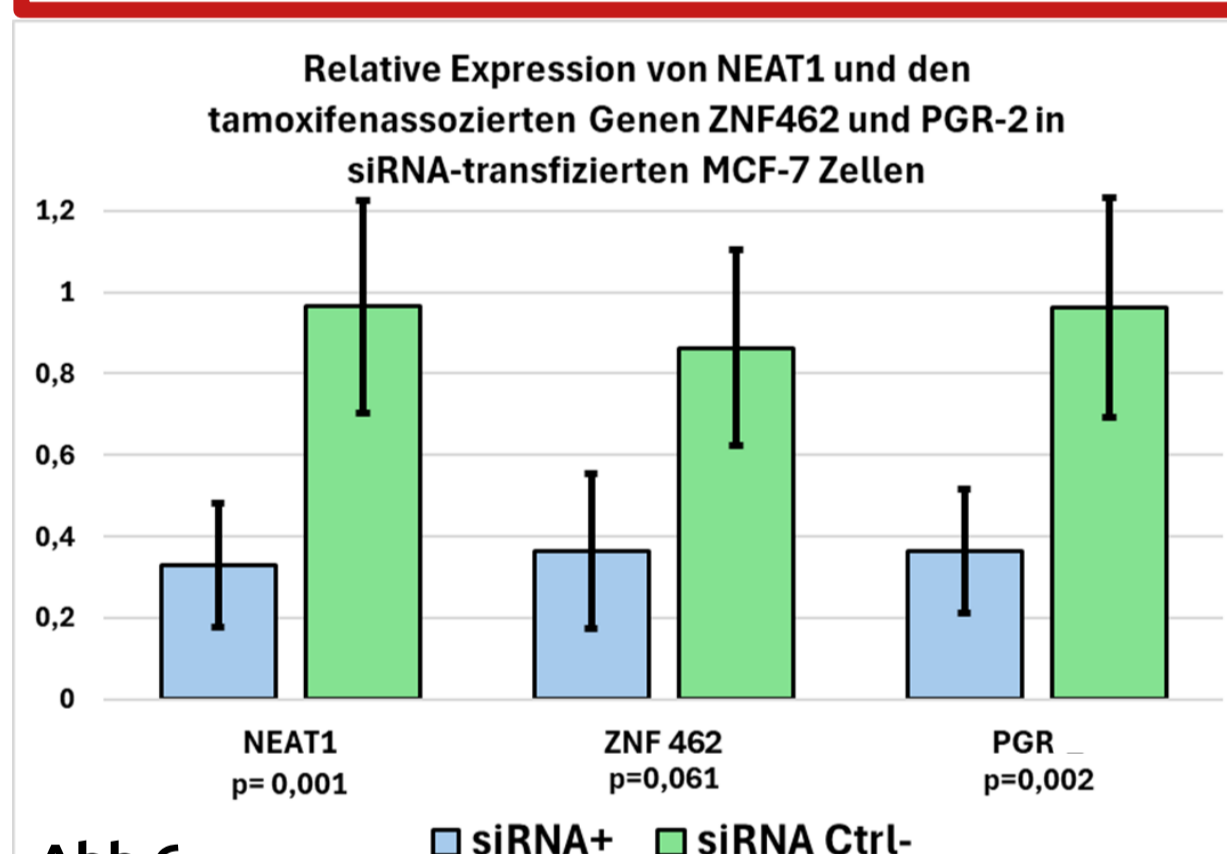


Abb.6

NEAT1 Hochregulation in MCF-7

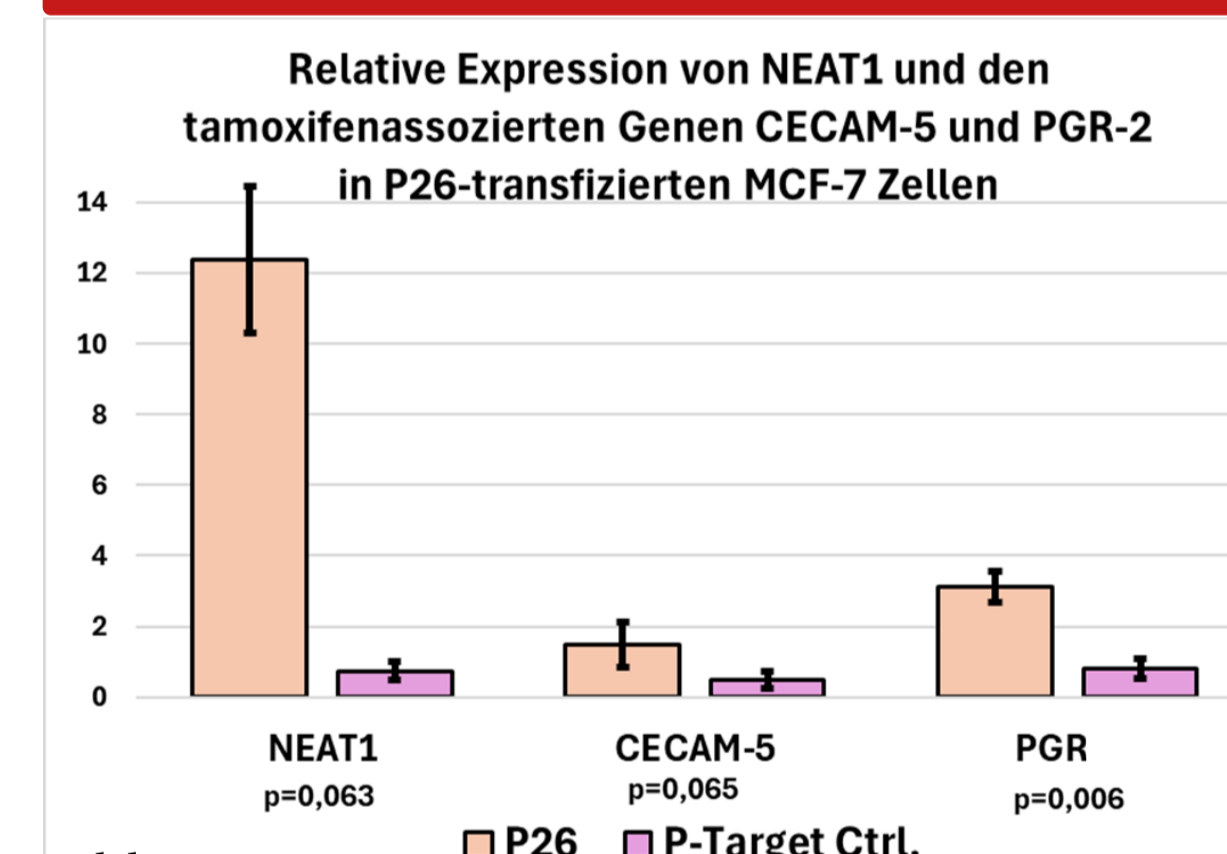


Abb.7

Growth-Assay hochregulierter MCF-7

