

**Studien zur zellbiologischen Funktion des „Progressions-assoziierten
Proteins“ (PAP) und dessen Bedeutung für die Invasivität von
Mammakarzinomzellen**

Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt von
Andrea U. Gnirke
aus Groß-Umstadt

Institut für Anthropologie und Humangenetik der LMU München

2000

Diese Arbeit wurde am Forschungszentrum Penzberg der Roche Diagnostics GmbH unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich H. Weidle durchgeführt.

Eingereicht am: 27. Juni 2000

Erstgutachter: Prof. Dr. E. H. Weiß

Zweitgutachter: PD Dr. H. Weiher

Sondervotum: Prof. Dr. U. H. Weidle

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Oktober 2000

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
Zusammenfassung	3
Einleitung	5
1. Klinische Bedeutung und Progression des Mammakarzinoms.....	5
1.1. Prognose und Therapie des Mammakarzinoms.....	5
2. Metastasierung.....	8
2.1. Angiogenese.....	8
2.2. Invasion.....	11
2.2.1. Adhäsion und Motilität.....	11
2.2.2. Proteolyse der extrazellulären Matrix.....	12
2.2.3. Dissemination, Extravasation und Metastasenwachstum.....	14
3. Experimentelle Systeme zur Untersuchung des Metastasierungsprozesses.....	15
3.1. Methoden zum Nachweis der Metastasierungsfähigkeit von Zellen.....	15
3.2. Ein Modell für die Progression des Mammakarzinoms: die Zelllinien MCF-7 und MCF-7 _{ADR}	15
4. Das Progressions-assoziierte Protein (PAP) und die PMP22-Genfamilie.....	18
5. Aufgabenstellung.....	22
Material und Methoden	23
1. Material.....	23
1.2. Chemikalien und biochemische Reagenzien.....	23
1.3. Puffer.....	24
1.4. Geräte.....	24
1.5. „Kits“ und fertige Lösungen.....	25
1.6. Oligonukleotide.....	25
1.7. Plasmide.....	26
1.8. Bakterienstämme.....	26
1.9. Bakterienmedien.....	26
1.10. Antikörper.....	26
1.11. Zellen und Zelllinien.....	27
1.12. Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen.....	27

2. Methoden.	28
2.1. Molekularbiologische Methoden.	28
2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.1.2. Isolierung von Gesamt-RNS.	28
2.1.3. Northern Blot und Analyse mit DIG-markierten Sonden.	29
2.1.4. Southern-Blot-Analyse.	30
2.2. Proteinchemische Methoden.	30
2.2.1. In vitro Transkription/Translation.	30
2.2.2. Gesamtproteinextraktion aus Zellen.	30
2.2.3. Bestimmung des Proteingehalts von Zellysaten.	31
2.2.4. Western Blot.	31
2.3. Zellbiologische Methoden.	32
2.3.1. Zellkulturführung.	32
2.3.2. Transfektion eukaryontischer Zellen mittels Calciumphosphat.	32
2.3.3. Transfektion eukaryontischer Zellen mittels FuGene.	33
2.3.4. Isolierung stabil transfizierter Klone.	33
2.3.5. MTT- und WST-Test.	33
2.3.6. lacZ-Test.	34
2.3.7. Bestimmung der Generationszeiten.	34
2.3.8. Matrigel Invasionstest in „Transwells“.	34
2.3.9. Adhäsionstest.	35
2.3.10. Test auf Zellmorphologie im Matrigel.	36
2.3.11. Immunfluoreszenz.	36
2.3.12. Zellzyklusarrest durch Serumentzug.	37
2.3.13. Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)	37
Ergebnisse.	39
1. Expressionsstudien zum „Progressions-assoziierten Protein“ (PAP) in Northern Blots.	39
1.1. Expression von PAP in normalen humanen Geweben.	39
1.2. Expression von PAP in humanen Tumorgeweben.	41
1.3. Expression von PAP in humanen Zelllinien.	43
1.3.1. „Multiple Tissue Northern Blot“.	43
1.3.2. Expression von PAP in humanen Mammakarzinom-Zelllinien.	44
2. Zellbiologische Untersuchungen zu PAP in Transfektionsstudien.	47
2.1. Konstruktion verschiedener Expressionsvektoren.	47

2.1.1. „Epitop-Tagging“ von PAP.	47
2.2. Verifizierung der klonierten PAP-cDNS.	51
2.2.1. Nachweis der PAP-Expression in transient transfizierten COS-7-Zellen im Northern Blot.	51
2.2.2. Spezifischer Nachweis des Proteins.	52
2.2.2.1. Gewinnung polyklonale Antiseren.	52
2.2.2.2. In vitro Transkription/Translation.	53
2.2.2.3. Nachweis von PAP in transfizierten COS-7-Zellen mittels Immunfluoreszenz.	54
2.3. Stabile Transfektion von MCF-7 mit PAP und Etablierung von Klonen.	56
2.3.1. Bestimmung der Transfektionseffizienz.	57
2.3.2. Ermittlung der G418 Konzentration zur Selektion stabil transfizierter Zellen.	58
2.3.3. Stabile Transfektion von MCF-7 mit PAP und Einzelkolonie-Selektion.	58
2.3.4. Stabilitätsanalyse der PAP-Expression in den MCF-7-Klonen.	62
2.3.4.1. Überprüfung der Integration im Genom durch Southern-Blot-Analyse.	62
2.3.4.2. Transgene Expression von PAP ohne G418-Selektionsdruck.	64
2.3.5. Transfektion mit lacZ.	66
2.4. Zellbiologische Untersuchungen in den MCF-7 Transfektanten.	67
2.4.1. Proliferationstest.	67
2.4.2. Bestimmung der Adhäsion an Substrate der Extrazellulären Matrix.	68
2.4.3. Untersuchung der Morphologie in einer Matrigel-Matrix.	70
2.4.4. In vitro Invasionstest.	73
3. Korrelation der PAP -Expression mit induziertem G1-Arrest.	77
3.1. G1-Arrest primärer Zellen	77
3.2. Zelllinien.	81
Diskussion.	83
1. Das Progressions-assoziierte Protein (PAP) hat vier Transmembrandomänen und gehört zur PMP22-Genfamilie.	83
2. Korrelationsstudien: PAP-Expression in Normalgewebe, Tumorbiopsien und Zelllinien.	85
2.1. PAP wird in vielen Organen mit Ausnahme von Gehirn und peripheren Blutlymphozyten exprimiert.	85
2.2. PAP-Expression in Tumorbiopsien.	86
2.3. PAP-Expression korreliert in Brusttumor-Zelllinien mit dem Invasionspotential.	87
3. Funktionelle Studien: Untersuchungen in vitro zum Einfluß ektopischer PAP-Expression.	89
3.1. Einfluß stabiler PAP-Expression auf Adhäsion.	89
3.2. Einfluß stabiler PAP-Expression auf Invasion und Motilität.	91
3.3. Einfluß transienter PAP-Expression auf Zellform.	93

4. PAP-Expression ist Zellzyklus-abhängig.	95
4.1. PAP-Expression korreliert in normalen Zellen mit Proliferation.	95
4.2. Einfluß stabiler PAP-Expression auf Proliferation.	96
5. Schlußfolgerungen und Entwicklung eines Modells für die Funktion von PAP.	97
6. Ausblick.	101
Literaturverzeichnis.	103

Abkürzungen

A	Absorption
Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
APDS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BGH	<i>bovine growth hormone</i>
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
cDNS	komplementäre DNS
CMV	Cytomegalovirus
d.h.	das heißt
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diehtylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Östrogenrezeptor
<i>et al.</i>	und andere
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflußzytometrie
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
°C	Grad Celsius
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
HA	Hämagglutinin
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure])
Ig	Immunglobulin
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>
l	Liter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
M	molar
mA	Milliampere
MEM	<i>Minimal essential medium</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter

mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOPS	Morpholinopropanschwefelsäure
mRNS	<i>messenger</i> (Boten-) RNS
MW	Molekulargewicht
Neo	Neomycinphosphotransferase
nm	Nanometer
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PAP	Progression-assoziiertes Protein
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
pmol	Picomol
PMP22	Peripheres Myelin Protein 22
PNS	peripheres Nervensystem
POD	Peroxidase
PR	Progesteronrezeptor
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Zitrat gepufferte Kochsalzlösung
Std.	Stunden
SV40	Simianvirus 40
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	<i>untranslated region</i> , untranslatierter Bereich
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumenanteil
w/v	Gewicht pro Volumenanteil
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

Zusammenfassung

Die Identifizierung von Genen, deren Expression Einfluß auf die Metastasierung von Tumoren nimmt, stellt eine Möglichkeit zur Verbesserung sowohl diagnostischer als auch therapeutischer Ansätze in der Behandlung von Krebs dar. Jede achte Frau in westlichen Industrienationen erkrankt an Brustkrebs, wobei die Entwicklung neuer Methoden zur frühzeitigen Erkennung von Metastasen und deren zielgerichtete Behandlung entscheidend ist, um eine Therapie von Patientinnen mit progressivem Mammakarzinom zu ermöglichen.

Entwickelt sich eine Zelle eines Primärtumors zu einer invasiven metastasierungsfähigen Zelle, so ist für diese Veränderung des Phänotyps eine grundlegende Modifizierung in der Expression zahlreicher Gene zu erwarten. In einem zellulären Modellsystem für die Progression des Mammakarzinoms wurde in der invasiven Zelllinie MCF-7_{ADR} das „Progressions-assoziierte Protein“ (PAP) identifiziert, in der nicht-invasiven Zelllinie MCF-7 konnte dagegen keine Expression nachgewiesen werden. Die Aufgabenstellung dieser Arbeit ist die Klärung der Bedeutung der Expression dieses Gens für die Veränderung einer Zelle von einem nicht invasiven hin zu einem invasiven Phänotyp.

PAP stellt ein Protein mit 157 Aminosäuren dar und gehört zur PMP22-Genfamilie, deren Mitglieder putative Viertransmembran-Rezeptoren sind. Neben der Hypothese der Einflußnahme von PAP auf die Metastasierungsfähigkeit einer Zelle werden für die Homologen eine Vielzahl zellulärer Funktionen postuliert, wie z.B. die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, Adhäsionsvermittlung, Zellzyklusregulation, Tumorgenese und Apoptose.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien zeigten, daß PAP in einer Vielzahl von Normalgeweben exprimiert wird, mit Ausnahme von Geweben des Zentralen Nervensystems (ZNS) und peripherer Blutlymphozyten. Erste vergleichende Prävalenzstudien mittels *Northern-Blot*-Analysen zwischen Tumor- und Normalgewebe einzelner Patienten wiesen im Fall von Gewebeproben aus Organen des Zentralnervensystems eine positive Korrelation der PAP-Expression mit den Tumorproben auf. Eine Untersuchung von Mammakarzinom-Zelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungsgrad in der Nacktmaus belegte, daß PAP lediglich in den als metastasierend eingestuften Zellen exprimiert wurde.

Über gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation konnte gezeigt werden, daß die in einen Expressionsvektor klonierte PAP-cDNS für ein Protein mit einer Größe von etwa 18 kDa kodierte. Auch mittels Immunfluoreszenzstudien transient transfizierter COS-7-Zellen konnte die Expression eines Epitop-markierten Proteins und die Lokalisierung an der Zellmembran nachgewiesen werden. PAP exprimierende Zellen waren nicht apoptotisch, jedoch oft auffallend abgerundet.

Einzelne Klone stabil transfizierter MCF-7-Zellen, die PAP konstitutiv exprimierten, zeigten kein anderes Wachstumsverhalten in Proliferationstests gegenüber der untransfizierten oder den

mocktransfizierten MCF-7-Zellen. Auch ihr Verhalten in *in-vitro*-Invasionstests unterschied sich nicht von dem der Ursprungszellen, während MCF-7_{ADR} hier starke Invasivität aufwies. Eine endgültige Aussage über eine Funktion von PAP bei der Invasion von Tumoren kann jedoch erst nach der Auswertung von Experimenten in Nacktmäusen gemacht werden.

Durch Serumentzug wachstumsarretierte humane Primärzellen zeigten für PAP eine inverse Regulation im Vergleich zu dem homologen Protein PMP22. PAP wurde in proliferierenden Zellen stärker exprimiert als in arretierten, während für PMP22 ein Anstieg der RNS in arretierten Zellen zu beobachten war.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß alleine die Expression von PAP nicht ausreicht, um MCF-7-Zellen *in vitro* zur Invasion zu befähigen. Dafür könnten allerdings sowohl extrazelluläre Stimuli, als auch intrazelluläre Interaktionspartner fehlen, die zur Änderung des Phänotyps der Zellen und zur Invasion notwendig sein könnten. Da Rezeptoren jedoch in allen Schritten der Metastasierung von grundlegender Bedeutung sind, kann auch für PAP nicht ausgeschlossen werden, daß es in diesen komplexen zellulären Mechanismen eine Rolle spielt.

Ein Einfluß auf die Proliferationsfähigkeit von Zellen konnte durch die konstitutive Expression von *PAP* nicht nachgewiesen werden. Eindeutig belegt werden konnte aber eine Korrelation mit dem Zellzyklus. Durch Serumentzug arretierte primäre Zellen zeigten eine verminderte PAP-Expression im Vergleich zu proliferierenden Zellen.

Die Überexpression von *PAP* in COS-7-Zellen läßt allerdings die Vermutung zu, daß PAP, ebenso wie das homologe PMP22, einen Einfluß auf die Zellmorphologie und auf die Adhäsion von Zellen haben könnte. PAP könnte dabei in einen Adhäsion-regulierenden Mechanismus eingebunden sein, der bei einer Überexpression von *PAP* zu einem Abrunden der Zellen und einem Substratkontaktverlust führen könnte. Unter physiologischen Bedingungen könnte dies für das Loslösen der Zellen während der G2-Phase des Zellzyklus notwendig sein. Bei einer fehlerhaften Regulation (einer gesteigerten Expression von PAP) unter pathologischen Bedingungen könnte eine leichtere Loslösung von Tumorzellen die Metastasierung begünstigen. Denkbar wäre eine Interaktion von PAP mit Integrin-Rezeptoren, wodurch die Affinität des Integrins beeinflußt werden könnte. Diese Hypothese bietet einen Ansatzpunkt für weitere Studien bezüglich des Einflusses von PAP auf zelluläre Vorgänge, wie Zellzyklus-Regulation und Zellwanderung.

Einleitung

1. Klinische Bedeutung und Progression des Mammakarzinoms

Die Krankheit Krebs ist in Deutschland und anderen westlichen Industrienationen nach Herz-Kreislaufkrankungen immer noch die zweithäufigste Todesursache und die Inzidenz ist bislang stetig angestiegen. Bei Frauen ist dabei der am meisten auftretende Tumortyp das Mammakarzinom. Bei einer Bevölkerung von insgesamt 42 Millionen Frauen erkrankten 1996 in Deutschland ca. 46.000 bis 56.000 an Brustkrebs, rund 19.000 verstarben aufgrund der Erkrankung, was einer Mortalitätsrate von 45,0 je 100.000 entspricht. Inzidenz und Mortalität steigen mit zunehmendem Alter kontinuierlich an. Für die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen ist sehr entscheidend, in welchem Stadium der Tumor diagnostiziert wird. Bei einem lokal begrenzten Primärtumor ohne Befall der Lymphknoten liegt die 5-Jahre-Überlebenswahrscheinlichkeit noch über 90%, während dieser Wert bei Auftreten von Fernmetastasen auf unter 30% sinkt (Sauer, 1998).

1.1. Prognose und Therapie des Mammakarzinoms

Die Metastasierung von Krebs ist die bei weitem häufigste Todesursache von Krebspatienten und ist für das Mammakarzinom bisher als nicht heilbar anzusehen (Sauer, 1998).

Die Art der Behandlung hängt von der Progression und dem Status des Karzinoms ab, so daß es keine allgemein anwendbare Form der Therapie gibt, sondern immer einer individuellen Abstimmung auf die jeweilige Patientin bedarf. Für die Klassifikation des Mammakarzinoms ist die Größe und Ausdehnung des Primärtumors (T1 bis T4) entscheidend, sowie im fortgeschrittenen Stadium das Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen (N0 bis N3) und die Anzahl von Fernmetastasen (M0 bis M1). Die Beurteilung des Malignitätsgrades invasiver Mammakarzinome erfolgt über eine histopathologische Untersuchung („Grading“), deren Einteilung in Stufe G1 bis G3 eng mit dem weiteren Verlauf der Erkrankung korreliert (Elston und Ellis, 1991).

Klinische Bedeutung haben inzwischen auch zellbiologische Kriterien erlangt, die mit der Progression des Mammakarzinoms korrelieren. So hat sowohl für die Art der Therapie als auch für die Prognose der Status der Steroidhormonrezeptoren (Östrogen- und Progesteronrezeptor) eine gesicherte klinische Relevanz. Dabei wird in den meisten Studien Patientinnen mit Östrogenrezeptor(ER)-positiven Tumoren unabhängig vom Status der Lymphknoten eine bessere Prognose zugesprochen (Knight *et al.*, 1977; McGuire, 1986). Der Verlust der ER-Expression dagegen spricht für eine fortgeschrittene Entwicklung. Neuere Studien bestätigen diese Aussage für Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen, wohingegen für Patientinnen ohne Lymphknotenbefall diese generelle positive Prognostizierung bei ER-Expression relativiert wurde: extrem niedrige, aber auch extrem hohe ER-Werte korrelierten in

dieser Patientengruppe mit einer schlechteren Überlebensrate. Gute Überlebensraten zeigten hier Patientinnen mit einem intermediären Östrogenrezeptorstatus (Hopperets *et al.*, 1997).

Darüber hinaus erlangen auch immer mehr neuere zellbiologische Prognosefaktoren eine weitreichende Bedeutung. Zu diesen Faktoren gehört zum Beispiel der immunzytochemische Nachweis disseminierter epithelialer Tumorzellen im Knochenmark, die mit Hilfe von Antikörpern gegen epithelzellspezifische Zytokeratine in Knochenmarkbiopsien detektiert werden (Braun *et al.*, 2000).

Das Vorhandensein eines anderen Intermediärfilaments, Vimentin, spricht dagegen für eine fortgeschrittene Dedifferenzierung der Mammaepithelzellen und ist mit einer schlechten Prognose für die Patientin verbunden. Vimentin ist ein mesenchymales Protein und dient als Marker für den Übergang vom differenzierten epithelialen zum dedifferenzierten mesenchymalen Zelltyp (Thompson *et al.*, 1992).

Weitgehend anerkannt als prognostischer Marker ist die Bestimmung des Status des Plasminogenaktivators vom Urokinasetyp (uPA), sowie seines Inhibitor PAI-1. Diese Faktoren haben sich vor allem bei Patientinnen ohne Lymphknotenbefall als sichere Indikatoren für eine fortgeschrittene Progression erwiesen (Prechtel *et al.*, 2000; Jänicke *et al.*, 1993)

Die derzeitige Behandlung von metastasiertem Brustkrebs nach chirurgischer Entfernung des Primärtumors umfaßt Strahlen- und Hormonbehandlungen, sowie verschiedene Chemotherapien bzw. Kombinationen der verschiedenen Anwendungen. Diese Therapien haben jedoch zum Teil starke Nebenwirkungen und im Falle von Hormon- bzw. Chemotherapie ist zudem mit Problemen aufgrund der Resistenzbildung gegen die Substanzen zu rechnen.

Fortgeschrittene aber Östrogenrezeptor-positive Tumore werden meist mit dem Östrogenantagonisten Tamoxifen oder mit Aromatasehemmern behandelt. Bei der Progression des Karzinoms kann jedoch selbst bei Vorhandensein des Östrogenrezeptors eine Hormonresistenz auftreten, so daß diese Behandlungen unwirksam werden (Eisen, 1998). Im weiteren werden dann Chemotherapien angewandt, die meist Cyclophosphamid in Kombination mit Methotrexat und 5-Fluorouracil oder mit Adriamycin beinhalten. Allerdings können Tumoren gegen diese Substanzen ebenfalls resistent werden. Für diese Resistenzen gegen strukturell nicht verwandte Agenzien („*multiple drug resistance*“) bestehen experimentelle zellbiologische Modelle, in denen das Oberflächen-Glykoprotein P170, eine ATP-abhängige Membranpumpe, für den Efflux der Substanzen aus den Zellen verantwortlich gemacht wird (Juliano und Ling, 1976; Gottesman und Pastan, 1988). Allerdings gibt es bis dato keine aussagekräftigen Studien, die eine klinische Relevanz von P170 in soliden oder in metastasierten Tumoren belegen, so daß weitere Resistenzmechanismen existieren müssen, und die Funktion von P170 nur als einer von vielen molekularen Mechanismen angesehen werden kann (Kaye, 1998).

Die Entwicklung von Metastasen, die resistent gegen hormonelle oder zytotoxische Therapien sind, stellen also eines der Hauptprobleme bei der Behandlung von Mammakarzinomen dar und sind im Endeffekt die Todesursache der Patientinnen (Fidler, 1982). Während primäre Läsionen lokal gut therapiert werden können, besteht noch ein weitreichender Bedarf bei der Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten des metastasierten Brustkrebs. Da jedoch die Entwicklung zum invasiven und resistenten und somit nicht mehr therapierbaren Phänotyp fast unaufhaltsam scheint, wäre es wünschenswert geeignete zelluläre Zielmoleküle für Therapien zu identifizieren, durch die die Progression zum metastasierenden oder zum wirkstoffresistenten Phänotyp in einem möglichst frühen Stadium unterbunden werden könnte.

Verbesserungen der Chemotherapien wurden in den letzten Jahren bezüglich der Nebenwirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem und durch Einführung neuer Substanzen, sogenannter Taxane, erreicht, die sich durch höhere Reaktionsraten gegenüber der bislang üblichen Behandlung auszeichnen (Swain, 1997; Chan, 1997).

Eine weitere wichtige Entwicklung war die Einführung von Bisphosphonaten, die zur Behandlung bzw. auch Prophylaxe von Knochenmetastasen dienen. Fast 90% aller Patientinnen, die an den Folgen eines Mammakarzinoms sterben, weisen Knochenmarkmetastasen auf (Mundy und Yoneda, 1995). Bisphosphonate mindern die durch die Metastasen verursachten Schmerzen sowie das Risiko von Knochenfrakturen und Kompressionen des Rückenmarks (Coleman, 1987). Gerade diese Erscheinungen bedingen eine starke Verschlechterung der Lebensqualität und die kostenintensive Hospitalisierung von Brustkrebspatientinnen (Schwirzke *et al.*, 1999).

Bei der Behandlung von fortgeschrittenem Mammakarzinom zeigte sich die Verwendung eines humanisierten Antikörpers (Herceptin) gegen den Tyrosinkinase-Rezeptor HER2 („*human epidermal growth factor receptor 2*“) als erfolgreich. In einer klinischen Studie Phase III an Patientinnen mit HER2-überexprimierenden Tumoren konnte die Wirkung der Chemotherapie durch die Kombination mit Herceptin deutlich verbessert werden (Pietras *et al.*, 1998). Bei Patientinnen mit progressivem Mammakarzinom mit ein bis zwei durchgeführten Chemotherapien zeigte Herceptin zudem auch alleine eine Wirkung (Cobleigh *et al.*, 1999). Da jedoch nicht alle, sondern nur maximal 30% aller Mammakarzinome HER2 überexprimieren, bleibt die Behandlung mit Herceptin auf diese Patientengruppe beschränkt.

Die Entwicklungen weiterer neuer Therapiemöglichkeiten beruhen auf der Blockierung molekularer Mechanismen, die für Prozesse der Metastasierung notwendig sind. Dabei besteht prinzipiell die Möglichkeit in jede Stufe der Metastasierung einzugreifen, da immer eine Reihe von Ereignissen notwendig ist, damit eine maligne Zelle überhaupt den Primärtumor verlassen und an einer anderen

Stelle wieder wachsen kann. Dazu gehören die Angiogenese, die Invasion, die Anhaftungsfähigkeit und schließlich die Proliferation. Diese Prozesse sollen im weiteren näher beschrieben werden.

2. Metastasierung

Unter dem Prozeß der Metastasierung versteht man die Loslösung von Zellen vom Primärtumor, deren Wanderung über das Blut- oder Lymphsystem zu einem entfernten Organ und die dortige Etablierung eines zweiten Tumors. Eine Übersicht über die einzelnen Stufen dieses Prozesses und Beispiele daran beteiligter molekularer Faktoren gibt Abbildung 1.

Nach der malignen Transformation einer Epithelzelle, die zur Bildung des primären Karzinoms geführt hat, scheinen bis zur Entstehung einer metastasierungs-fähigen Zelle zunächst weitere genetische Veränderungen (Mutationen) notwendig zu sein. Für das kolorektale Adenokarzinom konnte gezeigt werden, daß die Anzahl genetischer Veränderungen in späten invasiven Stadien größer war als in frühen Stadien der Tumorentwicklung (Vogelstein, 1988), woraus Fearon und Vogelstein (1990) ein Modell der Tumorprogression aufgrund quantitativer genetischer Veränderungen in Onkogenen und/oder Tumorsuppressorgenen entwarfen. Auch für das Mammakarzinom wurde ein solches Modell postuliert, allerdings scheinen diese Veränderungen nicht ausreichend, um einen invasiven Phänotyp zu entwickeln. Moustafa und Nicolson (1997) konzipierten deshalb für die Progression des Mammakarzinoms ein komplexeres Schema, das sowohl Veränderungen auf genomischer Ebene, als auch Änderungen in der Expression von Genen mit einbezieht. Diese Modifizierungen können positive, Metastasierung-stimulierende Faktoren oder negative, Metastasierung-supprimierende Faktoren, umfassen. Zu den stimulierenden Faktoren zählen Onkogene, heterotypische Adhäsionsmoleküle, Proteasen, Motilitätsfaktoren sowie Angiogenese-Induktoren. Die Metastasen-Suppressor-Gene umfassen homotypische Adhäsionsmoleküle, Protease-Inhibitoren, Differenzierungsfaktoren, Wachstumsfaktoren und Angiogenese-Inhibitoren.