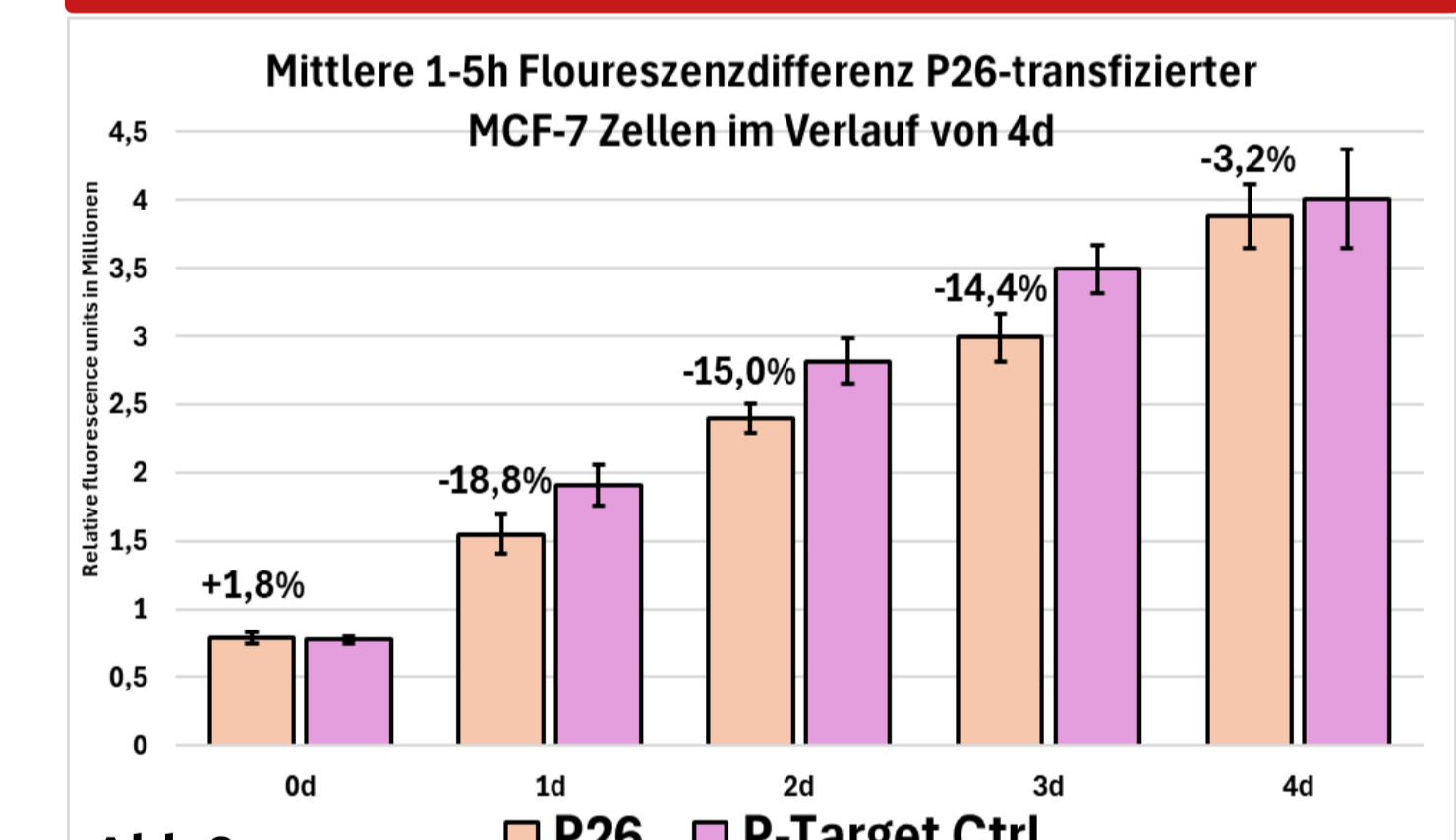


Abb.8

Tamoxifensensitivität runterregulierter MCF-TAM

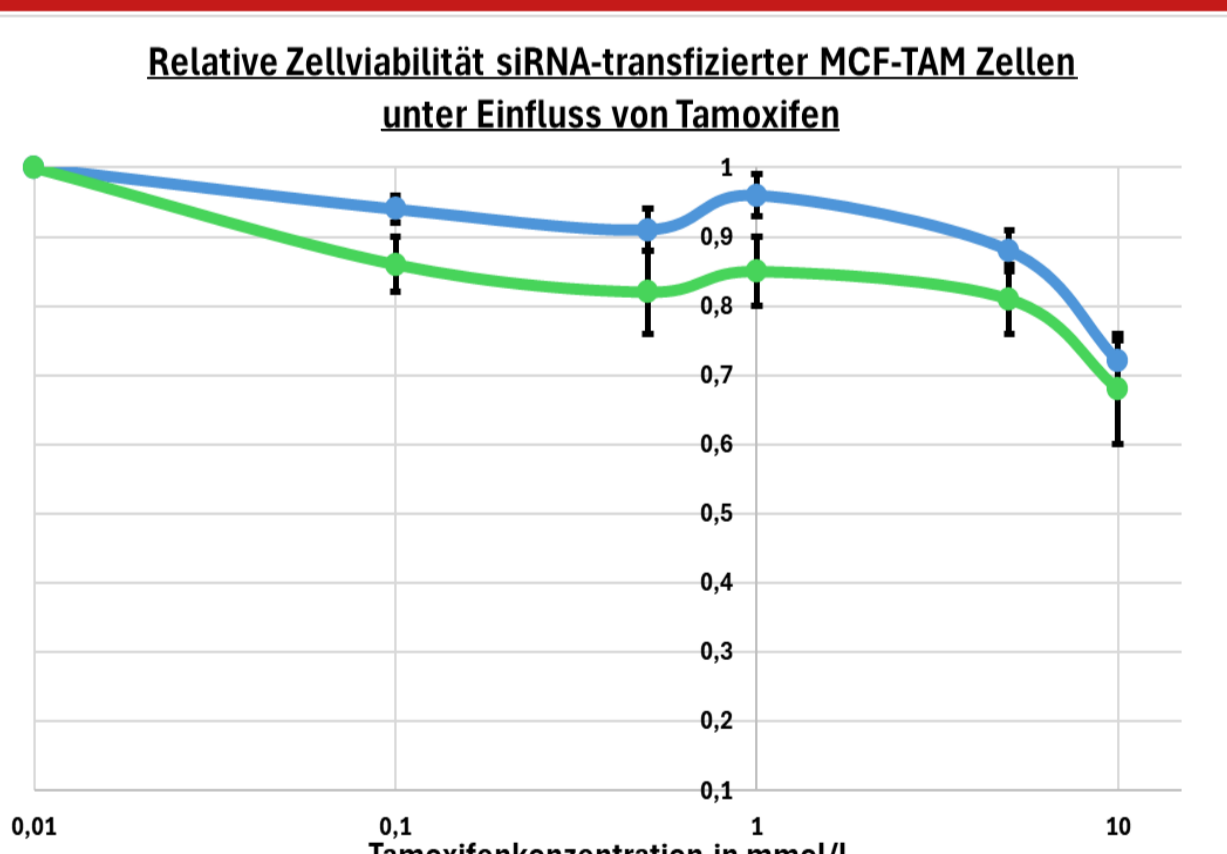


Abb.9

Tamoxifensensitivität runterregulierter MCF-7

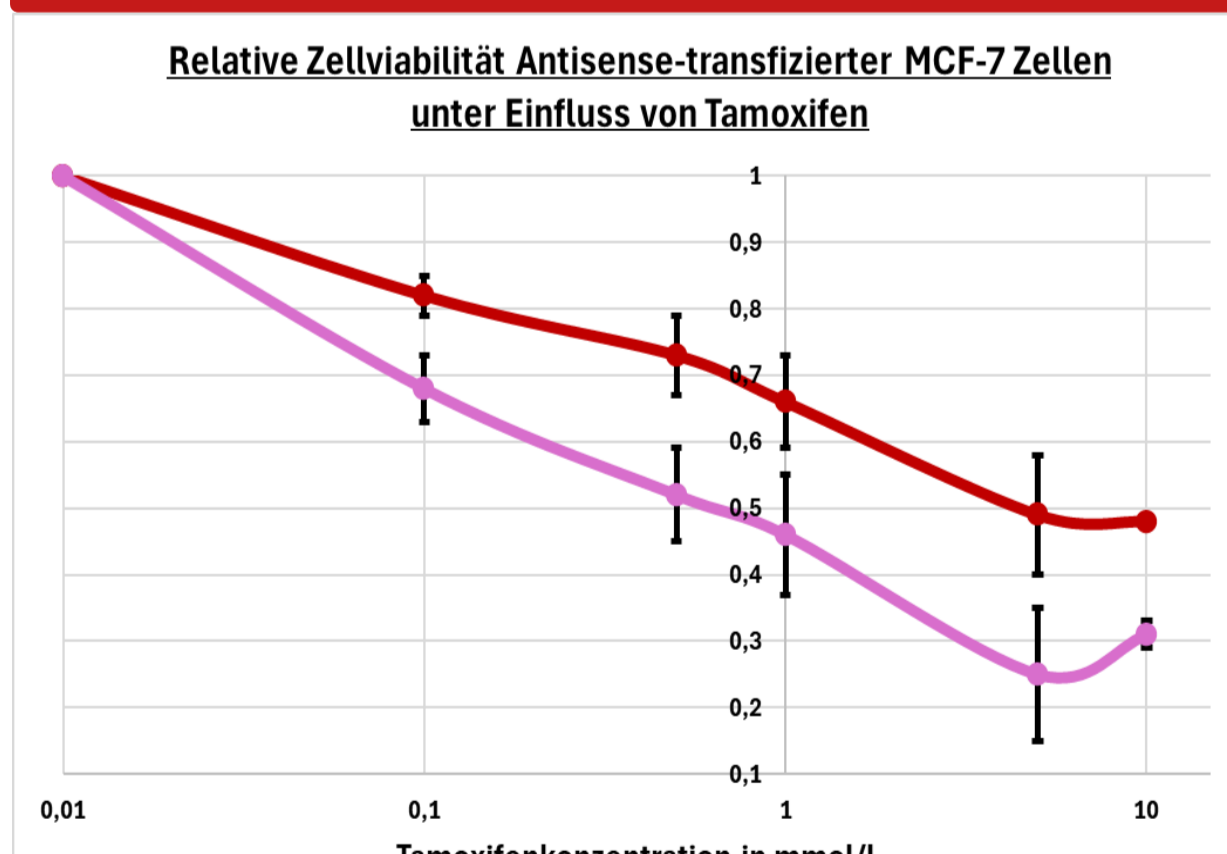


Abb.10

Tamoxifensensitivität hochregulierter MCF-7

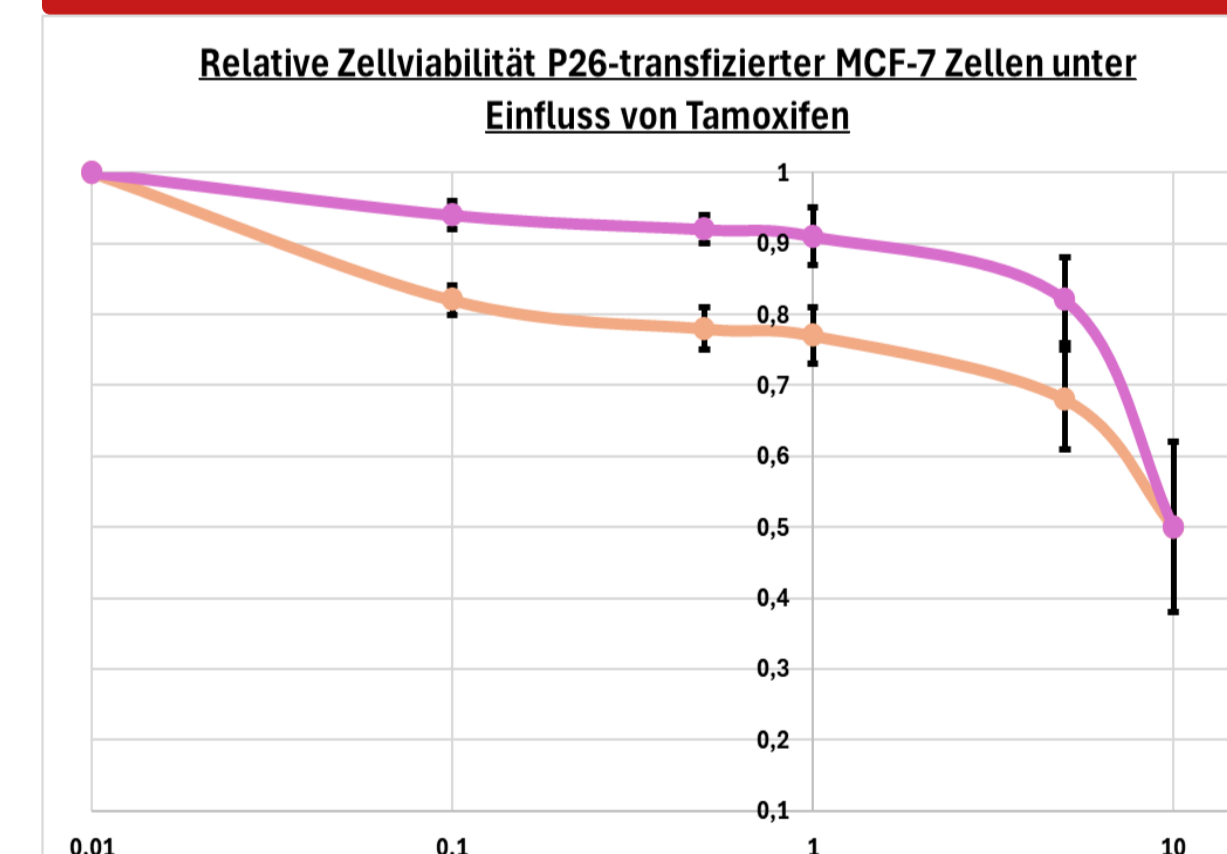


Abb.11