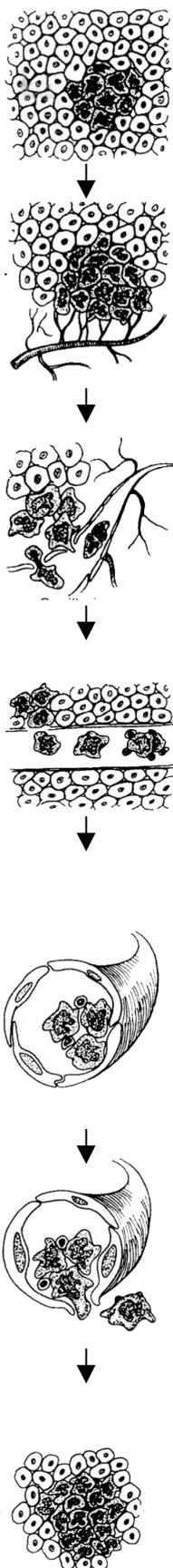
2.1. Angiogenese

Ein sehr wichtiger Aspekt der Tumorprogression ist die Neubildung von Blutgefäßen, die Neovaskularisierung oder Angiogenese. Mutationen in dem Zellzyklus und Apoptose regulierenden Gen p53 ermöglichen es einer Tumorzelle zum einen unter Sauerstoffmangel zu überleben und sind zum anderen auch für eine erhöhte Produktion von VEGF („*vascular endothelial cell growth factor*“) und eine Verminderung von Thrombospondin verantwortlich (Mukhopadhyay, 1995). Dies führt zur Induktion der Angiogenese und stellt somit einen entscheidenden Schritt bei der Progression invasiver Tumore dar. Blutgefäße sind notwendig, um Tumoren, die einen Durchmesser von 1 bis 2 mm überschritten haben, mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen und sind grundlegende

Voraussetzung für eine Verbreitung der Tumorzellen über Blutgefäße. Begünstigt werden könnte die Verbreitung von Tumorzellen durch die abnormale Morphologie und Größe der beteiligten Endothelzellen, da die neu gebildeten Gefäße durchlässiger sind als normale Blutgefäße (Harris, 1997). Die für die Vaskularisierung notwendigen Schritte von der Proliferation der Endothelzellen, über die Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) bis hin zur Migration der Endothelzellen werden durch ein Zusammenspiel von Induktoren und Inhibitoren reguliert. Unter physiologischen Bedingungen besteht zwischen diesen Faktoren ein ausgewogenes und reguliertes Gleichgewicht. Eine Störung dieses Gleichgewichts tritt in Tumoren auf und wird als „*angiogenic switch*“ bezeichnet (Hanahan und Folkman, 1996).

Auch für das Mammakarzinom konnte eine Korrelation des Grades der Vaskularisierung mit dem Auftreten von Fernmetastasen hergestellt werden (Weidner *et al.*, 1992). Darüber hinaus konnte die Expression von VEGF in Zusammenhang mit p53 Mutationen in klinischen Studien als ein weiterer prognostischer Marker bestätigt werden (Linderholm *et al.*, 2000).

Abbildung 1: Allgemeines Modell zur Progression von Tumoren und Entwicklung von Metastasen. Dargestellt ist ein schematischer Ablauf von der Entstehung des Primärtumors durch Transformation einer Zelle, über die Angiogenese bis hin zur Invasion und Verbreitung von Zellen, die in einem entfernten Organ zur Bildung eines Sekundärtumors führen. Aufgelistet sind einige Beispiele an diesem Prozeß beteiligter Proteine, die als Induktoren oder Inhibitoren wirken können.



Stufe	Beispiele beteiligter Proteine	
	Induktoren	Inhibitoren
Transformation		
	Onkogene	Tumorsuppressorgene
Angiogenese		
	VEGF FGF TGF- α Angiogenin VPF	TIMP PF4 Angiostatin Thrombospondin
Invasion		
Adhäsion, Dissoziation	Integrine CD44 VLA-4 ICAM-1 OPN	Cadherine
Motilität	HGF/SF IGF-II Autotaxin (ATX) ECM-Komponenten TGF- β IGF-I IL-8 Histamine	Nm23
Intravasation	Matrixmetalloproteinasen uPA, Plasmin Kathepsine	TIMP PAI-1 und -2 Maspin
Dissemination		
Anhaftung	Integrine CD44 Selektine	
Extravasation ?		
Metastasenwachstum		
	bFGF IL-8 IGF-I und -II EGF TGF- β IL-6	
Angiogenese		

2.2. Invasion

2.2.1. Adhäsion und Motilität

Für die weiteren Schritte der Metastasierung spielen nun verschiedene Adhäsionsmoleküle eine Rolle. Die Tumorzellen müssen die Fähigkeit erlangt haben, sich vom Primärtumor abzulösen, die Basalmembran und das Bindegewebe durchwandern zu können, also beweglich zu sein, und schließlich müssen sie sich auch an andere Zellen wieder anlagern können. Bei dieser Entwicklung können sowohl Metastasierung-supprimierende Gene, wie z.B. Cadherine, als auch Metastasierung-stimulierende Gene, z.B. Integrine, CAMs und CD44-Varianten, von Bedeutung sein.

Ein sehr wichtiges Adhäsionsmolekül stellt E-Cadherin dar, daß von allen Zellen epithelialen Typs exprimiert wird und homotypische Zell-Zell-Interaktionen vermittelt.

Die verminderte Expression von E-Cadherin führt zu einem Verlust von Zell-Zell-Kontakten, zu einer Veränderung der Zellmorphologie und zu invasivem Wachstum. Die Zellen lösen sich voneinander und nehmen ein fibroblastoides Aussehen an (Behrens *et al.*, 1989). Umgekehrt führt eine Reexpression von E-Cadherin zu einer Verminderung der Invasionsfähigkeit und einer Erhöhung der Zelladhäsion. Für viele Karzinome ist belegt, daß der Verlust von E-Cadherin mit der Progression der Tumore assoziiert ist (Bracke *et al.*, 1996). E-Cadherin ist über den β -Catenin-Komplex mit dem Zytoskelett verbunden und übernimmt in diesem Zusammenhang auch eine signalvermittelnde Funktion.

Integrine sind dagegen Adhäsionsmoleküle, die für den Kontakt der epithelialen Zellen mit Komponenten der extrazellulären Matrix verantwortlich sind. Sie binden an Proteine, wie Laminin, Fibronectin, Vitronectin und Kollagene. Integrine bilden stets Heterodimere aus einer α - und einer β -Untereinheit, die dann an eine bestimmte in den ECM-Komponenten vorkommende Peptidsequenz binden. Dabei handelt es sich häufig um die Sequenz Arg-Gly-Asp (RGD). Durch die vielfachen Kombinationsmöglichkeiten der verschiedenen α - und β -Untereinheiten können Integrine diverse Funktionen wahrnehmen und sowohl eine erhöhte Expression als auch ein Verlust von Integrinen haben entscheidende Auswirkungen auf das invasive Wachstum von Tumoren (Wagner, 1999).

Als Membranrezeptoren übernehmen Integrine signalvermittelnde Funktion zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett und beeinflussen so die Form und Beweglichkeit von Zellen. Integrine wechselwirken zudem mit Wachstumsfaktor-Rezeptoren, erhöhen deren Aktivität und haben so direkten Einfluß auf die Proliferation (Miyamoto *et al.*, 1996). Als Bestandteile sogenannter fokaler Adhäsionsstellen sind sie für die Motilität von Zellen verantwortlich. Dies sind dynamische Strukturen, in denen ständig Adhäsion und Deadhäsion von Integrinen sowie Organisation von Aktin- und Myosinfilamenten stattfinden, so daß durch diese molekularen Mechanismen die Bewegung von Zellen ausgelöst werden kann (Huttenlocher *et al.*, 1996). Über die Integrin-

assoziierten Tyrosinkinase FAK („*focal adhesion kinase*“), Src oder Abl findet eine Prozessierung Integrin-vermittelter Signale statt (Hanks und Polte, 1997).

Die Organisation der Aktinfilamente einer Zelle unterliegt der Regulation durch die kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie Rho, Rac und Cdc42, die wiederum aufgrund Integrin-vermittelter Signale aktiviert werden (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997). Somit ist für die Motilität von Zellen ein koordinierter Mechanismus zwischen ECM, Integrinen und Signaltransduktionswegen notwendig.

Eine nachgewiesene wichtige Rolle für die Invasion von Tumorzellen spielt das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, dessen Blockierung die Ausbildung von Tumoren in Nacktmäusen verhinderte und dessen Expression in Patienten mit malignem Melanom mit der Progression des Tumors korreliert (Felding-Habermann *et al.*, 1992; Mitjans *et al.*, 1995). Für Mammakarzinom-Patientinnen hingegen sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit mit einer erhöhten Expression der α_6 -Integrin-Untereinheit im Primärtumor (Friedrichs *et al.*, 1995). Weitere korrelative und funktionelle Studien weisen auf eine Beteiligung von $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$ Rezeptoren an der Progression von Brustkrebs hin (Shaw, 1999).

Integrine werden zudem für Tropismen von Metastasen in bestimmte Organe verantwortlich gemacht. So wird das Integrin $\alpha_v\beta_3$ in Knochenmetastasen von Brustkrebspatientinnen besonders stark exprimiert (Liapis *et al.*, 1996).

Außer durch Integrine kann sowohl die Bewegung von Tumorzellen, als auch die von Endothelzellen (notwendig zur Angiogenese), durch Zytokine wie AMF („*autocrine motility factor*“), ATX (Autotaxin) oder HGF/SF („*hepatocyte growth factor*“/„*scatter factor*“) stimuliert werden (Kantor und Zetter, 1996). Für das Mammakarzinom konnte belegt werden, daß eine schlechte Prognose mit einem hohen HGF-Spiegel einhergeht (Yamashita *et al.*, 1994).

Um die Barriere der Basalmembran passieren zu können, müssen Tumorzellen außerdem in der Lage sein, die Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) aufzulösen. Dazu müssen sie entweder Proteasen sekretieren oder aktivieren, die dann die Komponenten der ECM auflösen. Erst dann können Tumorzellen in die Blut- oder Lymphgefäße gelangen (Intravasation) und sich ausbreiten (Dissemination).

2.2.2. Proteolyse der extrazellulären Matrix

In den Prozess der Proteolyse der extrazellulären Matrix ist eine Kaskade von Enzymen involviert, die in Matrixmetalloproteinasen (MMP), Serinproteasen und Cathepsine unterteilt werden können.

Eine äußerst wichtige Rolle wird beim Mammakarzinom dem System um die Serinprotease uPA zugesprochen. Der Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA), sein Rezeptor (uPAR) sowie die Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 bilden ein komplexes System, das Proteolyse, Zelladhäsion und ECM-Struktur reguliert. An der Zelloberfläche der Tumorzellen kann uPA nach Bindung an den uPA-Rezeptor Plasminogen in Plasmin spalten. Plasmin selbst kann dann direkt ECM-Bestandteile lysieren

oder weitere Kollagenasen und Wachstumsfaktoren aktivieren (Reuning *et al.*, 1998). Die Aktivität von uPA wird außerdem durch die Bindung der Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 kontrolliert.

Prinzipiell können die Komponenten des uPA-Systems von den Tumorzellen sowie von Endothelzellen, Fibroblasten oder infiltrierenden Leukozyten synthetisiert werden. Lokalisierungs- und Expressions-Studien ergaben aber, daß der uPA-Rezeptor in erster Linie von den Tumorzellen, uPA allerdings nur von den Tumorzellen der Invasionsfront und von den Stromazellen gebildet wurde. PAI-1 war überwiegend in der extrazellulären Matrix nachweisbar (Weidle *et al.*, 1994). Eine Reihe von experimentellen Daten, die die Bedeutung des Systems für die Invasivität von Zellen *in vitro* und *in vivo* belegen, konnten in klinischen Studien bestätigt werden. Beim Mammakarzinom gelten uPA und PAI-1 als unabhängige Prognosefaktoren für den Verlauf bei Patientinnen mit metastasefreien Lymphknoten. Erhöhte uPA-Konzentrationen in den Tumor- oder Stromazellen weisen auf ein frühes Auftreten eines Rezidivs hin. Auch erhöhte PAI-1 Konzentrationen korrelieren mit einer schlechten Prognose für die Patientinnen, was sich mit einer Schutzfunktion von PAI-1 vor einer „Autodigestion“ der Tumor- und Endothelzellen erklären läßt (Grondahl-Hansen *et al.*, 1993).

Eine weitere Klasse von Proteasen, die der Matrixmetalloproteinasen (MMP), spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Auflösung der extrazellulären Matrix und der gerichteten Invasion von Krebszellen. MMP werden je nach Substratspezifität und Struktur in mehrere Gruppen eingeteilt: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, membrangebundene MMP (MT-MMP) und andere MMP, die keiner der genannten Gruppen zugeordnet werden können. Experimentelle und klinische Daten belegen eine Beteiligung von Gelatinase A (MMP-2), Gelatinase B (MMP-9) und Stromelysin-3 (MMP-11) an der Entwicklung von malignen Brusttumoren. Hohe MMP-2 Expression konnte mit einer schlechten Prognose bei Brustkrebspatientinnen korreliert werden, jedoch können MMP aufgrund ihrer komplexen Expressionsmuster und Regulationsmechanismen bisher nicht wie uPA als Prognosefaktoren eingesetzt werden.

Die meisten MMP werden als latente Vorläufermoleküle (Zymogene) sowohl von den Tumorzellen, als auch von Stromazellen oder inflammatorischen Zellen sezerniert und mit Ausnahme von MMP-11 und MT1-MMP im extrazellulären Spalt durch die Entfernung des N-terminalen Präpeptids proteolytisch aktiviert. Die Aktivität der MMP wird allerdings extrazellulär auch von Inhibitoren, sogenannten TIMP („*tissue inhibitors of metalloproteinases*“), reguliert, die in der konservierten katalytischen Domäne der aktivierten MMP binden (Westermarck und Kähäri, 1999). Dies verdeutlicht, daß für Matrixmetalloproteinasen ein komplexer Regulationsmechanismus existiert, und daß sie als inaktive Vorläufer, als aktive Enzyme oder als Enzym-Inhibitor-Komplex vorliegen können.

Den membrangebundenen MMP MT1-MMP und MT2-MMP wird neben ihrer proteolytischen Aktivität gegen Kollagene, Gelatine, Laminin, Fibronectin, Vitronectin und Aggrekan auch eine wichtige regulatorische Funktion zugeschrieben. Sie binden pro-MMP-2 an der Zelloberfläche und

aktivieren das Enzym dort durch Proteolyse, wodurch die lokale ECM-Degradation an der Zelloberfläche verstärkt wird. Dieser Prozeß könnte für eine kontrollierte und gerichtete Wanderung der Tumorzellen von Bedeutung sein (Murphy und Knäuper, 1997).

2.2.3. Dissemination, Extravasation und Metastasenwachstum

Der größte Anteil der vom Primärtumor losgelösten und durch die Basalmembran gewanderten Zellen breitet sich über das lymphatische System aus. Nur ein geringer Anteil der Zellen verbreitet sich über die Blutbahn, wobei weniger als 0,05% der zirkulierenden Zellen überhaupt Metastasen bilden (Nicolson, 1991). Nur solche Zellen, die nicht vom Immunsystem eliminiert werden und die eine minimale Anzahl von Genen, die für die Metastasierung notwendig sind, dauerhaft über- oder unterexprimieren, sind in der Lage in einem distinkten Organ einen neuen Tumor zu bilden (Moustafa und Nicolson, 1997). Im Kapillarbett dieses Organs müssen die Tumorzellen nun zunächst wieder an Endothelzellen anhaften können, was über Adhäsionsmoleküle wie Integrine, CD44 oder Selektine vermittelt werden kann. Für das „*homing*“ bestimmter Tumorarten in bestimmte Organe werden außerdem Motilitäts- bzw. Wachstumsfaktoren wie *Insulin-like growth factor I* (IGF-I), Interleukin-8 (IL-8) oder Histamine verantwortlich gemacht, die die Zellen chemotaktisch anlocken können (Woodhouse *et al.*, 1997).

Die meisten Metastasierungsmodelle gehen schließlich von der Extravasation der Tumorzellen aus dem Blutgefäßsystem ins Parenchymgewebe aus, wo sich einzelne Zellen (Mikrometastasen) einlagern und schließlich proliferieren (Luzzi *et al.*, 1998). Bei diesem Prozeß wären nach dem Verlassen des Gefäßes erneut proteolytische Mechanismen zur Degradation der extrazellulären Matrix und Bewegung der Zellen durch das Stroma notwendig. Al-Mehdi *et al.* (2000) postulieren nun aber ein neues Modell, da sie zeigen konnten, daß GFP-markierte stark metastasierende 2.10.10. und HT1080 Zellen an den Endothelzellen der präkapillären Arteriolen der Lunge adhärten und nur selten die Gefäßwand durchbrachen. Kolonien bestehend aus mehreren Zellen waren nach zwei bis drei Tagen nur intravaskulär nachweisbar. Dies zeigte, daß disseminierte Tumorzellen in der Lunge bereits in den Blutgefäßen proliferieren konnten und dazu nicht ins Gewebe auswandern mußten.

Das Wachstum der metastasierten Zellen wird von Wachstumsfaktoren bestimmt, die vielfach autokrin von den Tumorzellen selbst synthetisiert werden können und dann schlußendlich die Bildung eines Sekundärtumors ermöglichen.

3. Experimentelle Systeme zur Untersuchung des Metastasierungsprozesses

3.1. Methoden zum Nachweis der Metastasierungsfähigkeit von Zellen

Zur Identifizierung relevanter Faktoren, die für die Entwicklung von Tumoren und Metastasen verantwortlich sind, sind Zelllinien und verschiedene *in vivo* und *in vitro* Modelle ein unabdingbares Werkzeug. Die Etablierung von Nacktmäusen und SCID-Mäusen ist als entscheidender Schritt für die Untersuchung von humanen Tumorzellen anzusehen (Fidler, 1986).

In vitro Invasionsmodelle wurden unter Verwendung von künstlichen Membranbarrieren geschaffen, die aus einer rekonstituierten extrazellulären Matrix (Matrigel) bestehen, die aus Extrakten des Englebreth-Holm-Swarm-Tumors isoliert werden (Kleinman *et al.*, 1986). Ein Zellkultursystem („Boyden-Kammer“ oder „Transwells“), in dem zwei Kammern durch eine solche Matrigelschicht getrennt werden, ermöglicht eine Quantifizierung der Tumorzellen, die durch Invasion das Gel durchwandern konnten (Albini *et al.*, 1987).

3.2. Ein Modell für die Progression des Mammakarzinoms: die Zelllinien MCF-7 und MCF-7_{ADR}

Wie beschrieben treten erst durch die Progression des Mammakarzinoms Schwierigkeiten bei der Behandlung der Patientinnen auf, da die Zellen des Tumors hormonunabhängig, mehrfach wirkstoffresistent und metastasierungsfähig werden. *In vitro* Modellsysteme sollen dazu beitragen, die für diesen Mechanismus verantwortlichen Faktoren zu untersuchen und zu identifizieren um somit neue Möglichkeiten der Tumorthherapie und -diagnostik zu schaffen. Das hier beschriebene Modell besteht aus den sich voneinander ableitenden Zelllinien MCF-7 und MCF-7_{ADR}, die sich deutlich in ihrer Invasionsfähigkeit unterscheiden.

Die Zelllinie MCF-7 wurde aus dem Rippenfellerguß einer Brustkrebspatientin isoliert (Soule *et al.*, 1973) und benötigt sowohl zum Wachstum in Nacktmäusen, als auch zum Wachstum *in vitro* physiologische Mengen Östrogen. MCF-7-Zellen reagieren *in vitro* auf die Gabe von Östrogen mit der Expression zahlreicher spezifischer Proteine und einer gesteigerten Proliferation (Lippman *et al.*, 1976; Aitken *et al.*, 1985). Das Antiöstrogen Tamoxifen führt dagegen bei MCF-7 zum Zellzyklusarrest und schließlich zum Absterben der Zellen (Sutherland, 1983). MCF-7-Zellen zeigen eine deutliche epitheliale Differenzierung: sie exprimieren das Intermediärfilament Keratin sowie den Östrogen- und Progesteronrezeptor und stellen somit eine Zelllinie dar, die dem frühen Stadium eines Mammakarzinoms entspricht. MCF-7-Zellen bilden zudem in Nacktmäusen keine invasiven Tumore und zeigen *in vitro* keine Wanderung durch Matrigel in Invasionsstests (Sommers *et al.*, 1994).

Durch mehrfache *in vitro* Selektionsrunden mit steigenden Adriamycinkonzentrationen wurde aus MCF-7 die Zelllinie MCF-7_{ADR} etabliert (Fairchild *et al.*, 1987; Vickers *et al.*, 1988). Diese ist sowohl gegen Adriamycin, als auch gegen andere Wirkstoffe resistent. Dies kann auf die Expression des vom Resistenzgen *MDR1* kodierten Glykoproteins P170 zurückgeführt werden. Der Phänotyp dieser sogenannten „*multiple drug resistance*“ tritt auch während der klinischen Progression des Mammakarzinoms auf und stellt ein grundlegendes Problem bei der Behandlung der Patientinnen dar. Darüber hinaus exprimiert die Zelllinie MCF-7_{ADR} nicht den Östrogenrezeptor, zeigt folglich keine Reaktion auf die Behandlung mit Östrogen oder Tamoxifen, und proliferiert östrogenunabhängig (Vickers *et al.*, 1988).

MCF-7_{ADR} unterscheidet sich von MCF-7 ebenfalls im Zelltyp. Während die parentale Zelllinie den Phänotyp einer differenzierten Epithelzelle aufweist, erscheinen die adriamycinresistenten Zellen fibroblastoid. Dies spricht für eine Dedifferenzierung der Zellen und wird durch die Expression von Vimentin bzw. den Verlust der Keratin-Expression belegt.

Auch auf genetischer Ebene zeigt die Zelllinie MCF-7_{ADR} gegenüber der Ausgangslinie MCF-7 eine fortgeschrittene Progression. Während MCF-7 den Wildtyp des Proteins p53 exprimiert, findet man in MCF-7_{ADR} eine sechs Aminosäuren umfassende Deletion in p53 (Ogretmen und Safa, 1997).

Für diese Arbeit sind aber vor allem Untersuchungen von Bedeutung, die belegen, daß die Zelllinie MCF-7_{ADR} *in vivo* und *in vitro* ein deutlich erhöhtes Invasionsverhalten im Vergleich zu MCF-7 aufweist (Thompson *et al.*, 1992).

Die Zelllinie MCF-7 steht somit für ein frühes Stadium des Mammakarzinoms, da sie ER- und Keratin-positiv ist, Tamoxifen-sensitiv, Vimentin-negativ und nicht invasiv ist. MCF-7_{ADR} dagegen ist ER- und Keratin-negativ, Vimentin-positiv, mehrfach wirkstoffresistent und invasiv. Diese Zellen sind somit ein geeignetes Modell zur Untersuchung und Aufklärung von Faktoren, die zur Progression und Metastasierung des Mammakarzinoms beitragen.

Schiemann *et al.* (1998) konnten mittels *Differential Display* und *Northern-Blot*-Analysen bestätigen, daß MCF-7_{ADR}-Zellen eine Vielzahl von Genen exprimieren, die einen direkten Einfluß auf die Invasionsfähigkeit nehmen können bzw. für die eine Korrelation mit der Progression beim Mammakarzinom festgestellt wurde (s. Abbildung 2). So exprimierten diese Zellen die ECM-degradierenden Enzyme MMP-1 und MMP-11, uPA und den uPA-Rezeptor sowie den Fibrinogen-Aktivator „*tissue factor*“, während in MCF-7 für keines dieser Gene Transkripte in *Northern Blots* nachweisbar waren. Gleiches galt für den EGF-Rezeptor und Vimentin.

In der nicht invasiven und differenzierten Zelllinie MCF-7 konnte dagegen unter anderem die Expression des Östrogenrezeptors, des homotypischen Adhäsionsmoleküls E-Cadherin und des Intermediärfilaments Keratin gezeigt werden.

Grundlage der hier vorliegenden Arbeit ist ein von Schiemann *et al.* neu identifiziertes Transkript, welches ausschließlich in der invasiven Zelllinie MCF-7_{ADR} nachweisbar war (Schiemann *et al.*, 1997a) und dementsprechend als Progressions-assoziiertes Protein (PAP) bezeichnet wurde.

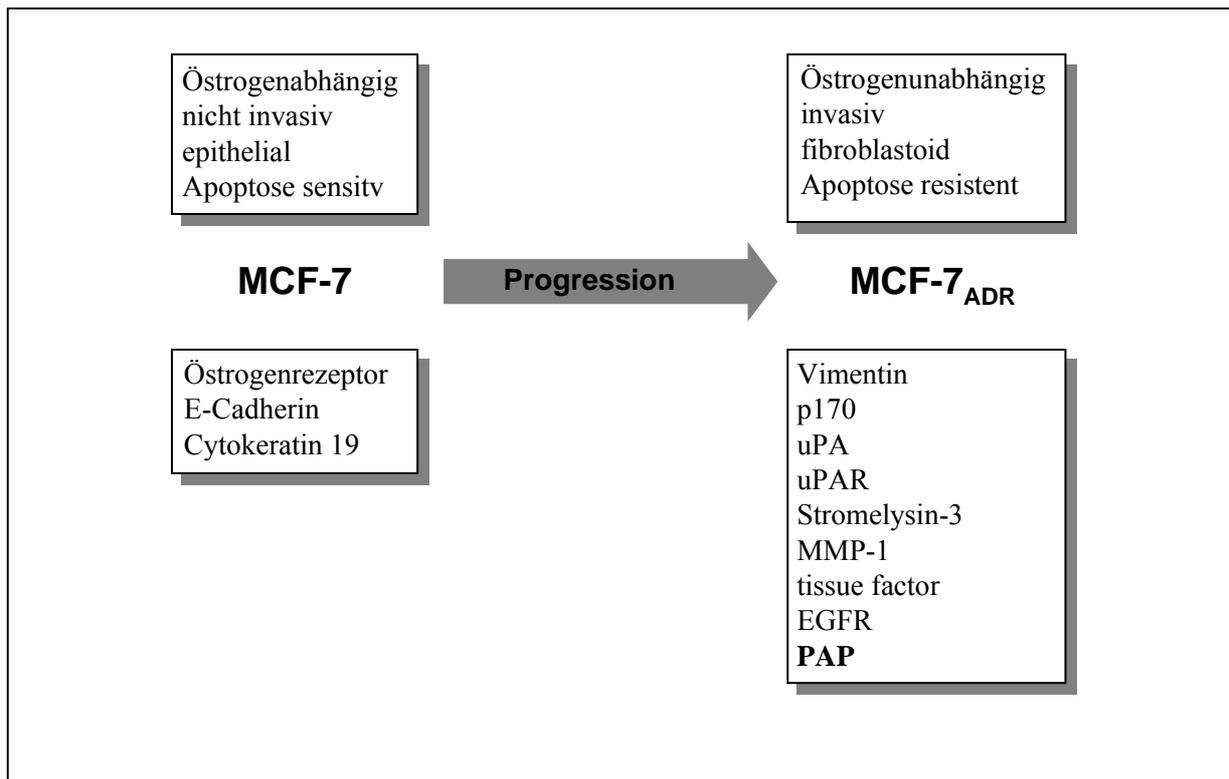


Abbildung 2: Das Modellsystem zur Progression des Mammakarzinoms aus den Zelllinien MCF-7 und MCF-7_{ADR}.

MCF-7_{ADR} repräsentiert den invasiven, dedifferenzierten, östrogenunabhängigen und wirkstoff-resistenten Phänotyp eines Mammakarzinoms, MCF-7 dagegen den nicht invasiven, differenzierten und östrogenabhängigen Typ. Beispiele einiger differentiell exprimierter Gene belegen auf molekularer Ebene die Eigenschaften der beiden Zelllinien (Schiemann *et al.*, 1998).