Scratch-Assay hochregulierter MCF-7

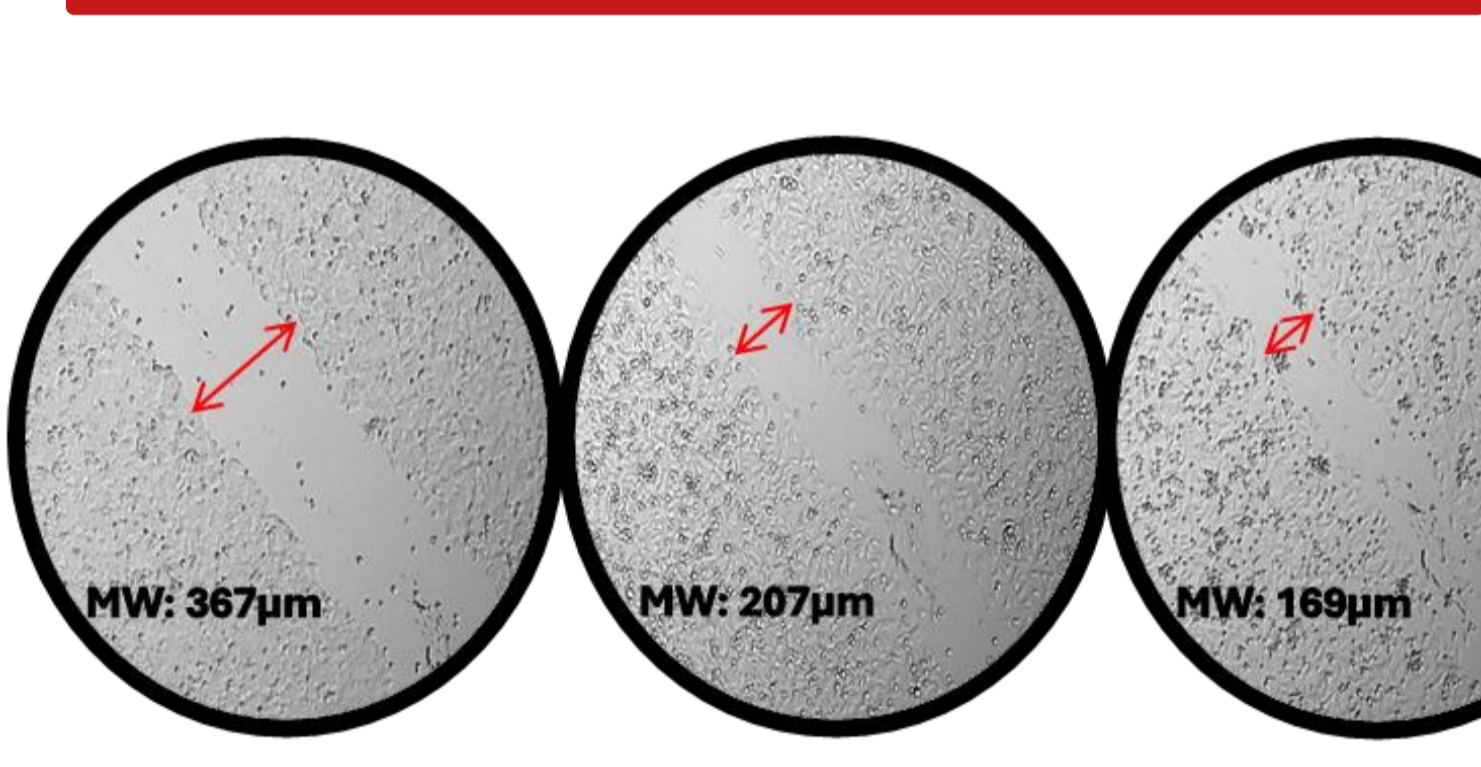


Abb.12

Prozentuale Zellviabilität siRNA-transfizierter MCF-TAM Zellen im Bezug zur korrespondierenden 0-Probe

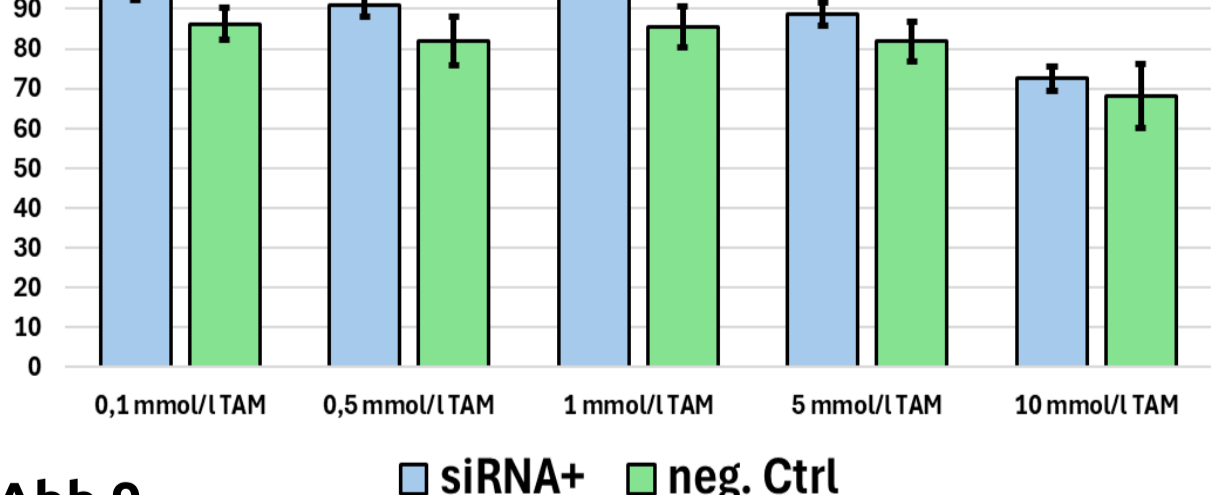


Abb.9

Prozentuale Zellviabilität Antisense-transfizierter MCF-7 Zellen im Bezug zur korrespondierenden 0-Probe