4. Das Progressions-assoziierte Protein (PAP) und die PMP22-Genfamilie

Das Progressions-assoziierte Protein (PAP) wird als 2,8 kb großes Transkript exprimiert und enthält nach dem etwa 200 Basen umfassenden 5'untranslatierten Bereich (5'UTR) einen offenen Leserahmen, der für ein Protein mit 157 Aminosäuren kodiert. Basierend auf computergestützten Analysen wurden für PAP vier stark hydrophobe Bereiche vorhergesagt. Daraus ergibt sich eine Struktur, die aus vier Transmembranbereichen, zwei extrazellulären Abschnitten und zwei sehr kurzen intrazellulären Bereichen besteht (s. Abbildung 3). In der ersten extrazellulären Domäne liegen die Asparaginreste an den Positionen 43 und 46 beide in einer Konsensus-Sequenz für eine potentielle N-Glykosylierungen. Da der Asparaginrest 43 in den PAP-Sequenzen von Ratte, Kaninchen und Mensch konserviert ist, wurde angenommen, daß hier bevorzugt eine Glykosylierung stattfinden könnte (Chen *et al.*, 1997).

PAP wurde in verschiedenen Systemen und Spezies unabhängig voneinander identifiziert und kloniert und deshalb auch als EMP-1 („*epithelial membrane protein 1*“), CL-20, B4B bzw. TMP bezeichnet (Marvin *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 1995; Ruegg *et al.*, 1996; Ben-Porath und Benvenisty, 1996).

Die mögliche Relevanz von PAP für die Tumorentstehung und -progression wird durch die Identifizierung des Transkripts in einem weiteren Modellsystem mit onkologischer Fragestellung deutlich. Mit Hilfe subtraktiver Hybridisierung wurden spezifische Transkripte aus *c-myc* induzierten Hirntumoren von transgenen Mäusen isoliert (Ben-Porath und Benvenisty, 1996). Eines dieser Gene wurde als Tumor-Membranprotein (TMP) bezeichnet und hat mit dem humanen PAP eine Sequenzhomologie auf Protein-Ebene von 96%. Ben-Porath *et al.* (1999) konnten bestätigen, daß es sich bei TMP/PAP um ein von dem Onkogen *c-myc* reguliertes Gen handeln könnte. TMP/PAP wurde in Brusttumoren und Lymphomen spezifisch in *c-myc*, nicht aber in *c-neu* oder *v-HA-ras* transgenen Mäusen stark exprimiert. Zudem konnte in der Promotorregion eine *c-myc*-Binderegion identifiziert werden, an die der Transkriptionsfaktor-Komplex aus *c-myc* und *max* binden kann. Nach Klonierung dieser Region in einen Vektor konnte *in vitro* die Expression eines Reportergens durch *c-myc* induziert werden.

Interessant ist ebenfalls die Entdeckung von PAP bei einer Untersuchung zur Identifizierung von Genen, deren Expression mit der Differenzierung und Reifung von Immunzellen korrelierten. PAP (hier B4B) wurde lediglich in einem bestimmten Typ von Vorläufer-B-Lymphozyten gefunden, jedoch nicht in ausdifferenzierten Immunzellen (Ruegg *et al.*, 1996).

Im Zusammenhang mit der genetischen Aufklärung von neuronalen Erkrankungen wurde PAP (hier EMP-1) aus Schwannzellen des Ischiasnerv bei Ratten isoliert (Taylor *et al.*, 1995)

Aufgrund der Proteinstruktur und starken Sequenzhomologien konnte PAP einer Familie von Proteinen zugeordnet werden, zu der neben dem am besten untersuchten Protein PMP22 auch die Proteine EMP-2 und EMP-3 sowie das etwas entfernter verwandte Protein MP20/LMIP gehören (Manfioletti *et al.*, 1990; Welcher *et al.*, 1991; Spreyer *et al.*, 1991; Church und Wang, 1993; Taylor und Suter, 1996; Ben-Porath und Benvenisty, 1996; Bolin *et al.*, 1997).

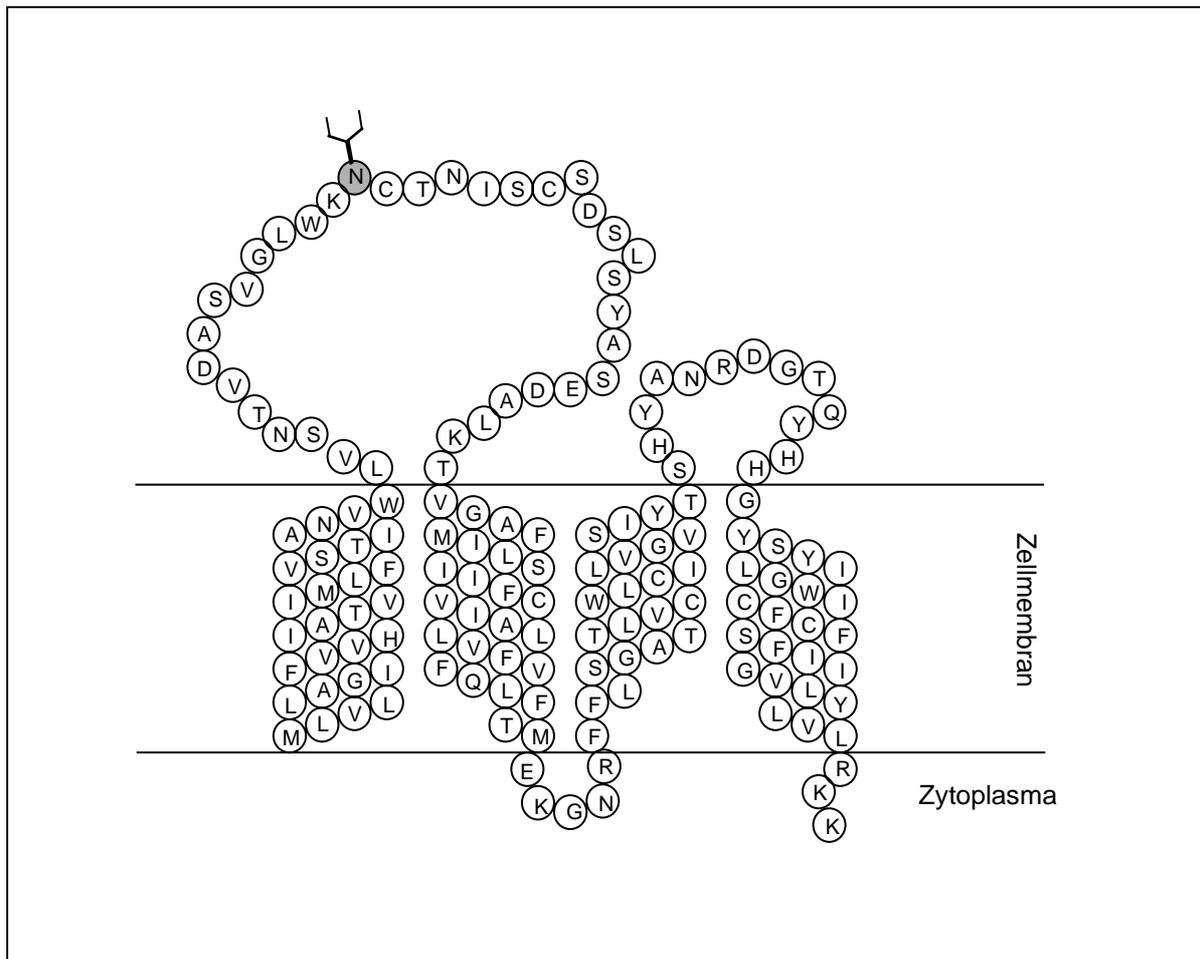


Abbildung 3: Mögliche Topologie des Progressions-assoziierten Proteins (PAP).

PAP ist ein Viertransmembranrezeptor mit zwei N-Glykosylierungsstellen: an Position 43 und 46. Der Asparaginrest 43 ist zwischen verschiedenen Spezies stark konserviert (grau unterlegt) und wird deshalb als mögliche bevorzugte Glykosylierungsstelle mit funktioneller Bedeutung angesehen (Chen *et al.*, 1997).

In allen diesen Proteinen ist die Struktur der vier Transmembrandomänen stark konserviert. Auf Proteinebene hat PAP mit PMP22 („*peripheral myelin protein 22*“) eine Sequenzhomologie von 41%, mit EMP-2 von 42%, mit EMP-3 von 32% und mit MP20 (LMIP) von nur noch 20% (Abbildung 4).

Auch die Struktur der Genloci ist sehr stark konserviert. Daraus läßt sich die Herkunft durch mögliche Duplikation eines gemeinsamen ancestralen Gens schließen. Das humane *PAP* wurde auf Chromosom 12p12.3 lokalisiert und erstreckt sich dort über einen Bereich von 21 kb (Chen *et al.*, 1997; Schiemann *et al.*, 1997 (b)). *PAP* besteht ebenso wie *PMP22* und *EMP-3* aus sechs Exons.

Auch wenn für die Proteine der PMP22-Familie eine Funktion bei der Regulation von Wachstum, Differenzierung und Apoptose postuliert wurde, konnten bisher doch nur wenige präzise Aussagen zur genauen zellulären Funktion gemacht werden.

Am besten untersucht ist bislang PMP22, das ursprünglich als „*growth arrest specific gene 3*“ (*gas-3*) bezeichnet wurde, da die Expression in serumarretierten NIH3T3-Zellen gegenüber proliferierenden Zellen stark erhöht war (Manfioletti *et al.*, 1990).

Für PMP22 konnte bewiesen werden, daß es eine wichtige Funktion in peripheren Nerven einnimmt, wo es als Myelinkomponente die Proliferation und Differenzierung von Schwannzellen beeinflusst (Naef und Suter, 1998). Genetische Veränderungen in *PMP22* werden für einige neurodegenerative Erkrankungen verantwortlich gemacht: sowohl Duplikationen im genomischen Bereich von *PMP22* als auch Punktmutationen führen zu einer der am häufigsten vorkommenden vererbare Erkrankung des peripheren Nervensystems (PNS), der sogenannten „Charcot-Marie-Tooth Typ 1A (CMT1A)“; Deletionen sind ebenfalls verantwortlich für HNPP („*hereditary neuropathy with liability to pressure palsies*“), eine andere vererbare Neuropathie; Punktmutationen treten dagegen auch beim „Dejerine-Sottas-Syndrom“ auf (Patel *et al.*, 1992; Chance *et al.*, 1993; Roa *et al.*, 1993).

Sowohl Duplikationen als auch Deletionen in *PMP22* können in Mäusen zur Demyelinisierung von Neuronen und zur Ausbildung der Neuropathien führen (Adlkofer *et al.*, 1995; Niemann *et al.*, 1999). In späten Stadien der normalen Maus-Embryonalentwicklung wurde eine auffallend starke Expression von PMP22 und auch von PAP vor allem während der Neurogenese im Gehirn nachgewiesen. Wulf und Suter (1999) postulieren allerdings für PMP22 in erster Linie eine Beteiligung an der Schwannzell-Differenzierung und –Proliferation, während sie PAP eine wichtige Rolle bei der embryonalen Neuronen-Differenzierung und dem Auswachsen der Neuriten zuschreiben.

Einige Studien unterstützen inzwischen die Hypothese, daß PMP22 eine Rolle beim programmierten Zelltod (Apoptose) einnehmen könnte. Die konstitutive Überexpression von PMP22 in Schwannzellen führte zu einer deutlichen Verzögerung beim Durchlaufen des Zellzyklus (Zoidl *et al.*, 1995), NIH3T3 Zellen reagierten auf die PMP22-Überexpression mit Apoptose (Zoidl *et al.*, 1997; Fabbretti *et al.*, 1995). Durch die parallele Expression von Wildtyp-PMP22 und CMT1A-assoziierten Mutanten wurde die Induktion der Apoptose aber verzögert, so daß diese Mutanten als dominant-negativ anzusehen sind (Fabbretti *et al.*, 1995). Brancolini *et al.* (1999) konnten durch die Coexpression von *PMP22* mit

bcl-2 die Induktion der Apoptose aufheben und beobachteten dabei eine starke Veränderung in der Morphologie der Zellen. Weitere Experimente konnten zeigen, daß für diese Apoptose-unabhängige Änderung der Zellform ein Mechanismus unter der Kontrolle der GTPase RhoA vorhanden sein muß. Diese Studien geben somit erste Hinweise auf zellbiologische Abläufe, die von PMP22 reguliert werden könnten.

	1					50
PMP22	MLLLLLLSIIV	LHVAVLVLLF	VSTIVSQWIV	GN..GHAT..	DLWQNCSTSS	
PAP	MLVLLAGIFV	VHIATVIMLF	VSTIANVWL	SNTVDASV..	GLWKNCTNIS	
EMP2	MLVLLAFIIA	FHITSAALLF	IATVDNAWV	GD..EFFA..	DVWRICTNNT	
EMP3	MSLLLLLVSA	LHILILILLE	VATLDKSWWT	LPGKE.SL..	NLWYDCTWNN	
LMIP	MYSFMGGGLF	CAWVGITILLV	VAMATDHWMQ	YRLSGSFAHQ	GLWRYCLGK	
Konsensus	<u>ML-LL-GII-</u>	<u>LHIA-LILLF</u>	<u>VATIDN-WWV</u>	GN-----A--	-LWRNCTNNS	
	51					100
PMP22	SGNVHHCFFS	SPNEWLQSVQ	ATMILSIIIFS	ILSLFLFFCQ	LF...TLTKG	
PAP	CSD...SLSY	ASEDALKTVQ	AFMILSIIIFC	VIALLVFVFQ	LF...TMEKG	
EMP2	NCTVIND.SF	QEYSTLQAVQ	ATMILSTILC	CIAFFIFVLQ	LF...RLKQG	
EMP3	DTKTWACSNV	SENGWLKAVQ	VLMVLSLILC	CLSFILFMFQ	LY...TMRRG	
LMIP	C....YLQT	DSIAYWNATR	AFMILSALCA	ISGIIMGIMA	FAQQPTFSRI	
Konsensus	<u>C--V--CLS-</u>	<u>S-N-WL-AVQ</u>	<u>A-MILSII-C</u>	-----LFVFQ	LF---T---G	
	101					150
PMP22	GRFYITGIFQ	ILAGLCVMSA	AAIYTVRHPE	WH.....	LNSDYSYGFA	
PAP	NRFFLSGATT	LVCWLCILVG	VSIYTSHYAN	RD.....	.GTQYHHGYS	
EMP2	ERFVLTSLIQ	LMSCLCVMIA	ASIYTDRRRED	IHDKNAKFYP	VTREGSYGYS	
EMP3	GLFYATGLCQ	LCTSVAVFTG	ALIYAIHAE	ILEKH.....	.PRGGSFGYC	
LMIP	SRPFSAGIMF	FSSSLFVFLA	LAIYTGVTVS	FLGRRF....	..GDWRFSWS	
Konsensus	<u>GRF-LTGI-Q</u>	<u>L-SSLCVM-A</u>	<u>A-IYT---EE</u>	I--K-----	--RD-S-GYS	
	151					175
PMP22	YILAWVAFPL	ALLSGVIYVI	LRKRE			
PAP	YILGWICFCF	SFIIGVLYLV	LRKK.			
EMP2	YILAWVAFAC	TFISGMMYLI	LRKRK			
EMP3	FALAWVAFPL	ALVSGIYIYI	LRKRE			
LMIP	YILGWAVLM	TFFAGIFYM.			
Konsensus	<u>YILAWVAFPL</u>	<u>-FISG-IYLI</u>	<u>LRKRE</u>			

Abbildung 4: Die PMP22-Genfamilie. Starke Homologiebereiche finden sich zwischen humanem PMP22, PAP, EMP-2 und EMP-3 vor allem in den Transmembranbereichen (unterstrichen in der Konsensussequenz). Identische Aminosäuren zwischen mindestens vier der homologen Proteine sind grau unterlegt. Nicht-homologe Aminosäuren sind in der Konsensussequenz durch einem Strich (-) dargestellt.

5. Aufgabenstellung

Das Progressions-assoziierte Protein (PAP) ist ein Protein mit vier Transmembrandomänen und gehört zur PMP22-Genfamilie. Bei einem Vergleich von zwei Mammakarzinomzelllinien wurde PAP in der invasiven Zelllinie MCF-7_{ADR} identifiziert. Ziel dieser Arbeit war es die mögliche Bedeutung von PAP für den Prozeß der Metastasierung zu untersuchen.

Dazu sollte zunächst in verschiedenen Korrelationsstudien bestimmt werden, ob es ein allgemein erkennbares Schema für die Expression von PAP unter physiologischen und pathologischen Bedingungen gibt.

In funktionellen Studien sollte dann mit Hilfe transfizierter Zelllinien überprüft werden, ob PAP in der Lage ist, die Eigenschaften von Zellen zu verändern und ob durch die Expression von PAP ein metastasierender Phänotyp induziert werden kann.

Material und Methoden

1. Material

1.2. Chemikalien und biochemische Reagenzien

Name	Bezugsquelle
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid 30% + Bisacrylamid 0,8%	Roth, Karlsruhe
Agarose MP	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat (APDS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ampicillin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (bovine serum albumin)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DAPI	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fibronektin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Formaldehyd, 37%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Geneticin (G418)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Hygromycin B	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
KollagenIV	Chemicon, Temecula, USA
Laminin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
LB-Agar	GibcoBRL, Eggenstein
LB-Broth	GibcoBRL, Eggenstein
Matrigel	Becton Dickinson, Heidelberg
Methanol	Merck, Darmstadt
MOPS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
MTT	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Nylonmembran, positiv geladen	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sea Plaque GTG Agarose	FMC Bio Products, Rockland, USA
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris Base	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween 20	Serva, Heidelberg
Vitronektin	Becton Dickinson, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	Fluka, Neu-Ulm

Alle weiteren Chemikalien oder Lösungsmittel wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Restriktionsenzyme und dazugehörige Puffer waren von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim). Soweit nicht anders vermerkt, stammten alle weiteren Enzyme, Reaktionspuffer, Nukleotide, Längenstandards und sonstige molekularbiologische Reagenzien von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) oder GibcoBRL (Eggenstein).

Verbrauchsmaterial stammte von den Firmen, Falcon (Heidelberg) Biozym (Oldendorf) oder Nunc (Wiesbaden).

1.3. Puffer

20xSSC:	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat·2H ₂ O	pH 7,0
10xMOPS:	0,2 M MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA	pH 7,0
TAE:	0,4 M Tris Base 0,2 M Eisessig 0,1 M EDTA	pH 8,4
PBS:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O 1,4 mM KH ₂ PO ₄	pH 7,4

1.4. Geräte

CO ₂ -Brutschrank	Heraeus Instruments, München
Elektrophoresekammer	GibcoBRL, Eggenstein
SDS-PAGE-Kammer	Biorad, München
Durchflußzytometer, FACScan	Beckton Dickinson, Heidelberg
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Tischzentrifuge, 5417R	Eppendorf, Hamburg
Gene Amp PCR System 9600	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA
Zentrifuge, RC-5B	Sorvall, Bad Homburg
Spektrophotometer Uvikon 931	Kontron Instruments, Mailand, Italien
Western Blot Apparatur	Biorad, München
UV-Stratalinker	Stratagene, Heidelberg
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl
<i>ELISA-Reader</i>	Tecan

1.5. „Kits“ und fertige Lösungen

Blocking solution	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Blood and Cell Culture DNA Midi Kit	Qiagen, Hilden
DIG Easy Hyb	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
High Pure PCR Purification Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
PBS	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Quiaquick Gel-Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems	Promega, Madison, USA
TriPure Isolation Reagent	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Cell Proliferation Reagent MTT	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

1.6. Oligonukleotide

Name	5'-3'-Sequenz	Verwendung
sp6	gca ttt agg tga cac tat ag	DIG-markierte PAP 3'UTR-Sonde
T7	gta ata cga ctc act ata ggg c	DIG-markierte PAP 3'UTR-Sonde; Epitop-Tagging von PAP
papha	gcc aga gaa ttc tta agc gta gtc tgg gac gtg gta tgg gta gcc gcc gcc ttt ctt tct cag gac cag ata gag	Epitop-Tagging von PAP
pap-orf1	cgc aaa att aca cac ccc ag	DIG-markierte PAP-ORF-Sonde
pap-orf2	tgg aac acg aag acc agg ag	DIG-markierte PAP-ORF-Sonde
pmp1	ccc caa atg tcc aaa agc c	DIG-markierte PMP22-Sonde
pmp2	tct gat gct ccg acc gta ag	DIG-markierte PMP22-Sonde
gapdh1	ccc ttc att gac ctc aac tac	DIG-markierte Gapdh-Sonde
gapdh2	gat gat gac ccg ttt ggc	DIG-markierte Gapdh-Sonde
neo1	ggc tgt cag cgc agg gg	DIG-markierte Neo-Sonde
neo2	ggg cag gta gcc gga tca	DIG-markierte Neo-Sonde

1.7. Plasmide

pcDNA3	Invitrogen, Leek, Niederlande
pTarget	Promega, Madison, USA
pZeoSV2	Invitrogen, Leek, Niederlande
pcDNA3.1./lacZ/Hygro	Invitrogen, Leek, Niederlande
pQBI25	Quantum, Illkirch Cedex, Frankreich
pIRES-neo	Clontech, Heidelberg

1.8. Bakterienstämme

E. coli DH5 α : F⁻ *endA1 recA1 hsdR17* (r_k⁻, m_k⁺) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1* ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169

E. coli TOP10: F⁻, *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 deoR recA1 araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL endA1 nupG*

1.9. Bakterienmedien

LB (*Luria Broth*) Medium: 1% (w/v) Bacto-Trypton
0,5% (w/v) Bacto Hefe-Extrakt
0,5% (w/v) NaCl pH 7,4

Das Medium wurde für 20 Minuten bei 121°C und 2 bar autoklaviert. 100 μ g/ml Ampicillin wurde nach Abkühlen auf etwa 50°C zugegeben.

LB-Agar wurde aus LB Medium plus 15 g/l Agar hergestellt und ebenfalls autoklaviert.

1.10. Antikörper

Name	Verwendung	Bezugsquelle
anti-HA <i>High Affinity</i>	Western Blot, Immunfluoreszenz	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
anti-HA Fluorescein	Immunfluoreszenz	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
anti-DIG-AP, Fab Fragmente	Northern Blot, Southern Blot	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
anti-Ratte IgG-POD	Western Blot	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
anti-Ratte IgG-Cy3	Immunfluoreszenz	Dianova, Hamburg

1.11. Zellen und Zelllinien

Name	Bezugsquelle	Medium
MCF-7	N. Brüner, Finsenlabor, Kopenhagen	MEM, 10% FKS, neAA, 1 mM NaPyr
MCF-7 _{ADR}	N. Brüner, Finsenlabor, Kopenhagen	MEM, 10% FKS, neAA, 1 mM NaPyr
G361	ATCC # CRL-1424	MEM, 10% FKS, neAA, 1 mM NaPyr
MTSV1-7	M. Weidner, Roche Diagnostics	MEM, 10% FKS, neAA, 1 mM NaPyr, 5 mg/l Hydrocortison, 10 µg/ml Insulin
COS-7	ATCC # CRL-1651	MEM, 5% FKS
MDA-MB-231	N. Brüner, Finsenlabor, Kopenhagen	MEM, 5% FKS
MDA-MB-435	N. Brüner, Finsenlabor, Kopenhagen	MEM, 5% FKS
MDA-MB-436	N. Brüner, Finsenlabor, Kopenhagen	MEM, 5% FKS
ZR-75-1	N. Brüner, Finsenlabor, Kopenhagen	MEM, 5% FKS
T47D	N. Brüner, Finsenlabor, Kopenhagen	MEM, 5% FKS
Hs578T	N. Brüner, Finsenlabor, Kopenhagen	MEM, 5% FKS
HMEC	BioWhittaker, Walkersville, USA	MEGM
VH83-1	H. Barchet, Roche Diagnostics	MEM, 10% FKS, neAA, 1 mM NaPyr
H94-17	M. Kubbies, Roche Diagnostics	MEM, 10% FKS, neAA, 1 mM NaPyr
HUVEC	J. Frische, Roche Diagnostics	Ham's F12K, 10% FKS, 100 µg/ml Heparin, 30 µg/ml ECGF

1.12. Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen

MEM, Earl's Salts, Glutamax I	Gibco, Eggenstein
MEGM	BioWhittaker, Walkersville, USA
Ham's F12K	Gibco, Eggenstein
Nicht-essentielle Aminosäuren (neAA), 100x	Gibco, Eggenstein
Natriumpyruvat (NaPyr), 100 mM	Gibco, Eggenstein
Fötale Kälberserum (FKS)	Hyclone, Logan, USA
Heparin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>Endothelial cell growth factor</i> (ECGF)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypsin-EDTA	Gibco, Eggenstein

2. Methoden

2.1. Molekularbiologische Methoden

Alle grundlegenden molekularbiologischen Methoden wurden entweder wie in Sambrook *et al.* (1989) oder unter Verwendung der oben genannten Komplettsysteme („Kits“) durchgeführt.

2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde verwendet, um für *Northern* und *Southern Blots* DIG-markierte Sonden herzustellen. Dazu wurde der *PCR DIG Probe Synthesis Kit* angewendet und die Reaktionen laut Vorschrift durchgeführt.

Um ein Fusionskonstrukt aus PAP cDNA und einer Teilsequenz aus Hämagglutinin des Influenzavirus („*HA-Tag*“) zu generieren, wurde ebenfalls eine PCR durchgeführt. Dazu wurde die DNA-Polymerase *Pwo* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) eingesetzt, da dieses Enzym durch eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität geringere Mutationsraten aufweist als die *Taq*-Polymerase. In einen 50- μ l-Ansatz wurden 25 pmol des Primers papha und 15 pmol des T7-Primers eingesetzt. Als *Template* dienten 100 ng des Plasmids pPAP3. Die PCR erfolgte im Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer) mit 30 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 55°C. Das entstandene PCR Produkt wurde gereinigt und sequenziert und nach Überprüfung der Sequenz zur Klonierung eingesetzt.

2.1.2. Isolierung von Gesamt-RNS

Die Isolierung von Gesamt-RNS erfolgte nach dem von Chomczynski und Sacchi (1987) beschriebenen Einschnitt-Verfahren unter Verwendung von *Tripure* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim).

Adhärenz wachsende Zellen wurden direkt in den Zellkulturflaschen lysiert. Das Medium wurde abgossen und die subkonfluenten Zellrasen einmal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml *Tripure* pro 10 cm² in die Gefäße pipettiert, über den Flaschenboden verteilt und das entstandene Zellysate durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in einer 10 ml Pipette geschert. Das Lysat wurde in ein 15-ml-Reaktionsgefäß überführt und nach fünf Minuten mit der 0,2-fachen Menge Chloroform versetzt und 15 Sekunden lang kräftig geschüttelt. Zur Trennung der wässrigen von der phenolischen Phase erfolgte eine Zentrifugation bei 6000 x g für 15 Minuten. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen, jeweils 1 ml in ein RNasefreies 2ml-Reaktionsgefäß gegeben und die RNS durch Zugabe von 0,8 ml Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation bei 12000 x g und 4°C für 30 Minuten wurde das Präzipitat zwei mal mit 70%igem Ethanol gewaschen und entweder in 70%igem Ethanol bei -80°C gelagert oder sofort für etwa fünf Minuten luftgetrocknet. Die RNS wurde in DEPC-H₂O

bei 55°C für 15 Minuten gelöst. Zur Bestimmung der Konzentration der gewonnenen Lösung wurde im Spektrophotometer die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt und aus dem Quotienten $A_{260/280}$ der Reinheitsgrad berechnet.

2.1.3. Northern Blot und Analyse mit DIG-markierten Sonden

10 bis 20 µg Gesamt RNS wurden pro Spur im *Northern Blot* analysiert. Dazu wurden die Proben zunächst mit RNS-Probenpuffer versetzt, für 15 Minuten bei 55°C denaturiert und danach sofort auf Eis gestellt. Die RNS wurde in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel in 1xMOPS bei 100 V elektrophoretisch getrennt.

RNS-Probenpuffer: 250 µl Formamid, deionisiert
 83 µl Formaldehyd 37%ig
 50 µl 10x MOPS
 0,5 µl Bromphenol-Blau-Lösung (10%ig)
 ad. 500 ml DEPC-H₂O

Formaldehyd-Agarosegel: 1 g Agarose
 10 ml 10xMOPS
 18 ml Formaldehyd 37%ig
 ad. 100 ml DEPC-H₂O

Das Agarosegel wurde für 30 bis 45 Minuten in 20xSSC gewaschen und die RNS mittels Kapillartransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen (Sambrook *et al.*, 1989). Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in 2xSSC gewaschen, im Stratalinker UV-fixiert und anschließend getrocknet.

Der Blot wurde zunächst für eine Stunde mit *DIG Easy Hyb* für eine Stunde prähybridisiert. Die unter Verwendung des *PCR DIG Probe Synthesis Kit* hergestellten DIG-Sonden wurden 10 Minuten bei 95°C denaturiert, sofort in frische Hybridisierungslösung gegeben (0,25 ng/ml *DIG Easy Hyb*) und die Membran in dieser Lösung über Nacht bei 50°C inkubiert. Der Blot wurde anschließend zweimal fünf Minuten mit 2xSSC, 0,1% SDS bei Raumtemperatur und zweimal 15 Minuten mit 0,1xSSC, 0,1% SDS bei 65°C gewaschen.

Die weiteren Schritte zur Detektion der DIG-markierten Sonden erfolgte wie vom Hersteller für das *DIG Wash and Block Buffer Set* beschrieben. Als Substrat diente *CDP-Star* (Roche Molecular Biochemicals), welches durch die an die DIG-spezifischen Antikörper konjugierte alkalische Phosphatase (AP) umgesetzt wird und dabei Lumineszenz aussendet. Das Substrat wurde direkt auf die Membran pipettiert, der Blot eingeschweißt und zur Visualisierung ein Röntgenfilm aufgelegt.

Um einen *Northern Blot* erneut hybridisieren zu können, wurde die DNA-Sonde vom Blot gewaschen („gestrippt“). Dazu wurde die Membran für 10 Minuten bei 95°C im Wasserbad in 0,1x SDS geschwenkt, anschließend in 2xSSC gewaschen und entweder erneut hybridisieren oder trocken gelassen und bei -20°C gelagert.

2.1.4. Southern-Blot-Analyse

Genomische DNS wurde mit dem *Blood and Cell Culture DNA Midi Kit* aus Zellen isoliert. Zur enzymatischen Spaltung wurden 20 µg genomische DNA mit 20 U Restriktionsenzym bei 37°C für sechs bis acht Stunden inkubiert. Die Fragmente wurden mittels Elektrophorese in einem 0,7 %igem TAE-Agarosegel (0,7 % Agarose MP in TAE-Puffer) bei 40 V für 16 Stunden aufgetrennt. Es folgte ein Kapillartransfer mit 0,4 M NaOH wie beschrieben (Sambrook *et al.*, 1989) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Molecular Biochemicals) mit anschließender UV-Quervernetzung der Moleküle zur Fixierung. Der Blot wurde analog zum Northern Blot in *DIG Easy Hyb* mit 15 ng DIG-markierter Sonde pro ml bei 42°C über Nacht hybridisiert. Die Waschschritte wurden anschließend ebenfalls wie für den RNS-Blot beschrieben durchgeführt. Die Detektion erfolgte unter Verwendung von CDP-Star als Substrat.

2.2. Proteinchemische Methoden

2.2.1. *In vitro* Transkription/Translation

Eine gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation erfolgte mit Hilfe des *TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems*. Dazu wurden in einen Versuchsansatz Plasmide eingesetzt, die über einen T7-Promotor verfügten, so daß mit Hilfe der T7-RNS-Polymerase entsprechende Transkripte generiert werden konnten. Die Reaktion erfolgte wie vom Hersteller beschrieben, allerdings wurde ein kompletter Aminosäure Mix (*Aminoacid Mixture, complete*; Promega) eingesetzt und die Proteine anschließend im Western-Blot über eine angehängte HA-Sequenz detektiert.

2.2.2. Gesamtproteinextraktion aus Zellen

Zur Gewinnung von Lysaten wurden Zellen in 10 cm Schalen ausgesät. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS wurden auf die subkonfluent gewachsenen Zellrasen 200 µl Lysepuffer gegeben und die Schalen sofort auf Eis gestellt.

Lysepuffer:	20 mM	Tris-HCl, pH 7,2
	1 % (v/v)	Triton X-100
	1 Tablette	Complete Mini (Roche Molecular Biochemicals)

Mit Hilfe eines Schabers wurden die Zelltrümmer vom Boden gelöst und anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden weitere 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Unlösliche Fragmente wurden durch Zentrifugation bei 14000 rpm, 4°C für 30 Minuten abgetrennt. Die Lysate

Die Membran wurde über Nacht in Blockierungslösung (5% *Blocking solution* in TBST) gelegt, anschließend zwei Stunden mit entsprechendem Erstantikörper und nach dreimaligem Waschen für 10 Minuten in TBST mit dem Zweitantikörper (halbe bis eine Stunde) inkubiert. Der Blot wurde dreimal 15 Minuten in TBST gewaschen und zur Detektion entweder *Lumi-Light Western Blotting Substrate* (POD) oder *CDP-Star* (AP) (beides Roche Molecular Biochemicals) eingesetzt.

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Zellkulturführung

Alle Zellen und Zelllinien wurden im angegebenen Medium bei 37°C, 5% CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Hatten die Zellen etwa 80 % konfluente Zellrasen gebildet wurden sie mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst. Ein Teil der Zellen wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit frischem Medium versorgt.

Zum Einfrieren der Zellen wurden jeweils 2×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (Medium + 10 % FKS) resuspendiert und in Kryoröhrchen in einem Styroporbehälter bei -80°C eingefroren. Danach wurden die Zellen zur Lagerung in einen Stickstofftank (-192°C) gegeben.

2.3.2. Transfektion eukaryontischer Zellen mittels Calciumphosphat (Wigler, 1977)

Die zu transfizierenden Zellen wurden in Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht inkubiert. Vier Stunden vor Transfektion wurde das Medium gewechselt.

In einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden 10 µg DNA mit 18 µl 2 M CaCl₂ und sterilem Wasser auf ein Endvolumen von 150 µl gemischt. Diese Lösung wurde vorsichtig tropfenweise in ein zweites Reaktionsgefäß mit 150 µl 2 x HBS pipettiert.

2 x HBS:	NaCl	8,0 g	
	KCl	0,38 g	
	Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	0,19 g	
	Glucose	1,0 g	
	Hepes	5,0 g	pH 7,05
	ad. 500 ml H ₂ O		

Dabei wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette vorsichtig Luft in das Gemisch geblasen, so daß ein feines Präzipitat entstand. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lösung tropfenweise auf die Zellen gegeben, diese über Nacht inkubiert und am nächsten Tag nach einem Waschschritt mit PBS mit neuem Medium versorgt.

2.3.3. Transfektion eukaryontischer Zellen mittels FuGene

Die zu transfizierenden Zellen wurden einen Tag vor Transfektion ausgesät, so daß sie dann etwa 50 % konfluente Zellrasen bildeten.

Für eine Transfektion von Zellen in 35-mm-Zellkulturschalen wurden 96 µl serumfreies Medium mit 4 µl FuGene gemischt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich tropfenweise zu 2 µg Plasmid-DNS gegeben. Die Mischung wurde weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich auf die Zellen pipettiert. Wurden größere oder kleinere Zellkulturschalen verwendet, so wurden die Menge der DNS und die Volumina der Lösungen entsprechend angepaßt. Die Transfektion wurde mit Hilfe eines GFP-Expressionsvektors kontrolliert.

2.3.4. Isolierung stabil transfizierter Klone

Sollten stabil transfizierte Klone isoliert werden, so wurden die Zellen 16 Stunden nach der Transfektion aus den 35-mm-Schalen gelöst und in verschiedenen Verdünnungen in 10-cm-Schalen ausgesät. Nach einem weiteren Tag wurde das Medium gegen Selektionsmedium ausgetauscht. Das Medium wurde dann zum Entfernen abgestorbener Zellen regelmäßig gewechselt. Waren nach etwa zwei bis drei Wochen gut gewachsene Einzelkolonien zu sehen, wurde diese mit Hilfe von Klonierungszyklindern vereinzelt. Dazu wurden die Zellen auf den Schalen vorsichtig ein mal mit PBS gewaschen und über einzelne Klone die Zylinder gesetzt. Die Zellen wurden mit einem Tropfen Trypsin-EDTA abgelöst und in eine 96- oder 48- Lochplatte transferiert.

2.3.5. MTT- und WST-Test

Mit Hilfe des MTT- und WST-Tests besteht die Möglichkeit Zellzahlen indirekt zu bestimmen. Von den Zellen werden dabei die Farbsubstrate MTT bzw. WST-1 von mitochondrialen Dehydrogenasen zu Formazan bzw. Formazanderivaten umgesetzt. Der Unterschied der beiden Tests besteht darin, daß das ausgehend von WST-1 gebildete Formazanderivat löslich ist, während das aus MTT gebildete Formazan kristallisiert und somit gelöst werden muß.

In beide Tests wurden fertige Substratlösungen (*Cell Proliferation Reagent WST-1*, *Cell Proliferation Reagent MTT*) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte wie vom Hersteller beschrieben, mit der Ausnahme, daß die Formazankristalle in Isopropanol gelöst wurden.

2.3.6. lacZ-Test

Zur Bestimmung *lacZ*-transfizierter Zellen wurden etwa 2×10^4 Zellen in einer Mikrotiterplatte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium entfernt und zu den Zellen 100 μ l β -Gal-Substratlösung gegeben:

β -Gal-Substratlösung:	3,29 mM	CPRG (Chlorphenolrot- β -D-galaktopyranosid)
	100 mM	HEPES
	150 mM	NaCl
	2 mM	MgCl ₂
	1 % (w/v)	BSA
	0,1 % (v/v)	Triton-X-100
	0,1 % (w/v)	Natriumazid
		pH 7,0

Die Ansätze wurden 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend die Absorption bei 550 nm in einem *ELISA-Reader* gemessen.

2.3.7. Bestimmung der Generationszeiten

Die Generationszeiten wurden durch Erstellen von Wachstumskurven mit Hilfe des WST-Tests (*Cell Proliferation Reagent WST-1*, Roche Molecular Biochemicals) ermittelt. WST-1 ist ein Farbsubstrat, welches von mitochondrialen Dehydrogenasen zu einem Formazanderivat umgesetzt wird und somit die indirekte Bestimmung von Zellzahlen ermöglicht.

Zum Erstellen der Wachstumskurven wurden in einer 96-Lochplatte jeweils 2000 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Insgesamt wurden die Zellen in fünf Mikrotiterplatten pipettiert. Sofort nachdem Aussäen der Zellen, sowie nach 24, 48, 96 und 120 Stunden wurde ein WST-Test wie vom Hersteller angegeben durchgeführt. Nach Zugabe des Substrats WST-1 wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend im *ELISA-Reader* die Absorption bei 440 nm gemessen.

Die bestimmten Absorptionswerte wurden logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen und aus den daraus resultierenden Wachstumskurven die Generationszeit (g) mit folgender Formel berechnet:

$g = \lg 2 (t_x - t_0) / \lg A_x - \lg A_0$, wobei A_x und A_0 die Absorption zu den Zeitpunkten t_x und t_0 sind.

2.3.8. Matrigel Invasionsstest in „Transwells“ (Holst-Hansen *et al.*, 1996)

Für die *in vitro* Invasionsstests wurde ein abgewandelter „Boyden-Kammer Test“ in sogenannten *Transwells* (Costar, Cambridge, USA) durchgeführt. Diese bestanden aus einer 12-Loch-Zellkulturplatte und Filtereinsätzen, die eine Membran mit einer Porengröße von 12 μ m aufwiesen.

Zum Beschichten der Filtereinsätze wurde Matrigel in eiskaltem Medium (oder PBS) verdünnt, so daß die gewünschte Konzentration in einem Gesamtvolumen von 250 µl pro Vertiefung erreicht wurde.

Die Verdünnungen wurden luftblasenfrei auf die Membran geben und durch Klopfen gleichmäßig verteilt. Die *Transwells* mit der Matrigelschicht wurden über Nacht unter der Sterilbank zum trocknen stehen gelassen.

Am nächsten Tag wurde zum Rekonstituieren des Matrigels auf jeden Filtereinsatz 200 µl Medium gegeben, über die gesamte Oberfläche verteilt und 1 bis 2 Stunden bei 37°C (Brutschrank) inkubieren. Danach wurde in die untere Kammer (Zellkulturplatte) des *Transwells* je 1,5 ml Medium gefüllt.

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und unter Verwendung von 0,4 % EDTA, 0,1 % BSA vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Zum Sedimentieren wurden die Zellen in 15-ml-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal gewaschen, in einer adäquaten Menge Medium resuspendiert und 1 bis 2×10^5 Zellen pro Filter ausgesät. Die Ansätze wurden für 24 bzw. 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Im Anschluß wurde zur Quantifizierung der gewanderten Zellen für die obere „Kammer“ (Filtereinsatz) und die untere „Kammer“ (Platte) ein MTT-Test durchgeführt. Dazu wurden 150 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) in die untere Kammer und 50 µl in die obere Kammer pipettiert, so daß eine Endkonzentration von 0,5 µg/ml entstand. Die *Transwells* wurden für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die an der oberen und unteren Membran gebildeten Formazankristalle zusammen mit dem Medium der entsprechenden Kammer in separate 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 14000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Die Formazankristalle wurden in je 500 µl Isopropanol durch Schütteln gelöst und jeweils 200 µl davon in eine Mikrotiterplatte überführt. Die Absorption wurde bei 570 nm (550nm) (Referenzfilter 690 nm) in einem *ELISA-Reader* gemessen. Nach Abzug des Absortionswertes einer Hintergrundkontrolle (Ansatz ohne Zellen) wurde die Invasionsfähigkeit der Zellen als „% Invasion“ wie folgt berechnet:

$$\% \text{ Invasion} = \frac{A_{570} (\text{obere Kammer})}{A_{570} (\text{obere Kammer}) + A_{570} (\text{untere Kammer})}$$

2.3.9. Adhäsionstest

Die verschiedenen zu testenden Substrate wurden bis zur gewünschten Konzentration in PBS verdünnt, 50 µl davon in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben und zur Beschichtung bei 37°C im Brutschrank für etwa eine Stunde inkubiert. Danach wurden die Vertiefungen durch Zugabe von 100 µl 3 % BSA in PBS blockiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen.

Die Zellen wurden inzwischen mittels 0,4 % EDTA, 0,1% BSA vom Flaschenboden gelöst und in einem Röhrchen zweimal mit 0,1 % BSA in Medium gewaschen. Die Zellen wurden gezählt, in 0,1 % BSA/Medium in einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml resuspendiert und unter leichtem Schütteln für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden pro beschichtete Vertiefung $2,5 \times 10^4$ Zellen ausgesät und zur Adhäsion für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die nicht adhären Zellen sofort mit dem Medium von der Platte abgegossen, die Vertiefungen zweimal vorsichtig mit 0,1 % BSA/Medium gewaschen und die Zahl der angehafteten Zellen unter Verwendung des WST-Tests ermittelt. Eine zweite Platte, in die parallel dieselben Zellen eingesät worden waren, diente dabei zur Bestimmung der Ausgangszellzahl im WST-Test. Die Zellen wurden eine bis drei Stunden mit dem Substrat (10 μl WST-1 in 100 μl 0,1 % BSA/Medium) inkubiert und die Absorption des gebildeten Formazanderivats bei 450 nm im *ELISA-Reader* gemessen. Die Adhäsionsfähigkeit an ein bestimmtes Substrat wurde in % Adhäsion wie folgt berechnet:

$$\% \text{ Adhäsion} = \frac{A_{450} (\text{adherierte Zellen})}{A_{450} (\text{ingesäte Zellen})} \times 100$$

2.3.10. Test auf Zellmorphologie im Matrigel

Eine Korrelation für die Invasionsfähigkeit von Brusttumorzelllinien mit der Morphologie der Zellen in einem Matrigelbett wurde von Sommers *et al.*, 1994 beschrieben.

Zur Untersuchung dieser Morphologie wurden Mikrotiterplatten mit einer dünnen Schicht Matrigel beschichtet. Die zu untersuchenden Zellen wurden geerntet und gut in Matrigel/Medium, 20 % FKS (50 : 50) resuspendiert. 2×10^3 Zellen wurden anschließend pro Vertiefung ausgesät, bei 37°C , 5 % CO_2 inkubiert und das Wachstum der Kolonien beobachtet. Nach sechs und zwölf Tagen wurden repräsentative Kolonien fotografiert.

2.3.11. Immunfluoreszenz

Der Nachweis der Expression von PAP-Protein erfolgte nach der Transfektion von Zellen mittels Immunfluoreszenz.

5×10^4 Zellen wurden pro Vertiefung auf einem Objektträger mit vier aufgesetzten Kammern ausgesät und am darauffolgenden Tag transfiziert.

24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellrasen zwei mal mit PBS gewaschen und anschließend für 15 bis 20 Minuten mit 2 % (w/v) Paraformaldehyd (in PBS) fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde auf die Zellen vorsichtig eine eiskalte Methanol/Aceton-Lösung (50/50) gegeben und die Ansätze für 10 Minuten bei -20°C stehen gelassen. Die Methanol/Aceton-Lösung wurde durch Trocknen vollständig entfernt.

Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurden die Zellrasen mit 50% FKS (in PBS) bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. HA-spezifische Antikörper (Anti-HA *High Affinity*) wurden 1:500 in 10% FKS verdünnt, auf die Zellen gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 Minuten wurde eine 1:500 –Verdünnung von Anti-Ratte IgG-Cy3 in 10% FKS für 30 Minuten bei 37°C zu den Zellen gegeben. Der Zellrasen wurde dreimal mit PBS gewaschen, anschließend die Zellkerne für 5 Minuten mit DAPI-Lösung (1µg/ml in PBS) gefärbt und noch einmal mit PBS gewaschen. Ein Deckgläschen wurde mit Moviol-Lösung auf den Objektträger gedrückt und mit Nagellack fixiert.

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop bei einer Absorptions-/Emissionswellenlänge von 550/ 570 nm und einer 100-fachen Vergrößerung.

2.3.12. Zellzyklusarrest durch Serumentzug

Zur Induktion eines Wachstumsarrests in der G1-Phase des Zellzyklus wurden die zu untersuchenden Zellen in 60-mm-Schalen in serumhaltigem Medium ausgesät und am darauffolgenden Tag bei 50 % konfluentem Zellrasen nach zweimaligem Waschen mit PBS auf Medium mit 0,1 % FKS gesetzt. Die normalen humanen Mammaepithelzellen (HMEC) wurden statt dessen zur Arretierung in MEC Basalmedium (MEBM, BioWhittacker), ohne Wachstumsfaktoren, kultiviert. Nach 48 bis 72 Stunden wurde der G1-Arrest mittels durchflußzytometrischer Analyse kontrolliert und für Expressionsstudien aus den Zellen Gesamt-RNA isoliert.

2.3.13. Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)

Zur Zellzyklusanalyse bzw. Messung der GFP-Expression wurden die Durchflußzytometer FACStar plus bzw. FACScan von Becton Dickinson verwendet.

Zur Messung des Zellzyklus wurde ein Färbung mit dem Fluorochrom Propidiumiodid (PI) durchgeführt.

1×10^6 Zellen wurden bei 900 rpm zentrifugiert und anschließend in 1 ml DNA-Färbepuffer mit 20 µg/ml Propidiumiodid und 500 U/ml RNase A (2,5 U/µl) resuspendiert.

DNA-Färbepuffer:	100 mM	Tris-HCl	pH 7,4
	154 mM	NaCl	
	1 mM	CaCl ₂	
	0,5 mM	MgCl ₂	
	0,2 % (w/v)	BSA	
	0,1 % (v/v)	NP40	

Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 4°C zum Färben stehen gelassen. Die Zellzyklusverteilung wurde anschließend im Durchflußzytometer mit einer Anregungswellenlänge von 352 nm bei 50 mV gemessen und in einem „*histogram plot*“ der Anteil der Zellen in G1-, S- und G2/M-Phase analysiert.

Zur Quantifizierung GFP-positiver Zellen nach einer Transfektion wurden 1×10^6 Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und zur Gegenfärbung toter Zellen 1 µg/ml Propidiumiodid zugegeben. Die Messung der GFP-Fluoreszenz erfolgte bei 488 nm und 100 mW, die der PI-Fluoreszenz bei 352 nm, 50 mW. Tote Zellen wurden anschließend ausgegrenzt und der Anteil der GFP-positiven Zellen bestimmt.

Ergebnisse

1. Expressionsstudien zum „Progressions-assoziierten Protein“ (PAP) in *Northern Blots*

Beim Vergleich der Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MCF-7_{ADR}, war das „Progressions-assoziierte Protein“ (PAP) 1996 als bis dato unbekanntes Gen identifiziert worden (Schiemann *et al.*, 1997). In dieser Arbeit sollten deshalb zunächst weiterführende Expressionsanalysen zum Vorkommen des Transkripts in verschiedenen humanen Geweben ausgeführt werden.

1.1. Expression von PAP in normalen humanen Geweben

Die Expression von PAP wurde mittels *Northern Blot* in verschiedenen normalen humanen Geweben untersucht. Dazu wurden entweder aus verschiedenen Geweben stammende PolyA⁺ RNS mittels *Northern Blot* wie beschrieben auf einer Membran immobilisiert oder bereits fertige „*Multiple Tissue Northern Blots*“ verwendet. Die *Blots* wurden mit einer Digoxigenin(DIG)-markierten PAP-spezifischen Sonde aus dem 3' untranslatierten Bereich (*untranslated region*, UTR) hybridisiert.

Abbildung 5 zeigt das Ergebnis des *Northern Blots* mit PolyA⁺ RNS aus unterschiedlichen normalen Geweben. Das 2,8 kb große PAP-Transkript konnte in den Organen Leber (Spur b), Milz (Spur d), Gehirn (Spur h) sowie in peripheren Blutlymphozyten (ohne Abbildung) nicht nachgewiesen werden.

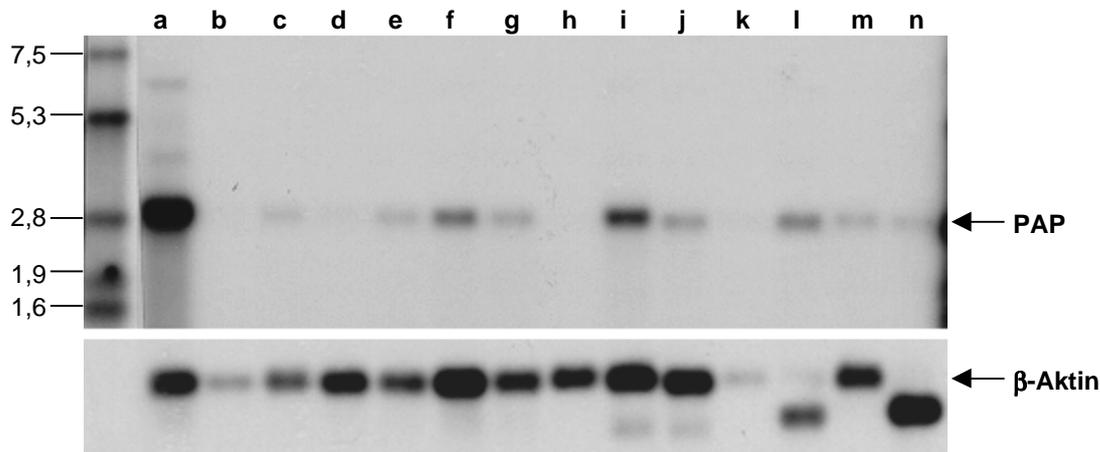


Abbildung 5: *Northern Blot* zur Untersuchung der PAP-Expression in normalen humanen Geweben. Pro Spur wurden 2 µg PolyA⁺ RNS aufgetragen und der *Northern Blot* mit einer DIG-markierten PAP spezifischen Sonde aus dem 3' UTR hybridisiert. Untersucht wurden folgende Gewebe: Brustdrüse (a), Leber (b), Testis (c), Milz (d), Plazenta (e), Lunge (f), Niere (g), Gehirn (h), Magen (i), Dünndarm (j), Pankreas (k), Herz (l), Thymus (m), Skelettmuskel (n). Zur Kontrolle der RNS-Menge wurde der *Blot* mit einer β-Aktin-spezifischen Sonde hybridisiert. Als Größenstandard diente der „RNA molecular weight marker II, DIG-labeled“ (Roche Molecular Biochemicals).

Sehr niedrige mRNA-Spiegel wurden in Testis (Spur c), Plazenta (Spur e), Niere (Spur g), Dünndarm (Spur j), Thymus (Spur m) und Skelettmuskel (Spur n) festgestellt, eine dagegen starke Expression in Lunge (Spur f), Magen (Spur i), und Herz (Spur l). Auffallend war eine sehr starke Abundanz des Transkripts für PAP in normalem Brustdrüsengewebe (Spur a). Der *Blot* zeigte das breite Spektrum der PAP-exprimierenden Gewebe und bestätigte, daß PAP weder in Gehirn, noch in peripheren Blutleukozyten transkribiert wird.