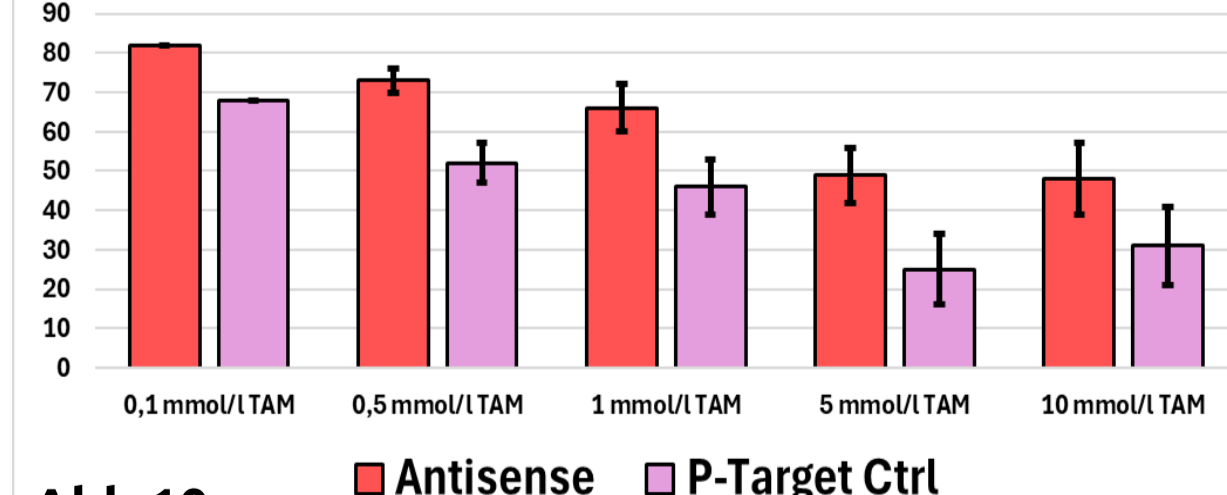


Abb.10

Prozentuale Zellviabilität P26-transfizierter MCF-7 Zellen im Bezug zur korrespondierenden 0-Probe