Ein „*Multiple Tissue Northern Blot*“, auf dem RNS aus verschiedenen Bereichen des Zentralnervensystems (ZNS) aufgetragen waren, zeigte noch einmal deutlich die niedrige Expression in allen Teilen des Gehirns (Abbildung 6): Kleinhirn, Endhirnrinde, Endhirnlappen und Putamen zeigten kein spezifisches Transkript, allerdings war eine schwache Expression von PAP im Nachhirn (Spur c) und eine starke Expression im sich anatomisch anschließenden Rückenmark (Spur d) nachweisbar. PAP wies also eine differenzierte Expression in Organen des ZNS auf, da es in allen Teilen des Endhirns nicht detektierbar war, wohl aber im Rückenmark.

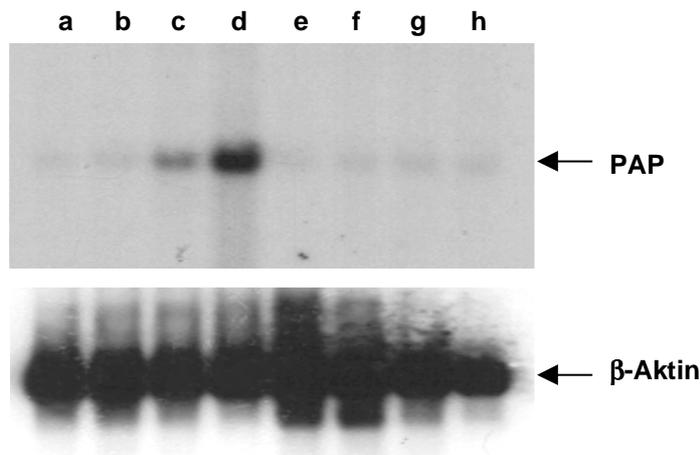


Abbildung 6.: Northern Blot zur Untersuchung der PAP-Expression in Teilbereichen des Zentralnervensystems. Untersucht wurden: Kleinhirn (a); Großhirnrinde (b); Nachhirn (c); Rückenmark (d); Endhirn, Hinterhauptlappen (e); Endhirn, Stirnlappen (f); Endhirn, Schläfenlappen (g); Putamen (h). Zur Kontrolle der RNS-Menge wurde der Blot mit einer β -Aktin-spezifischen Sonde hybridisiert.

1.2. Expression von PAP in humanen Tumorgeweben

Eine Möglichkeit Transkriptspiegel in normalem gesundem Gewebe mit dem in Tumorgewebe vergleichen zu können, bieten „Northern Territory Blots“ (Invitrogen). Diese Northern Blots enthalten jeweils RNS einer Normalgewebeprobe und einer Tumorprobe von vier Patienten.

Abbildung 7A zeigt das Ergebnis eines Blots der die PAP-Expression in Proben von vier Mammakarzinom-Patientinnen zeigt. Patientin 1 (Spur 1 und 2) zeigte eine stärkere PAP-Expression im Normalgewebe verglichen mit dem Tumorgewebe. Alle anderen Proben zeigten keine auffälligen Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe.

Ein weiterer Blot repräsentierte Biopsien aus Patienten mit Kolonkarzinom. Zwei Patienten (Abb. 7B Spur 3-6) wiesen eine schwächere PAP-Expression in den Tumoren verglichen zum gesunden Gewebe auf. Die zwei anderen Patienten zeigten hingegen keine Differenz zwischen Normal- und Tumorprobe. Auffällig war allerdings ein Unterschied im individuellen Expressionslevel für PAP. Patient eins (Abb. 7B, Spur 1 und 2) zeigte eine wesentlich stärkere Expression als die anderen Patienten.

Somit zeigte sich aber weder für Mammakarzinome noch für Kolonkarzinome eine Korrelation der PAP-Transkription mit dem Tumorgewebe.

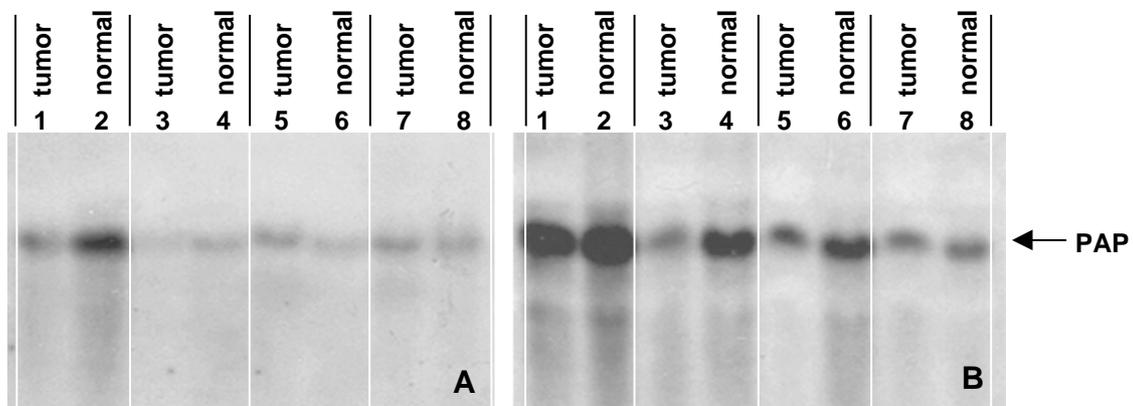


Abbildung 7 A&B: Northern-Blots zur Untersuchung der PAP-Expression in Tumorbiopsien und Normalgewebe. „Northern Territory Blots“ enthielten 20 µg Gesamt-RNS pro Spur aus humanen Normal- und Tumorgeweben von jeweils vier Patienten. Die Blots wurden mit einer DIG-markierten PAP-Sonde hybridisiert. Blot A: Mammakarzinome; Blot B: Kolonkarzinome.

Die folgenden zwei *Northern Blots* (Abbildung 7 C und D) repräsentieren Proben von Patienten mit Tumoren des Gehirns. Dabei wurde auf dem ersten *Blot* nicht differenziert, um welche Art von Hirntumor es sich handelte. Es wird jedoch ersichtlich, daß in zwei der vier Patientenproben (Spur 5 und 7) eine Expression von PAP in den Tumorproben nachzuweisen war, während von allen Patienten die Normalgewebeproben negativ waren. Auf *Blot D* konnte auch in zwei Normalgewebebiopsien von Patienten mit einem Gliom bzw. einem Meningiom (Spur 2 und 4) eine leichte PAP-Expression nachgewiesen werden, jedoch zeigte Patient 2 eine höhere Expression im Tumor (Spur3). Patient 3 (Meningiom) und 4 (malignes Lymphom des ZNS) wiesen keine PAP-Expression in den Normalgeweben (Spur 6 und 8), wohl aber in den Tumorproben (Spur 5 und 7), auf.

Fünf von acht untersuchten Patienten mit Gehirntumoren zeigten also eine deutlich erhöhte Abundanz der PAP mRNA im malignen im Vergleich zum gesunden Gewebe, woraus für Strukturen des Gehirns eine Korrelation der PAP-Expression mit der Bildung von Tumoren geschlossen werden könnte.

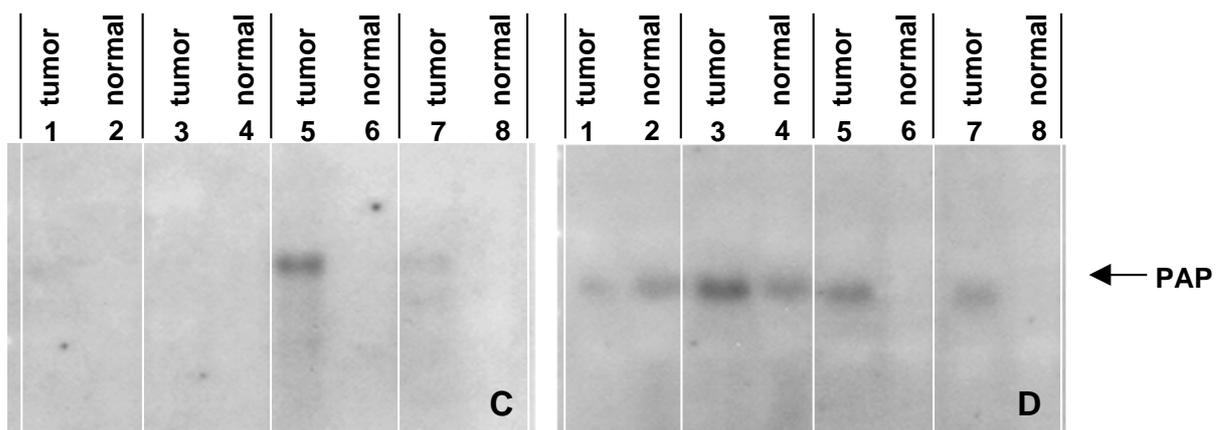


Abbildung 7 C&D: Northern-Blots zur Untersuchung der PAP-Expression in Tumorbiopsien und Normalgewebe. „Northern Territory Blots“ enthielten 20 µg Gesamt-RNS pro Spur aus humanen Normal- und Tumorgeweben von jeweils vier Patienten. Die Blots wurden mit einer DIG-markierten PAP-Sonde hybridisiert. Blot C & D: Gehirntumore. Spur D1: Gliom; Spur D3: Meningiom; Spur D5: Meningiom; Spur D7: malignes Lymphom des ZNS.

1.3. Expression von PAP in humanen Zelllinien

1.3.1. „Multiple Tissue Northern Blot“

Eine Reihe von Tumorzelllinien wurde mittels eines „Multiple Tissue Northern Blots“ (Clontech) untersucht. Abbildung 8 zeigt das Ergebnis dieses Blots nach Hybridisierung mit einer PAP-spezifischen Sonde. Hohe Expressionsniveaus von PAP wurden in der Zelllinie SW480 eines kolorektalen Adenokarzinoms und in der Melanomzelllinie G361 gefunden. Keine PAP-spezifische RNS war in einer Reihe von Zelllinien zu finden, die sich aus Tumoren des blutbildenden Systems ableiten: in der promyeloischen Leukämie-Zelllinie HL-60, der Linie K-562 aus einer chronischen myelogenen Leukämie, MOLT-4 aus lymphoblastischer Leukämie und der Burkitt's Lymphomzelllinie Raji. Darüber hinaus wiesen zwei Zelllinien epithelialen Ursprungs, nämlich HeLa S3 aus Zervixkarzinom und A549 aus Lungenkarzinom, keine PAP-Expression auf.

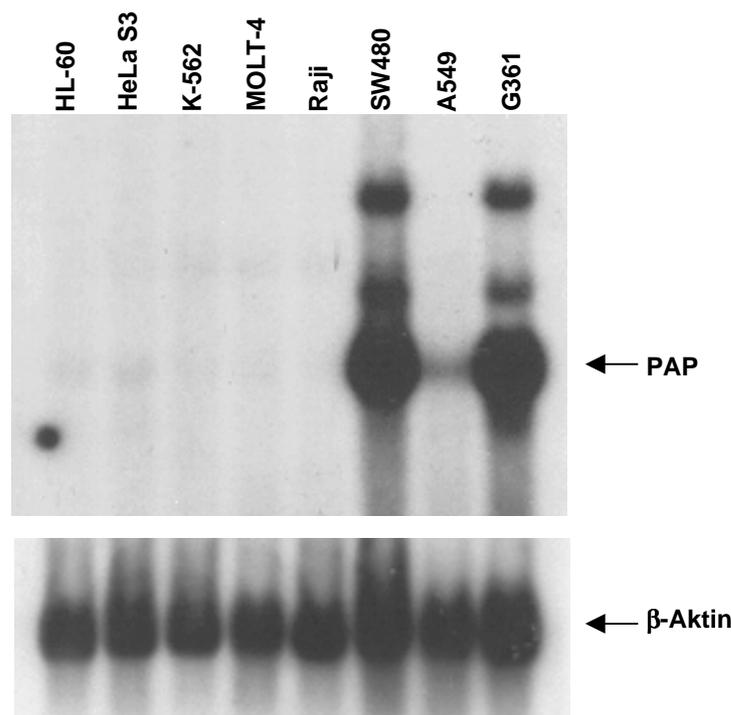


Abbildung 8: Northern Blot zur Analyse der PAP-Expression in verschiedenen humanen Zelllinien. Jede Spur enthielt 2 µg PolyA⁺-RNS aus verschiedenen Zelllinien. HL-60: promyeloische Leukämie; HeLa S3: Zervixkarzinom; K-562: chronische myeloische Leukämie; MOLT-4: lymphoblastische Leukämie; Raji: Burkitt's Lymphom; SW480: Kolorektales Adenokarzinom; A549: Lungenkarzinom; G361: Melanom. Die aufgetragene RNS-Menge wurde mit einer β-Aktin-spezifischen Sonde überprüft.

1.3.2. Expression von PAP in humanen Mammakarzinom-Zelllinien

Bei der Untersuchung des beschriebenen Modellsystems für die Progression des Mammakarzinoms konnten PAP-spezifische Transkripte lediglich in der invasiven Zelllinie MCF-7_{ADR} nachgewiesen werden, nicht aber in der nicht invasiven Zelllinie MCF-7 (Schiemann *et al.*, 1997). Daraus resultierte die Hypothese, daß die PAP-Expression mit der Invasionsfähigkeit von Tumorzellen korreliert.

In dieser Arbeit wurden nun weitere humane Mammakarzinomzelllinien mit unterschiedlichem Invasionsverhalten bezüglich ihrer PAP-Expression untersucht. Von diesen Zelllinien war bekannt, welchen Status der Expression sie hinsichtlich des Östrogenrezeptors als auch des Filamentproteins Vimentin aufwiesen. Darüber hinaus waren diese Zellen auch auf den Grad der Invasion in verschiedenen Invasionstests *in vitro* und in Nacktmäusen untersucht worden (Thompson *et al.*, 1992). Eine Übersicht über die Phänotypen der einzelnen Zelllinien ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Zelllinie	Tumorart	Herkunft	ER	VIM	Morphologie im Matrigel	Aktivität in Boydenkammer Invasionsstest	Nacktmaus
MCF-7	IDAC	Pleurale Effusion	+	-	kugelförmige Kolonie (nicht-invasiv)	++	Primärtumor
MCF-7 _{ADR}		MCF-7	-	+	invasive Kolonieform	+++	lokale Invasion *
MDA-MB-231	AC	Pleurale Effusion	-	+	invasive Kolonieform	+++++	lokale Invasion
MDA-MB-435	IDAC	Pleurale Effusion	-	+	invasive Kolonieform	+++	lokale Invasion
MDA-MB-436	AC	Pleurale Effusion	-	+	invasive Kolonieform	+++	lokale Invasion
ZR-75-1	IDAC	Ascites	+	-	kugelförmige Kolonie (nicht-invasiv)	+	Primärtumor
T47D	IDAC	Pleurale Effusion	+	-	kugelförmige Kolonie (nicht-invasiv)	+	nicht-tumorigen
Hs578T	CS	Primärtumor	-	+	invasive Kolonieform	+++++	Lungen-Metastasen

Tabelle 1: Mammakarzinom-Zelllinien mit unterschiedlichem Invasionspotential. Abkürzungen: IDAC: Infiltrierendes duktales Adenokarzinom; AC: Adenokarzinom; CS: Karzinosarkom; ER: Östrogenrezeptor; VIM: Vimentin. Die hier aufgelisteten Zelllinien wurden im Northern Blot auf PAP-Expression untersucht.

Entnommen aus Thompson *et al.* (1992) und persönliche Mitteilung N. Brünner, Finsenlabor, Kopenhagen (*).

Aus allen Zelllinien wurde Gesamt-RNS isoliert, ein *Northern Blot* durchgeführt und dieser mit einer PAP-spezifischen Sonde aus dem 3'UTR hybridisiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 9 dargestellt. Außer in der Zelllinie MCF-7_{ADR} wurde das Transkript von PAP ebenfalls in der stark metastasierenden Zelllinie Hs578T detektiert. Diese Zelllinie verhält sich in der Nacktmaus äußerst aggressiv und führt nach Ausbreitung über die Blutbahn schnell zu Metastasen in der Lunge. Auch die metastasierenden Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-435 und MDA-MB-436, die sowohl deutliche Invasion in Boyden-Kammer- und in Matrigelwachstumstests aufweisen und auch in Nacktmäusen zur Metastasenbildung in visceralen Organen führen, zeigten eine deutliche Expression von PAP.

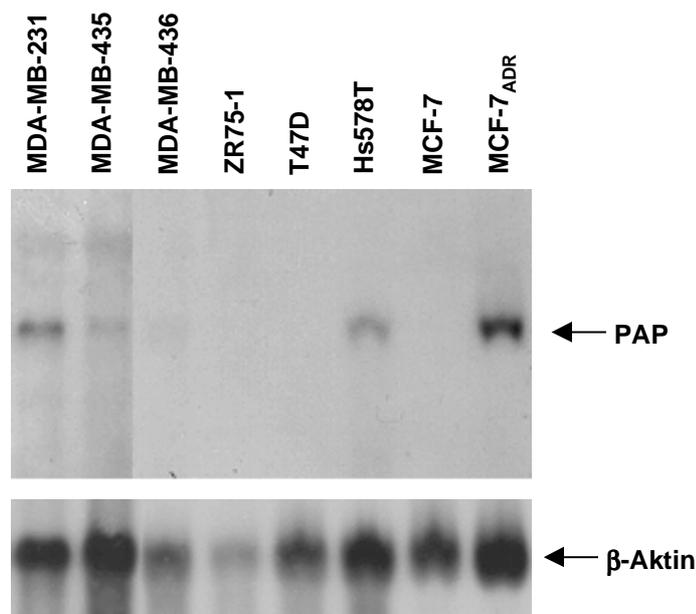


Abbildung 9: Northern Blot zur Untersuchung der PAP-Expression in Mammakarzinomzelllinien mit unterschiedlichem Invasionspotential. Mit jeweils 15 μg Gesamt-RNS wurde ein Northern Blot durchgeführt und mit einer DIG-markierten PAP-spezifischen Sonde hybridisiert. **Invasive Zelllinien:** Hs578T, MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-436, MCF-7_{ADR}; **nicht invasive Zelllinien:** ZR75-1, T47D und MCF-7. Zur Überprüfung der RNS-Menge wurde der Blot zusätzlich mit einer β -Aktin-spezifischen Sonde hybridisiert.

In den nicht-metastasierenden östrogenabhängigen Zelllinien MCF-7 und ZR-75-1, sowie in der nicht tumorigenen Zelllinie T47D konnte hingegen keine PAP-mRNS nachgewiesen werden.

Somit korrelierte in den Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-436 und Hs578T die Expression von PAP mit der Metastasierungsfähigkeit in Nacktmäusen und der Invasionsfähigkeit in *in-vitro*-Invasionstests.

Die Zelllinie MCF-7_{ADR}, die im Modell als östrogenunabhängige vimentinpositive Zelllinie die progressive Form einer metastasierungsfähigen Zelle darstellt, weist in *in-vitro*-Tests eine starke Wanderungsfähigkeit durch Matrigel in der Boyden-Kammer als auch eine Morphologie in einer Matrigel-Matrix auf, die einem invasiven Phänotyp entspricht (Sommers *et al.*, 1991). Auch konnte schon für diese Zelllinie eine Metastasierungsfähigkeit in der Nacktmaus gezeigt werden (persönliche Mitteilung Nils Brüner, Finsenlabor, Kopenhagen).

Somit stellte sich die Frage, ob die Expression von PAP eine entscheidende und dominante Rolle beim Übergang einer Zelle in einen invasiven und metastasierenden Phänotyp spielt. Da sich die Zelllinie MCF-7_{ADR} von MCF-7 direkt ableitet und somit denselben Ursprung hat, sollte es in der Zelllinie MCF-7 möglich sein, notwendige Regulations- und Expressionswege zu reaktivieren oder zu unterdrücken, die für die Ausbildung des beschriebenen Phänotyps von MCF-7_{ADR} notwendig wären.

Das Ziel der weiteren Experimente war es deshalb eine konstitutive und stabile Expression von PAP in der Zelllinie MCF-7 zu erreichen und die daraus etablierten Transfektanten auf ihre Invasionsfähigkeit (*in vitro* und *in vivo*) zu untersuchen.

2. Zellbiologische Untersuchungen zu PAP in Transfektionsstudien

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluß eine transgene Expression von PAP auf den Phänotyp der Zelllinie MCF-7 hat. Dazu sollte nach der Herstellung entsprechender Expressionsvektoren die biologische Funktionalität der PAP-cDNS verifiziert werden, um diese anschließend zur Transfektion von MCF-7 und zur Etablierung von PAP-exprimierenden Klonen zu nutzen.

2.1. Konstruktion verschiedener Expressionsvektoren

Zur Herstellung dieser PAP-Klone mußte die PAP-cDNS zuerst in Expressionsvektoren kloniert werden. Der Teil der PAP-cDNS von Nukleotid 1 bis 1068 stand dafür zur Verfügung. Dieser Abschnitt der cDNS enthielt den vollständigen 5' untranslatierten Bereich (UTR), den kompletten offenen Leserahmen und etwa 370 Nukleotide der 3' untranslatierten Region. Diese DNS war in den pCRII-Vektor kloniert worden (Schiemann, 1997) und konnte über eine 5'-liegende Schnittstelle für *BamH* I und eine 3'-liegende Schnittstelle für *EcoR* V aus dem Vektor geschnitten werden. Dieses Fragment wurde isoliert und über die überhängenden Enden in die Vektoren pcDNA3, pZeoSV2 und pTarget ligiert. Die Plasmide wurden pPAP3 (in pcDNA3), pPAP9 (in pZeoSV2) und pPAP10 (in pTarget) genannt (Abbildung 10).

In den Vektor pIRESneo wurde derselbe Abschnitt der PAP-cDNS über zwei Schnittstellen für *EcoR* I kloniert. Das Fragment konnte ebenfalls aus dem pCRII-Vektor herausgeschnitten werden und wurde anschließend in pIRESneo ligiert. Nach Transformation wurde aus einzelnen Bakterienkolonien Plasmid-DNS isoliert und über einen Verdau mit den Restriktionsenzymen *EcoR* V und *Stu* I ein Klon mit korrekter Insertion bestimmt. Dieses Plasmid wurde im folgenden als pPAP8 bezeichnet (Abbildung 10).

2.1.1. „Epitop-Tagging“ von PAP

Um einen indirekten Nachweis des PAP-Proteins zu ermöglichen wurde eine cDNS konstruiert, die an ihrem 3'-Ende des offenen Leserahmens zusätzlich für eine Peptidsequenz aus Hämagglutinin (HA) des humanen Influenzavirus kodierte. Dazu mußte das interne Stop-Kodon der PAP-cDNS deletiert und die HA-Sequenz angehängt werden. Zudem wurden zwischen beide Sequenzen drei zusätzliche Glycin-Reste eingeführt.

Ein entsprechendes DNS-Fragment wurde mittels PCR generiert (Abbildung 11). Als *Template* diente die PAP-DNS in dem pCRII-Vektor, als 5' *Primer* wurde das Oligonukleotid T7 eingesetzt und als 3' *Primer* das Oligonukleotid papha. Dieser *Primer* enthielt Sequenzen aus dem kodierenden Bereich der

PAP-cDNS bis Nukleotid 701, daran anschließend Basen, die für drei Glycinreste kodierten und schließlich die Basen für den HA-Tag mit einem Stop-Kodon am Ende. Die *Primer* generierten zudem in der PCR an beiden Enden Schnittstellen für *EcoR* I, so daß die Fragmente nach Verdau mit diesem Restriktionsenzym über die Enden in den pcDNA3-, den pZeoSV2- und in den pTarget-Vektor kloniert werden konnten. Die Plasmide wurden dann als pPAP-HA1 (in pcDNA3) und pPAP-HA2 (in pZeoSV2) und pPAP-HA3 (in pTarget) bezeichnet.

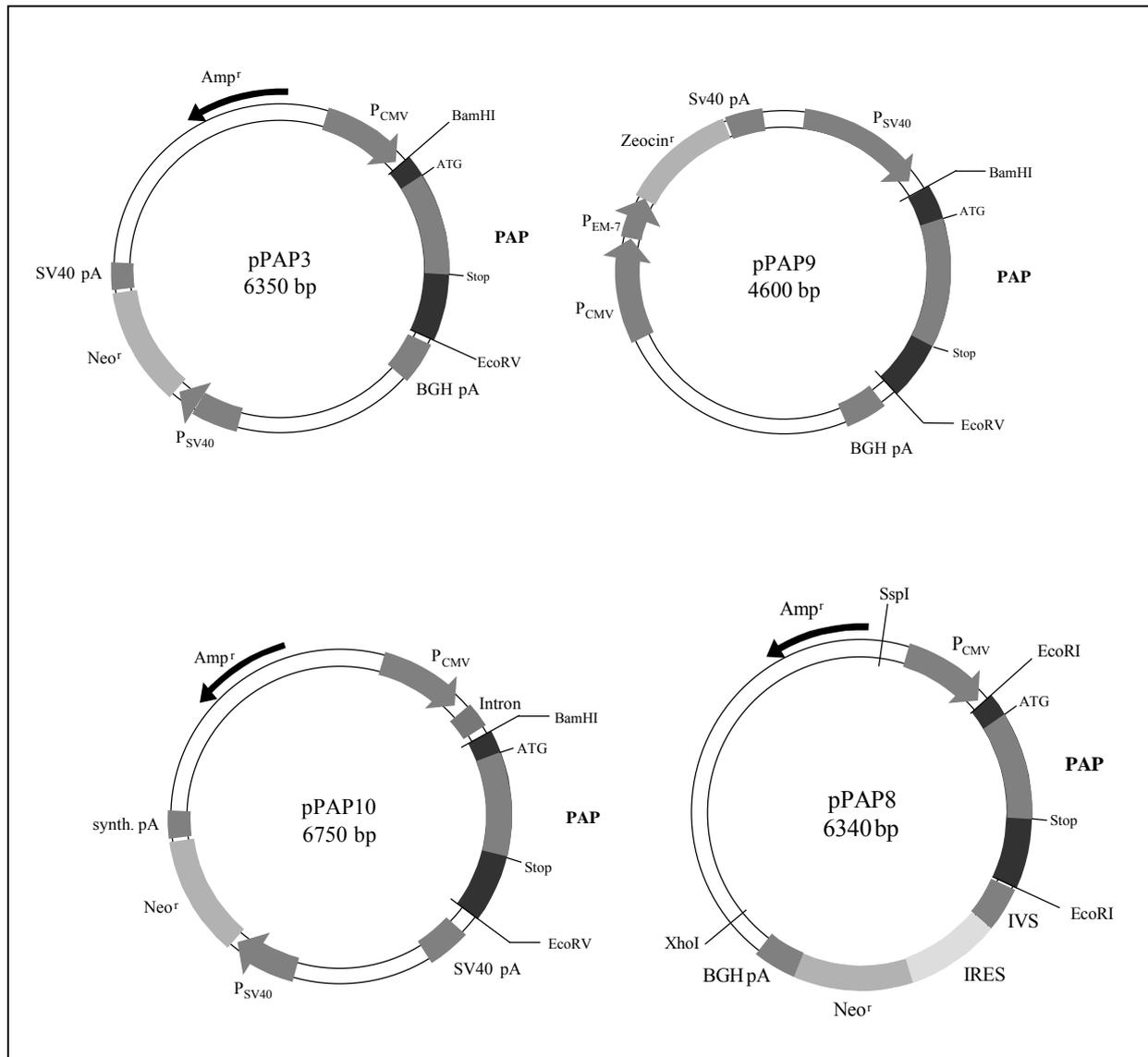


Abbildung 10: Plasmidkarten der erstellten Vektoren zur transgenen Expression von PAP in eukaryontischen Zellen. Abkürzungen: *P_{CMV}*: Cytomegalovirus immediate-early Enhancer/Promotor; *P_{SV40}*: Simian Virus early Enhancer/Promotor; *P_{EM-7}*: prokaryotischer Promotor E-7; *BGHpA*: Bovine growth hormone Polyadenylierungssignal; *SV40 pA*: SV40 Polyadenylierungssignal; *IVS*: synthetisches Intron; *IRES*: internal ribosome entry site des Encephalomyocarditis Virus (ECMV); *Neo^r*: Neomycinphosphotransferase.

1	GAATTCGGCT TAGCACTCTC CAGCCTCTCA CCGCAAAATT ACACACCCCA	
51	GTACACCAGC AGAGGAAACT TATAACCTCG GGAGGCGGGT CCTTCCCCTC	
101	AGTGCGGTCA CATACTTCCA GAAGAGCGGA CCAGGGCTGC TGCCAGCACC	
151	TGCCACTCAG AGCGCCTCTG TCGCTGGGAC CCTTCAGAAC TCTCTTTGCT	
201	CACAAGTTAC CAAAAAAAAA AGAGCCAAC	
230	ATGTTGGTATTGCTGGCTGGTATCTTTGTGGTCCACATCGCTACTGTTATT	281
1	M L V L L A G I F V V H I A T V I	17
282	ATGCTATTTGTTAGCACCATTGCCAATGTCTGGTGGTTTCCAATACGGTA	332
18	M L F V S T I A N V W L V S N T V	34
333	GATGCATCAGTAGGTCTTTGGAAAACTGTACCAACATTAGCTGCAGTGAC	383
35	D A S V G L W K N C T N I S C S D	51
384	AGCCTGTCAATGCCAGTGAAGATGCCCTCAAGACAGTGCAGGCCTTCATG	434
52	S L S Y A S E D A L K T V Q A F M	68
435	ATTCTCTCTATCATCTTCTGTGTCATTGCCCTCCTGGTCTTCGTGTTCCAG	485
69	I L S I I F C V I A L L V F V F Q	85
486	CTTTCACCATGGAGAAGGGAAACCGGTTCTTCCTCTCAGGGGCCACCACA	536
86	L F T M E K G N R F F L S G A T T	102
537	CTGGTGTGCTGGCTGTGCATTCTTGTGGGGGTGTCCATCTACACTAGTCAT	587
103	L V C W L C I L V G V S I Y T S H	119
588	TATGCGAATCGTGATGGAACGCAGTATCACCACGGCTATTCCTACATCCTG	638
120	Y A N R D G T Q Y H H G Y S Y I L	136
639	GGCTGGATCTGCTTCTGCTTCAGCTTCATCATCGGCCTTCTCTATCTGGTC	689
137	G W I C F C F S F I I G V L Y L V	153
690	CTGAGAAAGAAAGGCGGCGGCTACCCATACGACGTCCAGACTACGCTTAA	740
154	L R K K G G G Y P Y D N P D Y A *	169
741	GAATTCCTGGC	

Abbildung 11: cDNS- und Protein-Sequenz von PAP mit HA-getagtem Carboxyterminus (PAP-HA). Das DNS-Fragment wurde mit Hilfe einer PCR generiert, in der als 3'Primer ein Oligonukleotid diente, welches die komplette HA-Sequenz sowie drei Glycin-Kodons und einen Teil der PAP-Sequenz aus dem Offenen Leserahmen enthielt. In der übersetzten Aminosäuresequenz sind die Glycinreste schwarz unterlegt und der HA-Tag fett gedruckt.

Tabelle 2 gibt noch einmal eine Übersicht über die hergestellten Expressionsvektoren und zeigt die Unterschiede auf.

Name	Basisvektor	Insertion	Promotor	Intron	Transkriptgröße
pCDNA3		-	CMV	-	
pPAP3	pcDNA3	PAPcDNA ¹⁻¹⁰⁶⁸	CMV	-	ca. 1,4 kb
pPAP-HA	pcDNA3	PAP-HA	CMV	-	ca. 1,1 kb
pTarget		-	CMV	β-Globin/IgHC	
pPAP10	pTarget	PAPcDNA ¹⁻¹⁰⁶⁸	CMV	β-Globin/IgHC	ca. 2,0 kb
pPAP-HA3	pTarget	PAP-HA	CMV	β-Globin/IgHC	ca. 1,7 kb
pZeoSV2(+)		-	SV40	-	
pPAP9	pZeoSV2	PAPcDNA ¹⁻¹⁰⁶⁸	SV40	-	ca. 1,4 kb
pPAP-HA2	pZeoSV2	PAP-HA	SV40	-	ca. 1,1 kb
pIRES-neo		-	CMV	AML/IgVR	
pPAP8	pIRES-neo	PAPcDNA ¹⁻¹⁰⁶⁸	CMV	AML/IgVR	ca. 2,8 kb

Tabelle 2: Übersicht über die verschiedenen Expressionsvektoren zur transgenen Expression von PAP in eukaryontischen Zellen. Die verschiedenen Vektoren unterschieden sich in der Art des Promotors (CMV: Cytomegalovirus; SV40: Simian Virus) und in dem Vorhandensein von Intronsequenzen: chimeres Intron aus β-Globin/Immunglobulin Schwere Kette (IgHC) oder Adenovirus-major-late region (AML)/Immunglobulin Variable Region (IgVR).

Die verschiedenen eingesetzten Vektoren unterschieden sich vor allem in der Art des Promotors und dem Vorhandensein von Intronsequenzen. Der Vektor pPAP8 kodierte unter der Kontrolle des CMV-Promotors für ein bicistronisches Transkript, bestehend aus der PAP-cDNS, der Sequenz einer internen Ribosomeneintrittsstelle („*internal ribosome entry site*“, IRES) des Encephalomyocarditis Virus (ECMV) und des Selektionsmarkers Neomycinphosphotransferase (Neo^r).

2.2. Verifizierung der klonierten PAP-cDNS

2.2.1. Nachweis der PAP-Expression in transient transfizierten COS-7-Zellen im Northern Blot

COS-7-Zellen wurden in 100-mm-Zellkulturschalen ausgesät und nach 24 Stunden wie beschrieben mittels FuGene mit den entsprechenden Plasmiden (s. Tabelle 2) transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die RNS der Zellen isoliert und in einer *Northern-Blot*-Analyse untersucht. Als Sonde diente ein Digoxigenin-markiertes PCR-Produkt, das die Sequenz der PAP cDNS von nt 20 bis nt 470 enthielt, und somit einen Teil des 5' UTR und des offenen Leserahmens abdeckte. Die bislang verwendete Sonde aus dem 3' UTR konnte hier nicht eingesetzt werden, da sie einen Sequenzbereich abdeckte, der nicht in den Expressionsvektoren vorhanden war. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 12 dargestellt und zeigt, daß alle Zellen, die mit PAP-codierender cDNS transfiziert worden waren (pPAP3, pPAP-HA, pPAP10, pPAP-HA3, pPAP9 und pPAP-HA2), Transkripte von erwarteter Größe aufwiesen, wohingegen keine PAP-mRNS in den mit den Vektoren pcDNA3, pTarget und pZeoSV2(+) transfizierten Zellen nachweisbar war. Die stärkste Expression war für die Plasmide pPAP10 und pPAP-HA3 zu erkennen.

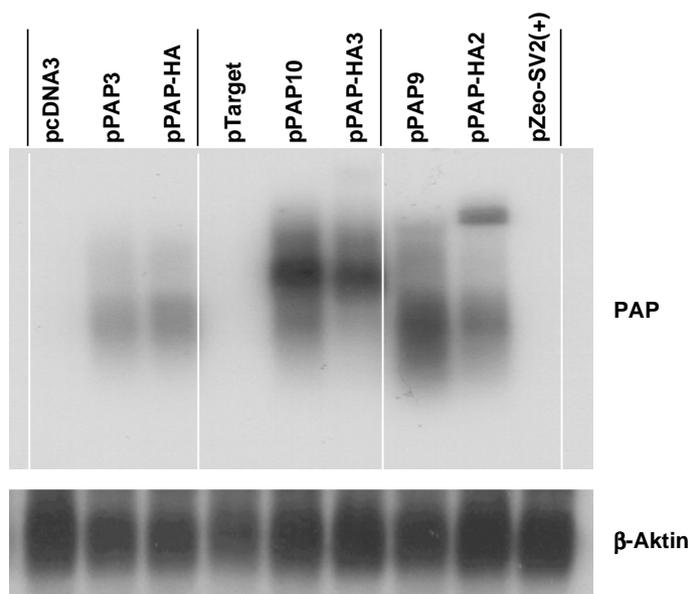


Abbildung 12: Nachweis transient exprimierter PAP-RNS im Northern Blot nach Transfektion von COS-7-Zellen. COS-7-Zellen wurden mittels FuGene mit den verschiedenen Expressionsvektoren transfiziert, nach 24 Stunden Gesamt-RNS isoliert und einer Northern-Blot-Analyse unterzogen. Dazu wurde eine PAP-spezifische Sonde aus dem Bereich des offenen Leserahmens eingesetzt sowie eine β -Aktin-spezifische Sonde zur Überprüfung der RNS-Menge.

2.2.2. Spezifischer Nachweis des Proteins

2.2.2.1. Gewinnung polyklonaler Antiseren

Um eine Möglichkeit des direkten Nachweises des PAP-Proteins zu erhalten wurden im Auftrag (Eurogentec, Seraing, Belgien) Kaninchen und Meerschweinchen mit PAP-spezifischen synthetischen Peptiden (gekoppelt an KLH) aus dem hypothetisch extrazellulären Bereich immunisiert, so daß die folgenden vier verschiedenen Antiseren zur Verfügung standen:

	Spezies	Peptid-Antigen	Position der Aminosäuren in PAP-Sequenz
Serum 46	Kaninchen	1 H ₂ N-ISCSDSLSEYASEDALK-CONH ₂	47 – 62
Serum 47	Meerschweinchen	1 H ₂ N-ISCSDSLSEYASEDALK-CONH ₂	47 – 62
Serum 48	Kaninchen	2 H ₂ N-SHYANRDGTQYHH-CONH ₂	121 – 142
Serum 49	Meerschweinchen	2 H ₂ N-SHYANRDGTQYHH-CONH ₂	121 – 142

Die Seren waren über einen *ELISA*-Test auf Peptid-spezifische Antikörper analysiert worden. Dabei hatte sich gezeigt, daß sowohl Kaninchen als auch Meerschweinchen gute IgG-Titer gegen Peptid 2 entwickelt hatten, während gegen Peptid 1 nur sehr schwache Antigenbindung im *ELISA* nachzuweisen war.

Alle Seren wurden dennoch zunächst im *Western Blot* auf das Vorhandensein PAP-spezifischer Immunglobuline getestet. Aus den Zelllinien MCF-7 und MCF-7_{ADR} sowie aus den MCF-7-Klonen IRESneo7, IRESneo11, PAP4.1. und PAP9.6. (s. Ergebnisse Kapitel 2.3.3.) wurden Zellysate hergestellt und einer SDS-PAGE unterzogen. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran mittels *Western Blot* übertragen und mit den verschiedenen Antiseren inkubiert. Nach Detektion dominierte auf allen *Blots* eine Bande, die auf der Höhe eines Proteins von etwa 30 kDa sichtbar war. Dieses Protein wurde jedoch in Proben aller Zelllinien nachgewiesen, so daß es sich hierbei nicht um PAP handeln konnte. Zudem wäre für PAP eine Bande im Bereich um 20 kDa erwartet worden (MW unglykosyliert 17,6 kDa), diese war jedoch durch keines der Seren erkennbar.

In einem weiteren *Western-Blot*-Versuch wurde untersucht, ob in den Seren Immunglobuline vorhanden waren, die das *in vitro* translatierte HA-markierte Protein (s. folgendes Kapitel) erkennen würden. In die SDS-PAGE wurde dazu Retikulozytenlysat aus einem Ansatz mit dem Vektor pZeo-SV2 (negative Kontrolle) und aus einem zweiten Ansatz mit dem Vektor pPAP-HA2 eingesetzt. Aber auch hier traten selbst bei einer sehr geringen Verdünnung nur unspezifische Banden in beiden Proben auf, nicht aber, wie erwartet worden wäre, eine Bande bei etwa 20 kDa in der pPAP-HA3 Probe.

Somit konnte im *Western Blot* nicht bestätigt werden, daß die Seren aus den Immunisierungen gegen PAP-Peptide spezifisches IgG enthielten. Dies kann zum einen daran gelegen haben, daß die Antikörper zwar die synthetischen Peptide, nicht aber das vollständige native Protein erkennen

konnten oder daß die Konzentration eventuell vorhandener IgG einfach zu gering war und eine Anreicherung dieser Antikörper über eine Affinitätschromatographie notwendig gewesen wäre.

Auch in weiteren Experimenten, die Immunpräzipitation- und Immunfluoreszenz-Versuche beinhalteten, konnte nicht gezeigt werden, daß die Seren spezifisches IgG enthielten, so daß keine direkte Nachweismethode für das PAP-Protein zur Verfügung stand. Daraufhin wurden Expressionsvektoren mit HA-markierten PAP-Konstrukten verwendet und diese für die im folgenden beschriebenen Experimente eingesetzt.

2.2.2.2. *In vitro* Transkription/Translation

Zunächst sollte gezeigt werden, daß die von der PAP-cDNS transkribierte RNS tatsächlich für ein Protein kodierte und translatiert werden konnte. Dieser Nachweis des Proteins erfolgte *in vitro* mittels gekoppelter Transkription/Translation in Retikulozyten-Lysaten.

Da die Expressionsvektoren pcDNA3 und pZeoSV2 und die davon abgeleiteten Vektoren pPAP-HA und pPAP-HA2 auf der 5' Seite der Klonierungsstellen einen T7-Promotor enthielten, konnten diese zur Transkription mittels T7-Polymerase eingesetzt werden. Dazu und für die anschließende Translation wurde das „*TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate*“ System der Firma Promega verwendet und die Reaktion wie in den Methoden beschrieben durchgeführt.

Nach der Translation wurden jeweils 5 µl der Ansätze mit 20 µl SDS-Proben-Puffer versetzt, 5 Minuten bei 80°C denaturiert und jeweils 10 µl auf ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Elektrophorese folgte ein *Western Blot* (s. Material und Methoden). Zum Nachweis der Proteine dienten als Erstantikörper der HA *High Affinity* Antikörper und als Zweitantikörper anti-Ratte IgG-POD F_{ab}-Fragmente. Der in Abbildung 13 dargestellte *Western Blot* zeigt, daß aus beiden Vektoren ein Protein mit der erwarteten Größe von etwa 20 kDa resultierte. Somit konnte also im weiteren Verlauf davon ausgegangen werden, daß die verwendete cDNS translatiert werden konnte und somit für weitere Transfektionsexperimente sowie für die stabile Transfektion und Etablierung von Klonen einsetzbar war.

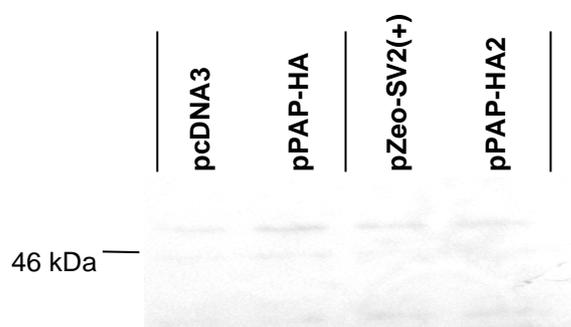


Abbildung 13: Western Blot zum Nachweis von PAP-Protein nach gekoppelter in vitro Transkription/Translation. Die Expressionsvektoren pPAP-HA und pPAP-HA2 sowie die entsprechenden Basisvektoren pcDNA3 und pZeo-SV2 wurden in eine gekoppelte in vitro Transkription und Translation in Retikulozytenlysaten eingesetzt und das Protein im Western Blot über den HA-Tag mit einem HA-spezifischen Antikörper nachgewiesen.

2.2.2.3. Nachweis von PAP in transfizierten COS-7-Zellen mittels Immunfluoreszenz

Um die Expression und Translation von PAP nun auch in Zellen darzustellen sollte PAP-HA-Protein mittels Immunfluoreszenz in transient transfizierten COS-7-Zellen nachgewiesen werden.

5×10^4 Zellen wurden auf Objektträgern mit vier getrennten Kammern ausgesät und am nächsten Tag mittels FuGene mit den Plasmiden pcDNA3 und pTarget (negative Kontrollen) sowie mit pPAP-HA und pPAP-HA3 transfiziert.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Paraformaldehyd und Methanol/Aceton fixiert und permeabilisiert. Es folgte eine Inkubation mit dem HA-spezifischen Antikörper (anti-HA *high affinity*) und daran anschließend eine Inkubation mit anti-Ratte IgG-Cy3 Immunglobulinen als Zweitantikörper. Die Durchführung erfolgte, wie in den Methoden beschrieben. Die Zellkerne wurden abschließend mit DAPI angefärbt.

Im Fluoreszenzmikroskop wurde die Färbung analysiert und repräsentative Zellen fotografiert.

Das Bild einer der Negativkontrollen (Abbildung 14.A) zeigte, daß hier lediglich eine sehr schwache Autofluoreszenz als Hintergrund zu sehen war. Deutlich davon zu unterscheiden war die spezifische Färbung durch die HA-spezifischen Antikörper an PAP-HA-transfizierten Zellen, wobei eine leicht stärkere Fluoreszenz in den pPAP-HA3 transfizierten Zellen im Vergleich zu den pPAP-HA transfizierten Zellen auftrat.

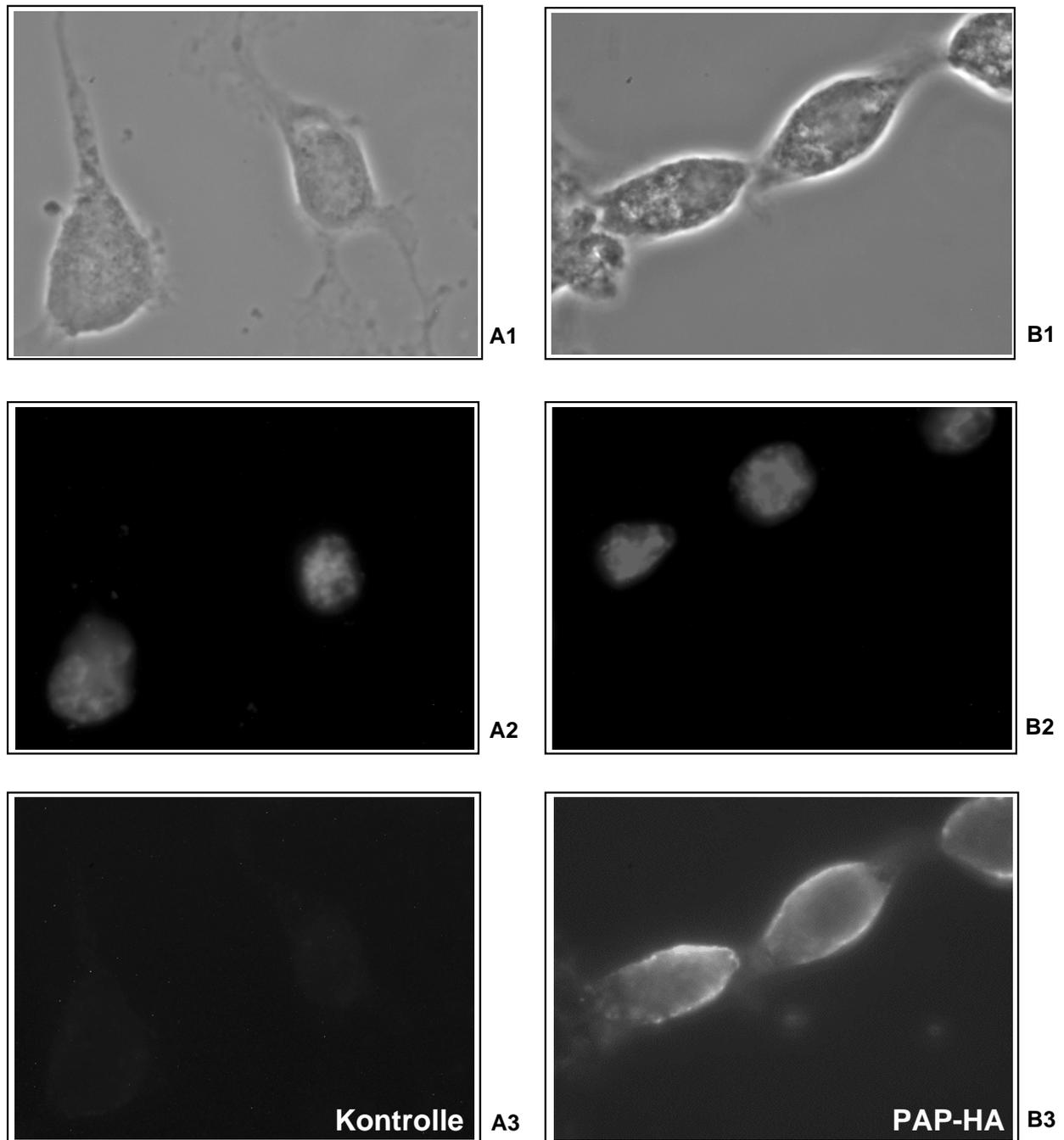


Abbildung 14: Nachweis der PAP-Expression nach transienter Transfektion von COS-7-Zellen mittels Immunfluoreszenz. COS-7-Zellen wurden mit den Vektoren pTarget (Bild A1-A3) und pPAP-HA3 (Bild B1-B3) transient transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Detektion erfolgte mit HA-spezifischen Antikörpern, als Sekundärantikörper diente anti-Ratte IgG-Cy3 (A3 und B3). Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt (A2 und B2). Bild A1 und B1 zeigen die Zellen in einer Phasenkontrastaufnahme. Vergrößerung: 1000-fach (Ölimmersion). Absorptions-/Emmissionswellenlänge: 550/570 nm

Diese Experimente bewiesen, daß die verwendeten Konstrukte mit der klonierten PAP-cDNS zur Transfektion von Zellen geeignet war und die Zellen PAP-HA transkribieren und translatieren konnten.

Auffällig war, daß die Färbung an eher abgerundeten Zellen besonders intensiv war (Abbildung 14.B3). An diesen Zellen wurde zudem sichtbar, daß sich die Plasmamembran besonders hervorhob. Dies unterstützte die Annahme, daß es sich bei PAP um ein Transmembranprotein handelt.

Da für das PAP-homologe Protein PMP22 bereits eine mögliche Induktion von Apoptose durch PMP22-Expression bzw. -Stimulierung diskutiert wurde (Fabbretti *et al.*, 1995; Brancolini *et al.*, 1999), wurden die transfizierten COS-7-Zellen auf apoptotische Zellen untersucht. Durch die vorgenommene Kernfärbung mit dem Farbstoff DAPI waren apoptotische Zellen deutlich an der Fragmentierung des Zellkerns zu erkennen, jedoch zeigte keine dieser Zellen eine PAP-spezifische Immunfluoreszenz. In diesem Experiment konnte also eine Induktion von Apoptose durch transgene Expression von PAP in COS-7-Zellen ausgeschlossen werden.

2.3. Stabile Transfektion von MCF-7 mit PAP und Etablierung von Klonen

Die Zelllinien MCF-7 und MCF-7_{ADR} stellen ein zelluläres Modellsystem für die Progression des Mammakarzinoms vom östrogenabhängigen Primärtumor zum invasiven östrogenunabhängigen Phänotyp dar. Ausgehend von MCF-7 Zellen war *in vitro* durch Selektion auf Adriamycinresistenz die Linie MCF-7_{ADR} etabliert worden (Vickers *et al.*, 1988), so daß sich die beiden Zelllinien direkt voneinander ableiten. Transkripte des „Progressions-assoziierten Proteins“ (PAP) waren bei einem Vergleich der beiden Zelllinien mittels *Differential Display* (Schiemann *et al.*, 1997) ausschließlich in der invasiven Zelllinie MCF-7_{ADR}, nicht aber in MCF-7 nachweisbar gewesen.

Daraus resultierte die Frage, ob durch eine transgene Expression von PAP in der Ausgangszelllinie MCF-7 eine Veränderung der Eigenschaften hin zum invasiven Phänotyp der MCF-7_{ADR}-Zellen möglich ist und somit der Expression von PAP eine funktionelle Bedeutung für die Metastasierung von Mammakarzinomzellen zugesprochen werden kann.

Ausgehend von der Zelllinie MCF-7, die in *Northern Blots* keine nachzuweisenden Mengen von PAP-mRNS aufwies, sollten stabile Transfektanten mit konstitutiver PAP-Expression etabliert werden. Selektierte Klone sollten dann in verschiedenen *in-vitro*-Tests und in Tierexperimenten auf ihren Phänotyp bezüglich Invasionsfähigkeit untersucht werden.

2.3.1. Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zur Ermittlung der Effektivität verschiedener Transfektionsmethoden wurden MCF-7-Zellen mit einem GFP-Expressionsvektor (pQBI25, Quantum) transient transfiziert und anschließend die Anzahl der GFP-positiven Zellen im Durchflußzytometer bestimmt.

MCF-7-Zellen wurden in einer Zellkulturschale ausgesät und am darauffolgenden Tag wie beschrieben entweder mittels Lipofektion und dem Agens „FuGene“ oder mittels Kalziumphosphat transfiziert. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, mit Propidiumiodid (PI) zur Bestimmung toter Zellen gefärbt und im Durchflußzytometer die GFP-Fluoreszenz gemessen. Tote Zellen wurden ausgegrenzt und der Anteil der fluoreszierenden Zellen analysiert.

Mittels FuGene konnten nach 24 Stunden 32% GFP-positive Zellen festgestellt werden bzw. 50% nach 48 Stunden (Abbildung 15.A). Für die Kalziumphosphat-Transfektion lag der Wert nach 48 Stunden mit 20% wesentlich niedriger (Abbildung 15.B).

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden beide Transfektionsmethoden zur Etablierung stabiler Transfektanten herangezogen, für transiente Expressionen wurde aber immer mit FuGene transfiziert.