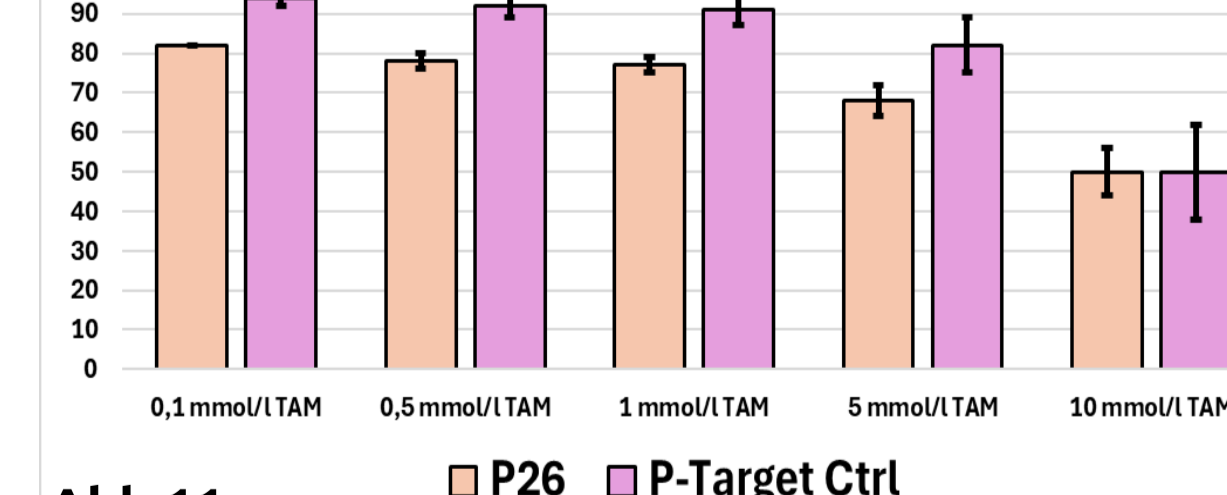


Abb.11

Scratch-Assay P26-transfizierter MCF-7 Zellen im Vergleich zur PT-Kontrollgruppe

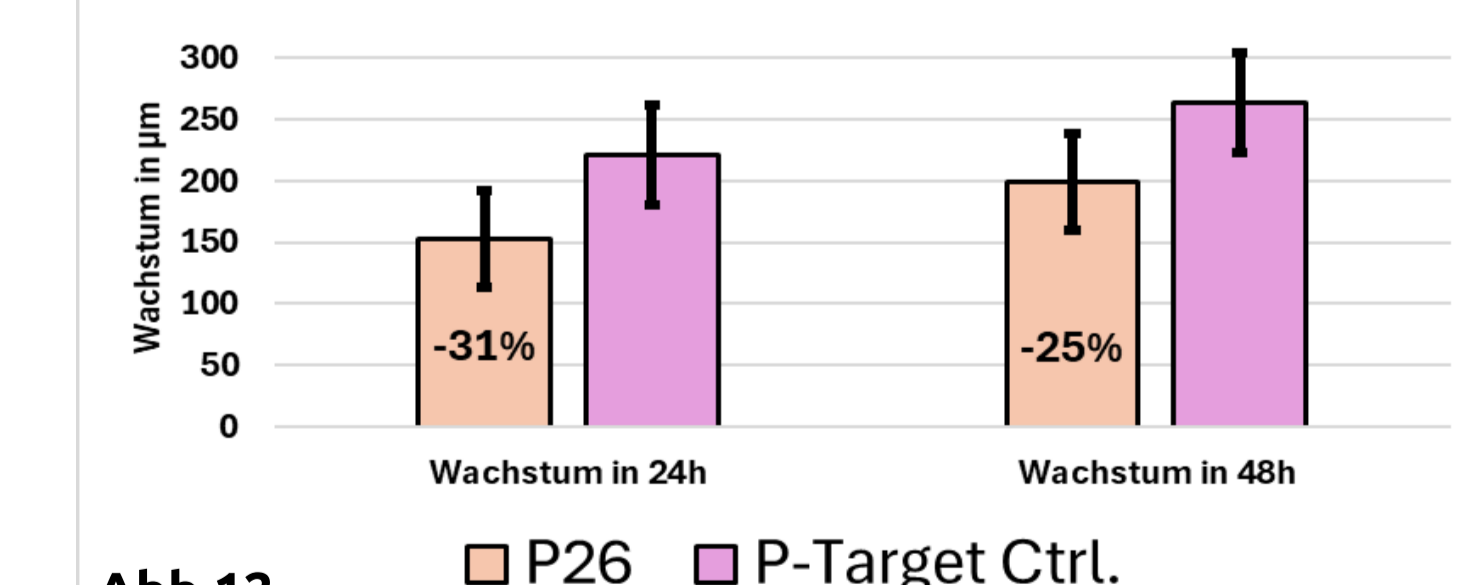


Abb.12

Auswertung

Die durchgeführten Q-PCRs zeigen an, dass die transiente Transfektion von MCF-7 und MCF-TAM Zellen mit Überexpressionsplasmiden und siRNA den Zielvorgaben entsprechend erfolgreich war. So wurde im Bezug zur Kontrollgruppe eine Herunterregulation um den Faktor 0,29 in MCF-TAM (Abb.5) und 0,33 in MCF-7 Zellen (Abb.6) erreicht. Die Heraufregulation von NEAT1, welche in MCF-TAM Zellen auch ohne weitere Eingriffe besteht, wurde in MCF-7 Zellen erfolgreich um den Faktor 16,95 umgesetzt (Abb.7).

Im Gegensatz zur bisherigen Datenlage und der Hypothese dieser wissenschaftlichen Arbeit konnte sich in den folgenden Experimenten jedoch nicht bestätigen, dass eine Überexpression von NEAT1 mit einer aggressiveren Proliferation von Brustkrebszellen und einer erhöhten Tamoxifenresistenz einhergeht. NEAT1-hochregulierte MCF-7 Zellen sprachen, im Vergleich zur Kontrollgruppe, durchschnittlich 13% besser auf Tamoxifen an (Abb.11). Via Antisense-Plasmid bzw. siRNA herunterregulierte MCF-7 und MCF-TAM Zellen waren 36,9% (Abb.10) bzw. 9,7% (Abb.9) sensitiver für die Anwendung von Tamoxifen. Auch die durchschnittlich 9,9% geringere Teilungsrate NEAT1-überexprimierender MCF-7 Zellen (Abb.8) im 4d-Growth-Assay und die 28% langsamere Wundheilung im Scratch-Assay (Abb.12) sprechen, im Bezug auf Viabilität und Proliferationsrate, tatsächlich für einen gegenteiligen Effekt. Da jeder Versuch nur einmal durchgeführt werden konnte und es für jedes Expressionsmuster nur eine biologische Kopie gab, mangelt es den erhobenen Daten jedoch in vielen Punkten an Signifikanz. Die ursprüngliche These, dass die NEAT1-Überexpression ein negativ determinierender Faktor im Hinblick auf Entstehung und Verlauf von Brustkrebs sei, ist demnach weder bestätigt noch widerlegt und bedarf weiterer Untersuchungen und Versuchswiederholungen.

Quellen:
(1) Bererger DP, Mertelmann R. Das Rote Buch: Hämatologie und Internistische Onkologie. 6th ed. Heidelberg: Verlagsgruppe Hühig Jehle Rehm; 2017. 1300 S
(2) Ward A, Balwierz A, Zhang JD, Kübbek M, Pawitan Y, Hielscher T, u. a. Re-expression of microRNA-375 reverses both
(3) tamoxifen resistance and accompanying EMT-like properties in breast cancer. Oncogene. 1. Februar 2013;32(9):1173-82
Yu X, Li Z, Zheng H, Chan MTV, Wu WKK. NEAT1: A novel cancer-related long non-coding RNA. Cell Prolif. 19. Januar 2017;50(2):e12329.
(4) Resazurin Cell Viability Assay | Creative Bioarray [Internet]. [zitiert 30. Januar 2025]. Verfügbar unter: <https://www.creative-bioarray.com/support/resazurin-cell-viability-assay.html>

Kontakt:
Hans Klose, Medizinische Hochschule Brandenburg, 6.FS
Hans.klose@mhb-fontane.de
Norbert Nass, Institut für Pathologie, UK-Brandenburg
norbert.nass@mhb-fontane.de