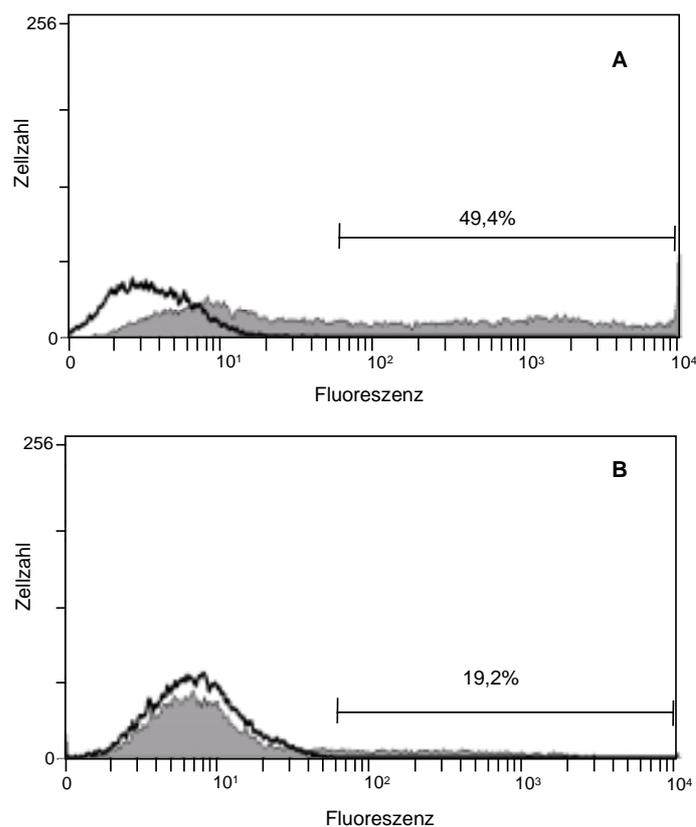


Abbildung 15: FACS-Auswertung zur Bestimmung der Transfektionseffizienz von MCF-7. A: GFP-Expression 48 Stunden nach Transfektion mit FuGene. B: GFP-Expression 48 Stunden nach Transfektion mittels Kalziumphosphat. Das Histogramm zeigt jeweils die untransfizierten Zellen als schwarze Linie, die transfizierten Zellen sind durch die grau ausgefüllte Kurve repräsentiert.

2.3.2. Ermittlung der G418-Konzentration zur Selektion stabil transfizierter Zellen

MCF-7-Zellen wurden in eine 96-Lochplatte ausgesät und Medium mit Geneticin (G418)-Konzentrationen von 100 µg/ml bis 2000 µg/ml zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen wurde mittels WST-Test (s. Material und Methoden) untersucht, ab welcher Konzentration die Zellen sterben. Dieser Effekt trat ab einer Konzentration von 500 µg/ml auf. Zur Selektion der Transfektanten wurde später Medium mit einer G418-Konzentration von 600 µg/ml verwendet.

2.3.3. Stabile Transfektion von MCF-7 mit PAP und Einzelkolonie-Selektion

Die ersten Transfektionsexperimente wurden mit dem Vektor pPAP3 und pcDNA3 (zur Etablierung von Mock-Klonen) durchgeführt. Somit stand die Expression von PAP unter Kontrolle des CMV-Promotors, während der Neomycin-Selektionsmarker unabhängig vom SV40-Promotor reguliert wurde (s. Abbildung 10 und Tabelle 2). Die MCF-7-Zellen wurden im ersten Ansatz mit FuGene, im zweiten Ansatz mittels Kalziumphosphat transfiziert.

Nach zwei Tagen wurde das G418-Selektionsmedium eingesetzt und nach etwa drei Wochen wurden mit Hilfe von Klonierungszyklindern einzelne Kolonien isoliert und in 96-Lochplatten überführt. Die Klone wurden bis zu ausreichenden Zellzahlen propagiert, anschließend Gesamt-RNS isoliert und über *Northern-Blot*-Analyse auf PAP-Expression untersucht. Als Sonde diente das PCR-Fragment, das Teile des 5' UTR und des offenen Leserahmens abdeckte.

Aus dem ersten Versuch resultierten lediglich zwei Klone, die ein Transkript exprimierten, welches im *Northern Blot* mit der PAP-spezifischen Sonde hybridisierte. Klon II/18 exprimierte ein Transkript von ca. 3,8 kb, Klon II/20 eines von ca. 3,3 kb. Diese entsprachen beide nicht der erwarteten Transkriptgröße von etwa 1,4 kb und konnten somit auch nicht auf eine korrekte Translation des Proteins schließen lassen. Zwanzig weitere Klone zeigten ebenso wie die zwölf Mock-Transfektanten keine PAP-Expression (Tabelle 3).

Ein weiteres Transfektionsexperiment unterschied sich von dem ersten lediglich in der Wahl der Transfektionsmethode. Hier wurden die Zellen mit Kalziumphosphat transfiziert und anschließend ebenso Klone isoliert und analysiert. Keiner der 18 MCF-7-Klone, die mit pPAP3 transfiziert worden waren zeigte im *Northern Blot* ein PAP-spezifisches Transkript (Tabelle 3).

Aufgrund der Ergebnisse dieser zwei Versuche wurde im folgenden Experiment ein anderer Expressionsvektor verwendet. Dieser kodierte für ein bicistronisches Transkript, das unter der Kontrolle eines CMV-Promotors stand (s. Abbildung 10). Somit war sowohl die Expression von PAP, als auch die des Selektionsmarkers vom selben Promotor abhängig. Die transkribierte RNS enthielt eine sogenannte IRES (*internal ribosome entry site*) –Sequenz, die an dieser Stelle der RNS den Eintritt von weiteren Ribosomen und somit eine parallele Translation von PAP und Neo^r ermöglichte.

Somit war gewährleistet, daß bei stabiler Neomycinresistenz ein für PAP kodierendes Transkript vorliegen mußte.

	Transfektionsmethode	Transfektionsrate (% GFP-positive Zellen 48 Std. nach Transfektion)	Vektor	Anzahl analysierter Klone (PAP/Mock)	Anzahl PAP-positiver Klone
1	FuGene	>50%	pPAP3/pcDNA3	22/12	2 *
2	CaPO₄	20%	pPAP3/pcDNA3	18/7	0
3	FuGene	>50%	pPAP8/pIRES-neo	23/12	21

Tabelle 3: Übersicht über die unabhängig durchgeführten Experimente zur Etablierung stabiler MCF-7-PAP-Klone. Bei den ersten beiden Experimenten kodierten die Vektoren für ein monocistronisches Transkript, während im dritten Versuch ein Vektor für ein bicistronisches Transkript verwendet wurde. Aus diesem Experiment resultierten schließlich auch PAP-positive Klone. In Experiment eins traten zwar zwei Klone mit PAP-positiver RNS auf, jedoch hatten diese nicht die Größe der erwarteten Transkripte(*).

Für diesen dritten Versuch wurde zudem die zu transfizierende DNS linearisiert, d.h. die Vektoren pPAP8 und pIRESneo wurden vor der Transfektion mit dem Restriktionsenzym *Xho* I verdaut. So sollte verhindert werden, daß bei der Integration der DNS in das Genom der MCF-7-Zellen der Vektor an der Stelle der kodierenden Sequenz geöffnet würde und somit zu einem unvollständigen Transkript führen könnte.

MCF-7-Zellen wurden wie in den vorangegangenen Versuchen mit FuGene transfiziert und nach zwei Tagen in G418-Selektionsmedium kultiviert. Bei diesem Transfektionsexperiment trat ein auffälliger Unterschied in der absoluten Anzahl der Klone zwischen den mit dem Leervektor pIRESneo und den mit dem Vektor pPAP8 transfizierten Zellen auf. Auf einer Platte mit Mock-Transfektanten wurden insgesamt 62 Klone gezählt, während auf Platten mit PAP-Transfektanten im Durchschnitt nur 18 Klone gewachsen waren. Ein derartiger Unterschied war zuvor bei den anderen Transfektionen mit Vektoren für monocistronische Transkripte nicht beobachtet worden.

Insgesamt wurden 12 Mock-Klone und 23 PAP-Klone in *Northern-Blot-Analysen* untersucht. Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, wiesen fast alle PAP-Klone auch PAP-spezifische Transkripte auf, wobei aber die meisten Klone mehrere Transkripte unterschiedlicher Größe exprimierten. Die meisten enthielten ein Transkript mit der Größe von 2,8 kb, was auch der erwarteten Größe für die bicistronische RNS entsprach. Darüber hinaus traten RNS-Moleküle mit ungefähr 5,5 und 7,5 kb auf. Diese ließen eine mögliche Konkatamerisierung bei der Integration der Vektoren und ein Überspringen oder Zerstören der polyA-Signale vermuten.

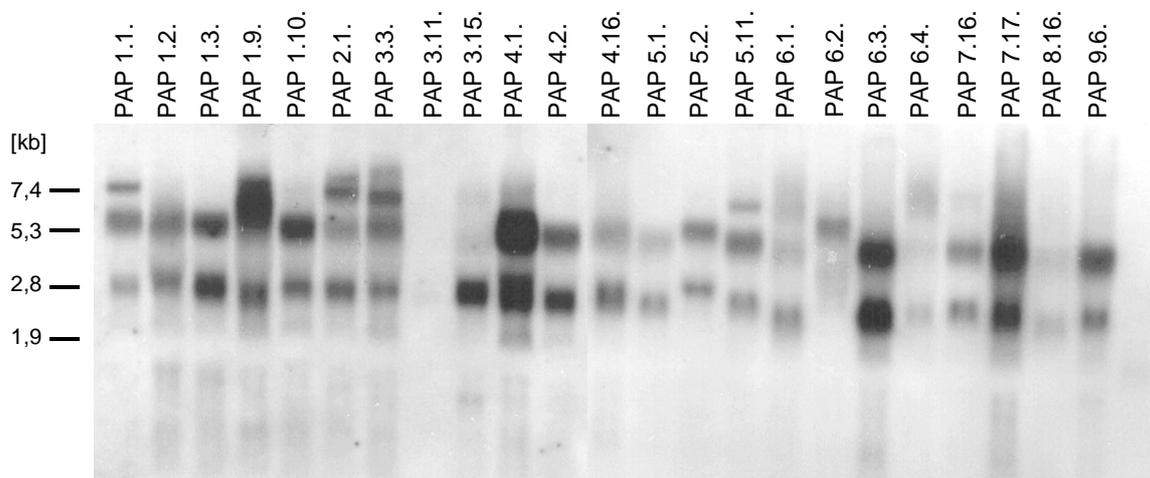


Abbildung 16: Northern Blot zur Analyse der PAP-Klone nach Transfektion von MCF-7-Zellen mit *pPAP8*. Aus 23 Klonen wurde Gesamt-RNS isoliert und im Northern Blot mit einer DIG-markierten PAP-Sonde aus dem offenen Leserahmen hybridisiert.

Ein weiterer *Northern Blot* enthielt RNS der Mock-transfizierten (pIRESneo) Zellen und der untransfizierten MCF-7-Zellen (ohne Abbildung). Hier waren in keiner der Spuren PAP-spezifische Transkripte nachweisbar.

Eine kleinere Auswahl von Klonen wurde erneut im *Northern Blot* analysiert und der *Blot* zusätzlich mit einer Neomycinphosphotransferase-spezifischen Sonde hybridisiert. Das Ergebnis (Abbildung 17) ließ erkennen, daß das 2,8 kb große Transkript in den meisten Klonen auch mit der Neo-Sonde hybridisierte, so daß es sich bei diesem Transkript um die erwartete bicistronische RNS handeln mußte. Fast alle Klone wiesen zudem noch weitere kleinere Transkripte auf, die zwar mit der neo-Sonde, nicht aber mit der PAP-Sonde hybridisierten. Die Klone, deren RNS sowohl mit der PAP- als auch mit der Neo-spezifischen Sonde hybridisierten und die das 2,8 kb große Transkript am stärksten exprimierten schienen für weitere Experimente geeignet und wurden weiteren Analysen unterzogen. Dies waren die Klone 1.3., 3.15., 4.1., 4.2., 6.3., 7.16., 7.17. und 9.6..

Auch die Kontroll-Klone exprimierten Transkripte unterschiedlicher Größe, wobei die Klone IRESneo7., 10., 11. und 12. ein Transkript mit der erwarteten Größe von etwa 1,8 kb aufzeigten und deshalb ebenfalls zur weiteren Analyse eingesetzt wurden.

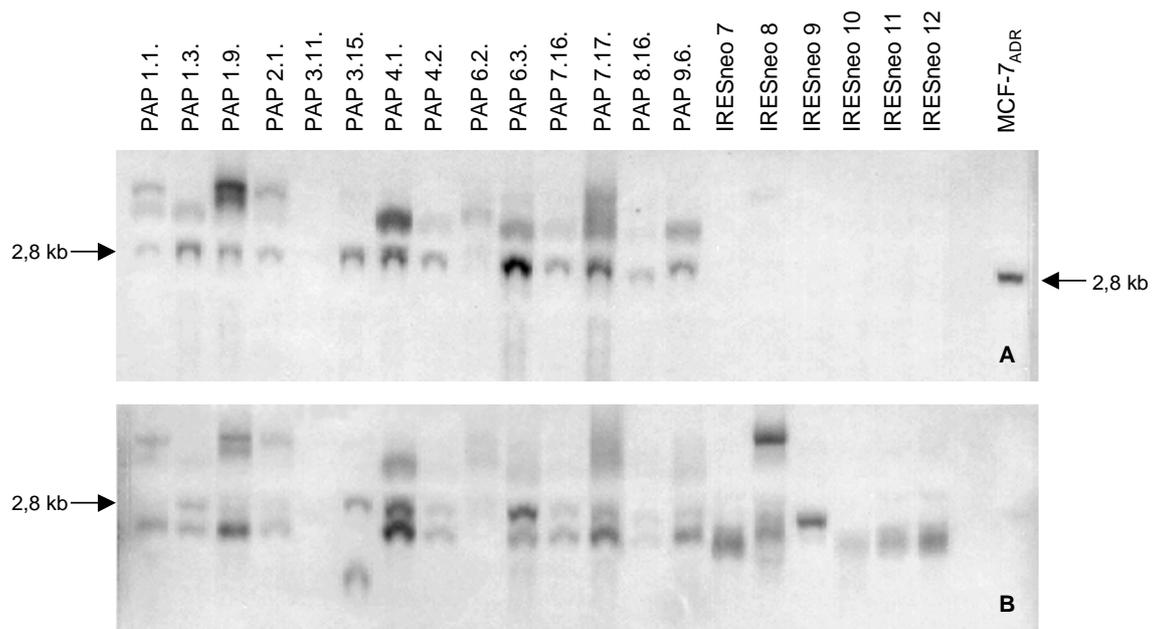


Abbildung 17: Northern Blot zum Nachweis des bicistronischen Transkripts in MCF-7/pPAP8-Klonen. Ein Northern Blot wurde zuerst mit einer PAP-Sonde hybridisiert (A) und anschließend mit einer Neomycinphosphotransferase-Sonde (B). Das 2,8 kb große Transkript hybridisierte sowohl mit der PAP, als auch mit der Neo-Sonde.

2.3.4. Stabilitätsanalyse der PAP-Expression in den MCF-7-Klonen

2.3.4.1. Überprüfung der Integration im Genom durch *Southern-Blot-Analyse*

Mit den genannten Klonen wurde eine *Southern-Blot-Analyse* durchgeführt, um zu bestimmen wieviele Vektoren sich in das Genom integriert hatten und auf welche Weise. Es sollte dabei darauf geachtet werden, daß die Klone möglichst keine konkatameren Mehrfachinsertionen enthielten, da solche Anordnungen zu einer großen Instabilität durch Rekombinationen und damit zum Verlust der integrierten DNS führen könnten (Berg *et al.*, 1987; Weidle *et al.*, 1988).

Aus den Zellen der genannten Klone wurde genomische DNS isoliert und anschließend mit dem Restriktionsenzym *Ssp I* verdaut. Als Kontrolle wurde das Plasmid pPAP8 mitgeführt und mit demselben Enzym geschnitten. Die DNS wurde dann einem Southern Blot unterzogen und die Membran mit derselben DIG-markierten PAP-spezifischen Sonde aus dem Bereich des ORF hybridisiert, die bereits für die Northern Blots verwendet worden war.

Das Restriktionsenzym *Ssp I* schneidet sowohl im Vektor als auch zweimal im Genom in Bereichen von *PAP*-Introns. Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, ergab sich somit in den nicht transfizierten Zelllinien MCF-7 und MCF-7_{ADR} auf dem *Southern Blot* ein Muster mit drei Banden.

Für die verschiedenen Möglichkeiten der Vektorintegration sollten sich folgende Größen für die DNS-Fragmente ergeben:

Art der Insertion		erwartete Fragmentgröße
Einzelkopie		4,1 kb und größer
„Kopf zu Ende“		6,3 kb
„Kopf zu Kopf“		8,2 kb
„Ende zu Ende“		4,4 kb

Wie der *Southern Blot* in Abbildung 18 zeigt, konnten in allen Klonen zusätzlich zu den endogen vorhandenen Abschnitten weitere PAP-spezifische Fragmente unterschiedlicher Größe nachgewiesen werden. Die Größe der Insertionen wurden mit Hilfe einer Standardkurve aus dem Längenstandard berechnet.

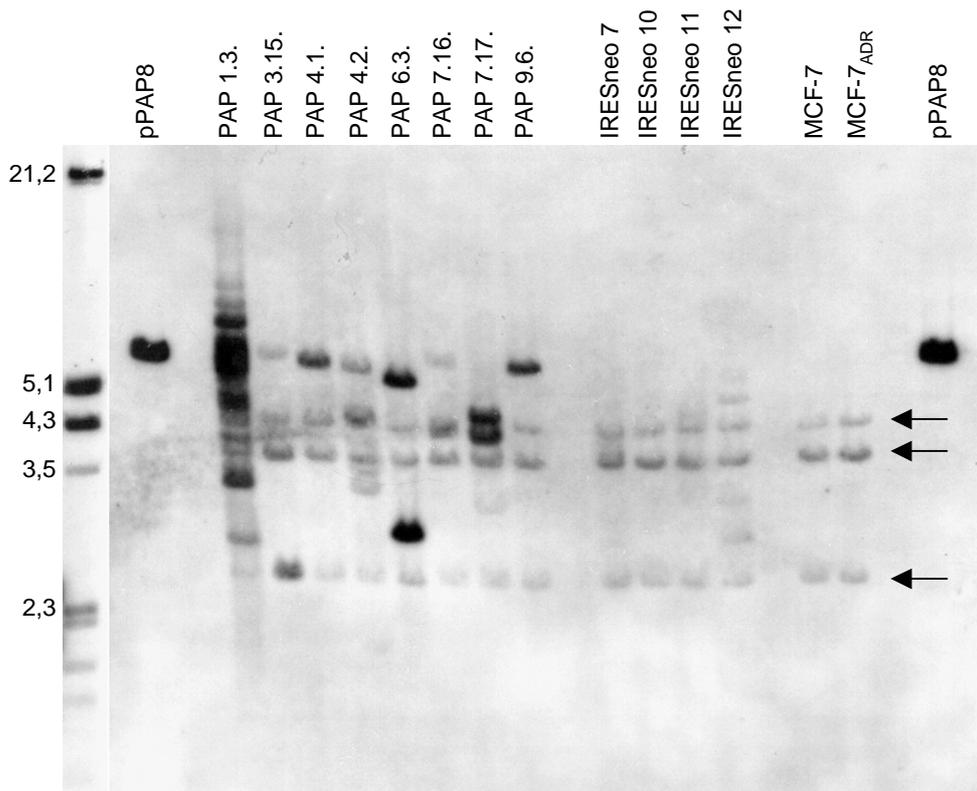


Abbildung 18: Southern Blot zur Ermittlung der Integrationshäufigkeit und -art der pPAP8-Vektoren in das Genom von MCF-7. Genomische DNS der Klone und Zelllinien wurde mit dem Restriktionsenzym *Ssp I* verdaut und im Southern Blot mit der PAP-Sonde hybridisiert. Die Pfeile markieren die im Genom endogen vorhandenen PAP-DNS. Zur Ermittlung der Fragmentgrößen diente der DIG-markierte „DNA molecular weight marker III“ (Roche Molecular Biochemicals)

Klon 1.3. zeigte auffällig viele Banden, was auf eine hohe Integrationsrate schließen ließ und somit zu hoher Instabilität führen könnte. Die Klone 3.15., 4.1., 4.2., 7.16., und 9.6. zeigten jeweils ein DNS-Fragment, mit einer Größe von etwa 6,3 kb. Dabei könnte es sich entweder um Einzelkopien oder um „Kopf-zu-Ende“-Insertionen handeln. Klon 6.3. wies ein Fragment auf, welches mit etwa 5,8 kb etwas kleiner war. Fragmente von nur 2,5 bzw. 3,5 kb traten bei den Klonen 4.2. und 6.3. auf und ließen auf mögliche integrierte Teilstücke des Vektors schließen. Die Spaltung der DNS aus Klon 7.17. resultierte in einem Fragment von ca. 4,8 kb und deutete somit auf eine Einzelkopie hin.

Da diese Analyse aber keinen eindeutigen Rückschluß auf die Stabilität der Expression der PAP cDNS zuließ, waren weitere Experimente notwendig, die zeigen sollten, welcher Klon die Transkription über einen bestimmten Zeitraum aufrecht halten konnte.

2.3.4.2. Transgene Expression von PAP ohne G418-Selektionsdruck

Da mit den ausgewählten Klonen ebenfalls Tierexperimente geplant waren, war entscheidend, ob die Transkription von PAP auch ohne Selektionsmedium über einen mehrwöchigen Zeitraum auf gleichem Niveau gehalten werden konnte.

Die Klone wurden zu diesem Zweck sechs Wochen in Zellkulturmedium ohne G418 propagiert sowie in einer Vergleichskultur über denselben Zeitraum in G418-Selektionsmedium. Ein weiterer Ansatz wurde zunächst vier Wochen ohne und anschließend erneut zwei Wochen mit G418 kultiviert. Aus allen Ansätzen wurde Gesamt-RNS isoliert und im *Northern Blot* mit der RNS der Ausgangszellen vor Beginn des Experiments verglichen. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 19 wiedergegeben.

Die Klone 1.3., 3.15., 4.2. und 6.3. zeigten eine sehr deutliche Abnahme der PAP-mRNS nach sechs Wochen ohne Selektionsmedium (Blot A, Spuren 3). Dies fiel besonders bei Klon 6.3. auf, da für diesen Klon zu Beginn das stärkste PAP-mRNS-Signal zu verzeichnen gewesen war. PAP-Transkripte waren nach sechs Wochen nur noch in den Klonen 4.1., 7.16., 7.17. und 9.6. nachweisbar. Aber auch diese Klone zeigten ein schwächeres PAP-spezifisches Signal mit Ausnahme des Klons 7.17., der über den gesamten Zeitraum als einziger analysierter Klon eine gleichbleibende PAP-mRNS-Menge aufwies. Dieser Klon hatte bereits aus dem Ergebnis der *Southern-Blot*-Analyse erwarten lassen, daß durch eine mögliche Einzelninsertion des Expressionsvektors die Integration und damit Expression stabiler sein könnte als bei den anderen untersuchten Klonen.

Interessanterweise konnte aber für alle Klone, die nur vier Wochen ohne Selektionsdruck und zwei Wochen mit G418 kultiviert worden waren (Blot A, Spuren 4), PAP-mRNS auf gleich hohem Niveau wie in den Vergleichsproben gezeigt werden. Somit schien also die Expression entweder rekonstituierbar oder nicht in allen Zellen verloren gegangen zu sein.

Einen ähnlichen Effekt zeigten auch die Mock-Transfektanten für die Transkriptmenge der Neomycin-Phosphotransferase (Blot B), wobei Klon IRESneo7 über den Zeitraum von sechs Wochen die konstanteste Expression zeigte (Abbildung 19, Blot B).

In Folge dieser Ergebnisse wurde entschieden, daß für die Experimente zur Untersuchung der Invasivität von MCF-7 PAP-Transfektanten in der Nacktmaus und zum Vergleich in *in-vitro*-Invasionstests die Klone 4.1., 7.17. und 9.6. sowie die Klone IRESneo7 und IRESneo11 herangezogen werden sollten.

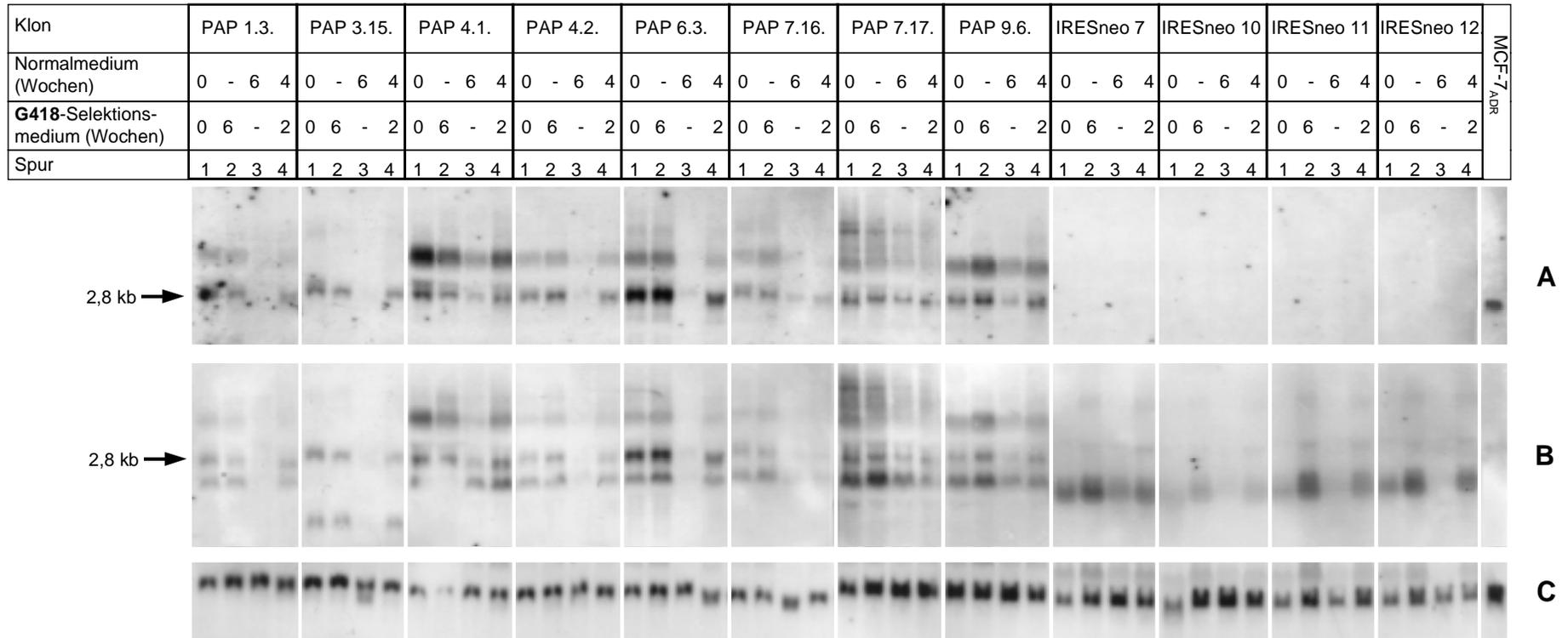


Abbildung 19: Northern Blot zur Überprüfung der Stabilität der Expression von PAP in MCF-7-Transfektanten. Die Klone wurden sechs Wochen mit (Spur 2), sechs Wochen ohne G418-Selektionsmedium (Spur 3) und vier Wochen ohne plus zwei Wochen mit Selektionsmedium (Spur 4) kultiviert. Die erste Spur zeigt zum Vergleich RNS der Zellen zu Beginn des Experiments. Der Blot wurde mit einer PAP-spezifischen Sonde (Blot A), mit einer Neomycinphosphotransferase-spezifischen Sonde (Blot B) und zum Vergleich der aufgetragenen RNS-Mengen mit einer spezifischen Sonde für das Stoffwechsellenzym GAPDH (Blot C) hybridisiert

2.3.5. Transfektion mit *lacZ*

Eine sensitive und einfache Methode, um später in Mäusen transplantierte und metastasierte Zellen schon in sehr geringer Anzahl nachweisen zu können besteht darin, die Zellen zuvor mit dem prokaryontischen Gen *lacZ*, das für die β -Galaktosidase kodiert, stabil zu transfizieren, um die Zellen später mit Hilfe von X-Gal anzufärben (Brünner *et al.*, 1992). Da die Zellen durch die erste Transfektion bereits G418-resistent waren, mußte nun ein Vektor mit Hygromycinresistenz eingesetzt werden. Für MCF-7 Zellen war zuvor eine optimale Hygromycinkonzentration von 400 $\mu\text{g/ml}$ zur Selektion von Klonen ermittelt worden (analog zu Kapitel 2.3.2.).

Die Klone PAP4.1., PAP7.17., PAP9.6., IRESneo7. und IRESneo11. sowie die Zelllinie MCF-7 wurden mit dem Vektor pcDNA3.1./Hygro/*lacZ* transfiziert und wie bereits beschrieben nach Selektion auf Hygromycinresistenz einzelne Klone isoliert. Die Klone wurden in 48-Loch-Platten überführt und wie in den Methoden beschrieben einem *lacZ*-Test unterzogen. Von 79 gepickten Klonen (PAP- und IRESneo-Klone) waren schließlich 20 *lacZ*-positiv. Jeweils ein *lacZ*-positiver Klon wurde ausgewählt und als PAP4.1.^{*lacZ*}, PAP7.17.^{*lacZ*}, PAP9.6.^{*lacZ*}, IRESneo7.^{*lacZ*}, IRESneo11.^{*lacZ*} und MCF-7^{*lacZ*} bezeichnet. Diese Klone wurden zum einen für Experimente in Nacktmäusen eingesetzt und zum anderen für die im nachfolgenden beschriebenen *in vitro* Experimente verwendet.

2.4. Zellbiologische Untersuchungen in den MCF-7 Transfektanten

2.4.1. Proliferationstest

Um einen möglichen Einfluß der PAP-Expression auf die Proliferation von Zellen zu untersuchen, wurden mit Hilfe von Wachstumskurven die Generationszeiten für die einzelnen PAP- und Mock-Klone bestimmt.

Die Zellen wurden in jeweils dreifachen Ansätzen in 96-Lochplatten ausgesät und nach 24, 48, 96 und 120 Stunden einem WST-Proliferationstest unterzogen. Die Absorption des umgesetzten Substrats wurde exponentiell gegen die Zeit aufgetragen und aus diesen Proliferationskurven schließlich die Anzahl der Teilungen in 90 Stunden und die daraus resultierende Generationszeit berechnet (s. Material und Methoden).

Abbildung 21 zeigt die Grafik der errechneten Generationszeiten. Die kürzesten mit 30 bzw. 25 Stunden hatten die Zelllinien MCF-7_{ADR} und MDA-MB-231, übereinstimmend mit der Erfahrung aus der Kultivierung der Zellen. Für die MCF-7-Zellen (45 Stunden), die Klone MCF-7^{lacZ} (48 Stunden), IRESneo7.^{lacZ} (48 Stunden), IRESneo11.^{lacZ} (42 Stunden) und den Klon PAP4.1.^{lacZ} (46 Stunden) wurden etwa gleiche Generationszeiten ermittelt. Langsamer wuchsen die Klone PAP7.17.^{lacZ} und PAP9.6.^{lacZ} mit einer Generationszeit von 63 bzw. 71 Stunden.

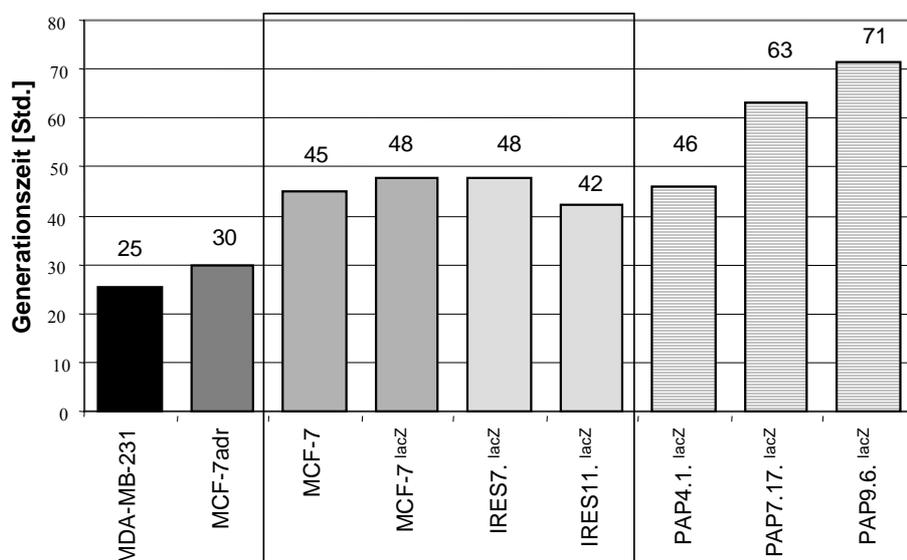


Abbildung 21: Vergleich der Generationszeiten von Zelllinien und Transfektanten. Für die einzelnen Klone und Zelllinien wurden mittels WST-Test Wachstumskurven erstellt und aus diesen die Generationszeiten ermittelt.

Obwohl der Klon PAP4.1.^{lacZ} im *Northern Blot* die höchsten PAP-mRNS-Mengen aufwies, zeigte dieser Klon keinen Unterschied zum Wildtyp oder den Mock-Transfektanten. Somit zeigten alle drei untersuchten PAP-Klone unterschiedliche Proliferationsraten, die nicht mit den Transkriptmengen des ektopisch exprimierten PAP korreliert werden konnten. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der PAP-Expression und einer erhöhten oder verminderten Wachstumsrate gezeigt werden.

2.4.2. Bestimmung der Adhäsion an Substrate der Extrazellulären Matrix

Die postulierte Rezeptorstruktur und Membranständigkeit von PAP führte auch zu der Hypothese, daß PAP die Anhaftung von Zellen beeinflussen könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden die etablierten Klone einem Adhäsionstest, wie in den Methoden in Kapitel 2.3.9 beschrieben, unterzogen. Zellkulturplatten wurden mit den Substraten Matrigel, Kollagen IV, Laminin, Fibronectin und Vitronectin beschichtet, die Zellen darauf ausgesät und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die nicht adhären Zellen sofort gewaschen und die Zahl der verbliebenen Zellen relativ zur ausgesäten Zellzahl (in einem zweiten Ansatz) mittels WST-Proliferationstest bestimmt. Der Versuch erfolgte im Doppelansatz.

Erste Versuche wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substrate durchgeführt, wobei sich eine Menge von 500 ng Substrat pro Vertiefung als optimal herausgestellt hatte.

Die Ergebnisse der Experimente mit den Zelllinien MCF-7, MCF-7_{ADR} und den transfizierten MCF-7 Klonen sind in Abbildung 22 grafisch dargestellt. Sie zeigen, daß alle sich von der Zelllinie MCF-7 abgeleiteten Klone am besten an Kollagen IV haften, während die Linie MCF-7_{ADR} die beste Adhäsion an Matrigel zeigte. Für die MCF-7_{ADR}-Zellen wurden allerdings auch an allen anderen Substraten eine Adhäsionsrate von nahezu 100 % bestimmt.

MCF-7-Zellen dagegen konnten sich noch gut an Kollagen IV anhaften (83 %) und zeigten auch an Matrigel (49 %) und Vitronectin (49 %) eine gute Effizienz. 18 % der ausgesäten MCF-7-Zellen adhären nach einer Stunde noch an Fibronectin und an Laminin.

Die Mock-Transfektanten MCF-7^{lacZ}, IRESneo7^{lacZ} und IRESneo11^{lacZ} zeigten im Vergleich zu den untransfizierten MCF-7-Zellen alle etwa das gleiche Adhäsionsverhalten. Im Verhältnis konnte aber auch für die Mock-Klone die beste Adhäsion an Kollagen IV, eine gute Adhäsion an Matrigel und Vitronectin, eine schlechte bzw. so gut wie gar keine Adhäsion an Fibronectin und an Laminin nachgewiesen werden.

Ebenso zeigten die untersuchten PAP-Klone 4.1.^{lacZ}, 7.17.^{lacZ} und 9.6.^{lacZ} keine auffällig veränderte Adhäsionsspezifität für eines der Substrate. Die Adhäsionseffizienz war für alle PAP-Klone in etwa vergleichbar mit denen der MCF-7-Zellen.

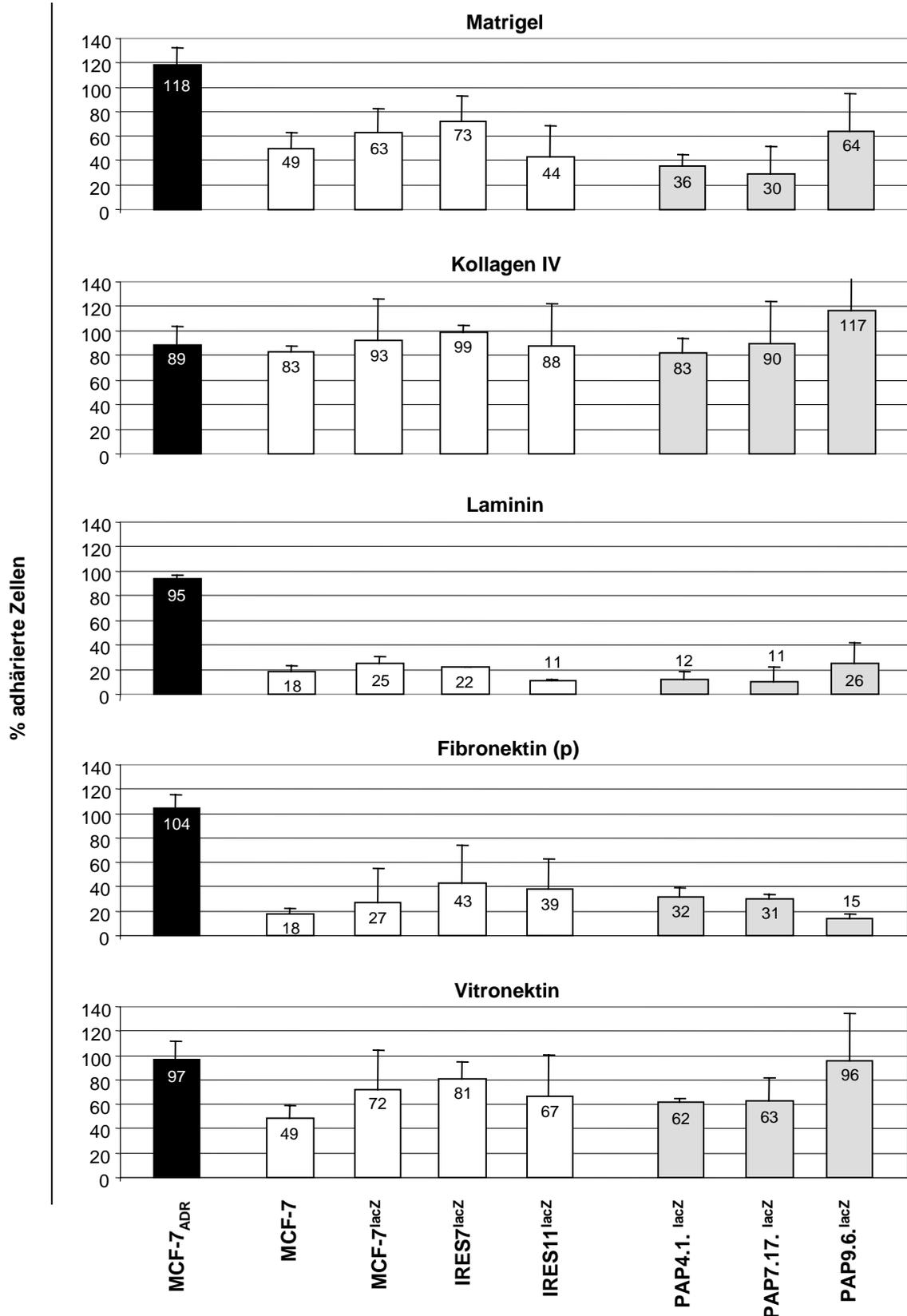


Abbildung 22: Adhäsionstest von Zelllinien und Transfektanten an verschiedene Substrate der Extrazellulären Matrix. Die Zellen wurden auf beschichtete Mikrotiterplatten ausgesät und die Menge der nach einer Stunde angehafteten Zellen mit Hilfe des WST-Proliferationstests wie in den Methoden Kapitel 2.3.9 bestimmt.

Schwierigkeiten traten bei diesem Experiment vor allem deshalb auf, weil die stark verklumpenden MCF-7-Zellen nur schwer eine gleichmäßige Menge der Zellzahl beim Aussähen ermöglichten, da die eingesetzten Zellsuspensionen schnell inhomogen wurden. Außerdem wurde nicht immer berücksichtigt, daß durch die Substrate eine Steigerung des Metabolismus induziert werden könnte, die zu einem erhöhten Umsatz von WST im Proliferationstest führen kann. Dies konnte in einem unabhängigen Experiment für das Substrat Kollagen IV beobachtet werden. Die Beschichtung der Platten führte zu einer Erhöhung der WST-Umsetzung von bis zu 20 % (ohne Abbildung). Diese Effekte könnten die hohen Standardabweichungen und Messwerte von über 100 % erklären.

Es konnte aber in jedem Fall mit diesem Experiment gezeigt werden, daß durch eine Transfektion von PAP in MCF-7 keine signifikante Veränderung der Adhäsion an die Substrate Matrigel, Kollagen IV, Laminin, Fibronectin und Vitronectin induziert werden konnte. Es zeigte sich aber, daß sich die Zelllinie MCF-7_{ADR}, die sich ja von MCF-7 ableitet, offensichtlich in der Adhäsionsfähigkeit und damit in der Expression von Rezeptoren (wie Integrinen) von MCF-7 unterscheidet. MCF-7_{ADR} haftete sehr gut an Laminin und Fibronectin, während weder MCF-7-Zellen, noch die Zellen der untersuchten Klone für Laminin oder Fibronectin eine erhöhte Affinität zeigten.

2.4.3. Untersuchung der Morphologie von Zellkolonien in einer Matrigel-Matrix

Ein *in vitro* Modell zur Klassifizierung des Differenzierungsgrades und der Invasionsfähigkeit von Mammakarzinomzellen stellt der Matrigel-Wachstumstest dar. Für Zelllinien mit starkem Invasionsverhalten und mesenchymalem Zelltyp wurde eine andere Morphologie von Zellkolonien in einer Matrigel-Matrix im Vergleich zu nicht-invasiven epithelialen Zelllinien beschrieben (Sommers *et al.*, 1994).

Die PAP- und Mock-transfizierten MCF-7-Klone wurden in diesem Test mit den Zelllinien MCF-7, MCF-7_{ADR} und MDA-MB-231 verglichen. Die Zellen wurden geerntet, mit Matrigel/Medium (50/50) gemischt und in eine Mikrotiterplatte (96 Loch) ausgesät, die zuvor bereits mit einer dünnen Schicht Matrigel versehen worden war. Die Zellen wurden bei 37°C inkubiert und nach sechs bzw. zwölf Tagen fotografiert.

Die invasive Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 (Abbildung 23.A) zeigte nach sechs Tagen die Bildung von Zellkolonien, deren Zellen lange Ausläufer bildeten, die auch nach zwölf Tagen noch vorhanden waren. MCF-7_{ADR} und MCF-7 zeigten diese Art der Ausläufer nicht. Sie unterschieden sich lediglich in der Größe der Kolonien. Während MCF-7-Zellen zu großen Kolonien zusammenwuchsen, bildeten MCF-7_{ADR} wesentlich mehr, aber kleinere Kolonien, in denen auch noch einzelne Zellen erkennbar waren.

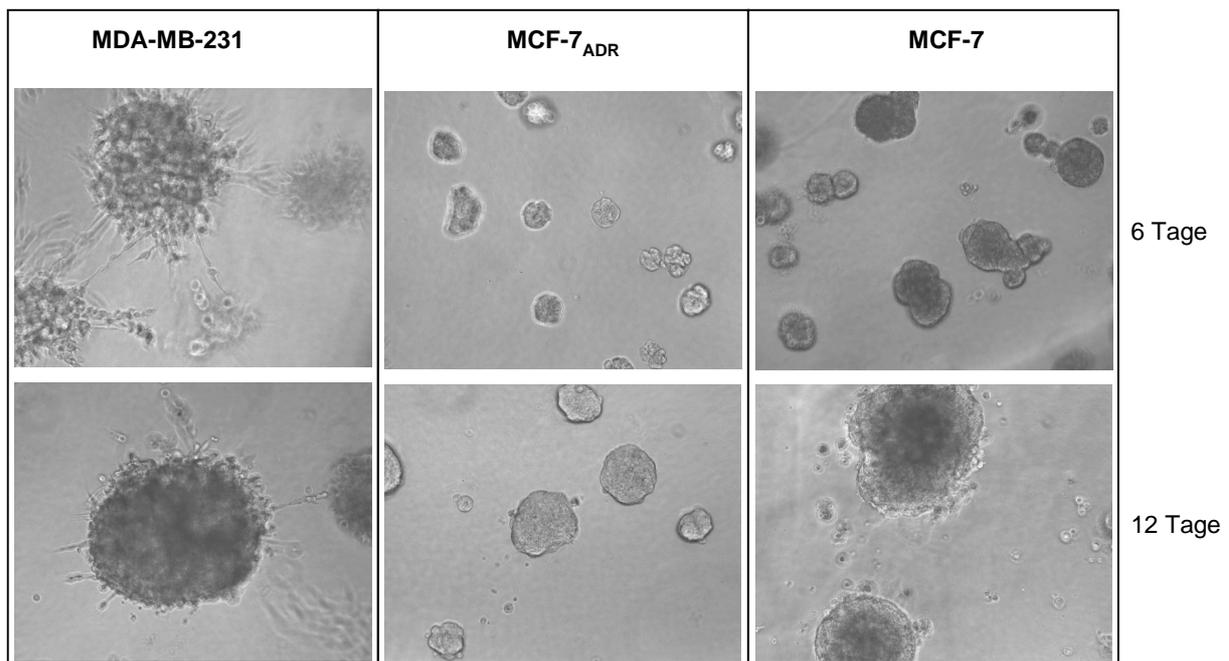


Abbildung 23.A: Matrigel-Wachstumstest zur Untersuchung der Invasionsfähigkeit von Zelllinien. Die Zellen wurden in eine Matrigel-Matrix ausgesät und nach 6 bzw. 12 Tagen Inkubation fotografiert. Stark invasive Zellen bildeten Ausläufer (MDA-MB-231), weniger invasive Zellen bildeten kleinere Zellkolonien (MCF-7_{ADR}), während nicht-invasive Zellen (MCF-7) große Zellkolonien bildeten. 63-fache Vergrößerung.

Wie die Abbildungen mit den Zellen der Transfektanten PAP4.1. ^{lacZ}, 7.17. ^{lacZ} und 9.6. ^{lacZ} und der Mock-Klone IRESneo7. ^{lacZ}, IRESneo11. ^{lacZ} und MCF-7 ^{lacZ} zeigen (Abbildung 23.B), bildeten alle Klone Zellkolonien im Matrigel, die in der Morphologie denen der MCF-7-Zellen entsprachen. Sie bildeten nach zwölf Tagen Kolonien, die auch in der Größe denen der untransfizierten Zellen gleich kamen und wiesen nie Ausläufer in der Art der MDA-MB-231-Zellen auf.

Dies zeigte, daß die Expression von PAP in MCF-7 keinen Einfluß auf die Morphologie der Zellen in einer Matrigel-Matrix nehmen konnte und der Differenzierungsgrad der MCF-7-Zellen unverändert blieb.

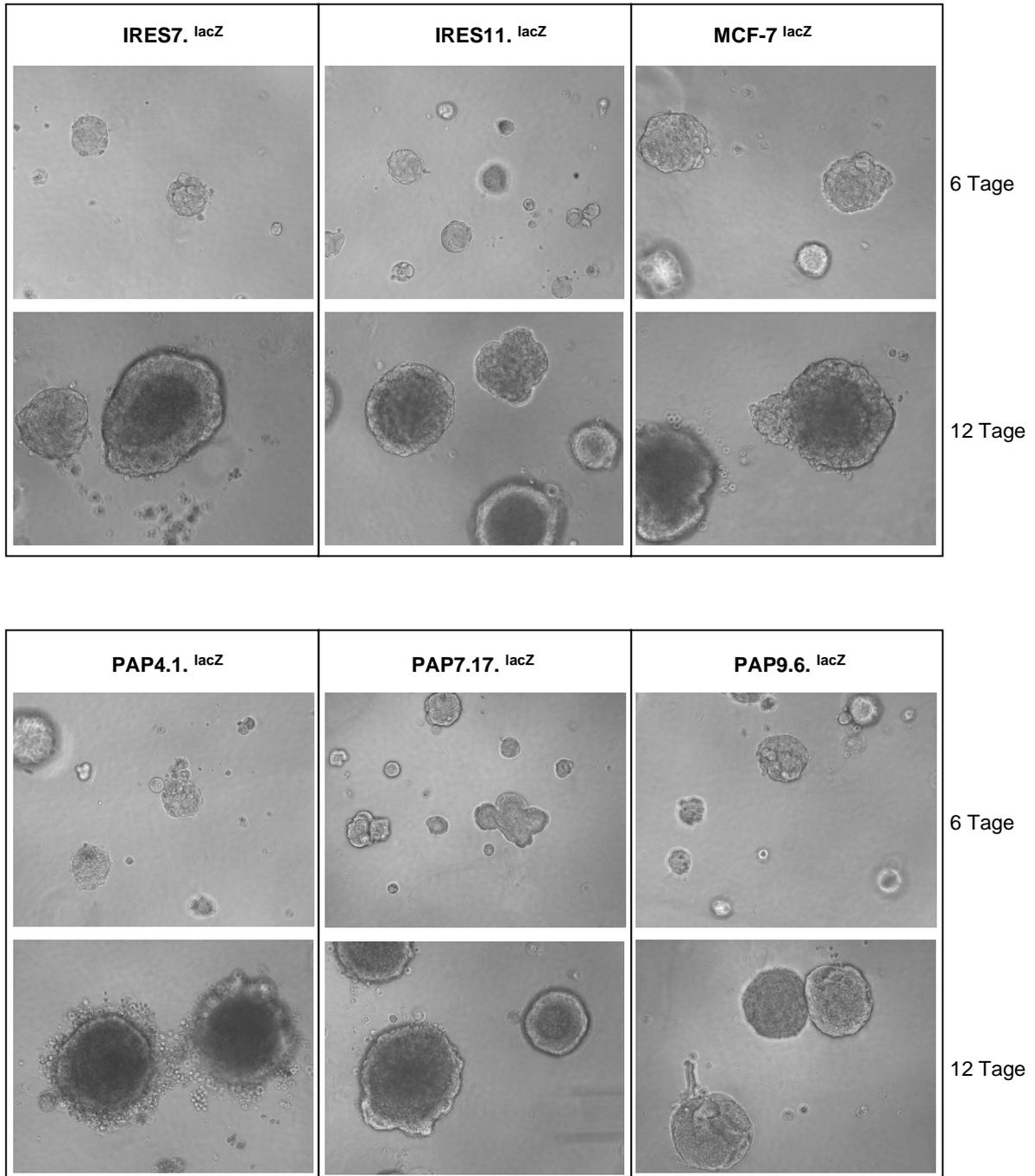


Abbildung 23.B: Matrigel-Wachstumstest zur Untersuchung der Invasionsfähigkeit von PAP- und Mock-Transfektanten. Die Zellen wurden in eine Matrigel-Matrix ausgesät und nach 6 bzw. 12 Tagen Inkubation fotografiert. Alle Transfektanten zeigten denselben Phänotyp wie untransfizierte MCF-7-Zellen. 63-fache Vergrößerung.

2.4.4. *In vitro* Invasionstest

Die etablierten MCF-7-Klone mit PAP-Expression wurden ebenfalls *in vitro* Invasionstests unterzogen. Bei diesen Versuchen wurden die Zellen auf ihre Fähigkeit untersucht extrazelluläre Matrix-Bestandteile aufzulösen und durch eine Membran hindurch zu wandern. Hierzu wurde der in den Methoden beschriebene modifizierte „Boyden-Kammer-Test“ („Transwell-Test“) durchgeführt.

Um zu gewährleisten, daß für alle eingesetzten Zellen eine lineare Korrelation zwischen der Zellzahl und dem im Test umgesetzten MTT bestand, wurden zunächst für den MTT-Test Standardkurven für alle Klone erstellt. Dazu wurden jeweils 3×10^5 bis $1,9 \times 10^4$ Zellen in eine 24-Loch-Platte gegeben und für drei Stunden mit MTT-haltigem Medium inkubiert. Danach wurde die Menge des aus dem MTT gebildeten Formazans wie beschrieben ermittelt. Alle Zelllinien zeigten eine lineare Abhängigkeit der Zellzahl von der gebildeten Formazankristallmenge (ohne Abbildung).

Als Positivkontrolle wurde für den Invasionstest die Zelllinie MDA-MB-231 hinzugezogen. Mit Hilfe dieser Zellen wurde zunächst eine optimale Matrigel-Konzentration zur Beschichtung der Membranen bestimmt. Dazu wurden die MDA-MB-231-Zellen auf mit 0, 50, 100 und 150 μg Matrigel beschichtete Membraneinsätze ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Der prozentuale Anteil der durch die Membran gewanderten Zellen wurde wie beschrieben (s. Material und Methoden Kapitel 2.3.8) mittels MTT-Test errechnet. Die Zellen wiesen mit 36 % eine gute Wanderungsfähigkeit durch die unbeschichtete Membran auf (Abbildung 24.A). Bereits bei 50 μg Matrigel pro Membraneinsatz wurde diese Wanderungsfähigkeit aber auf 20 % gesenkt.

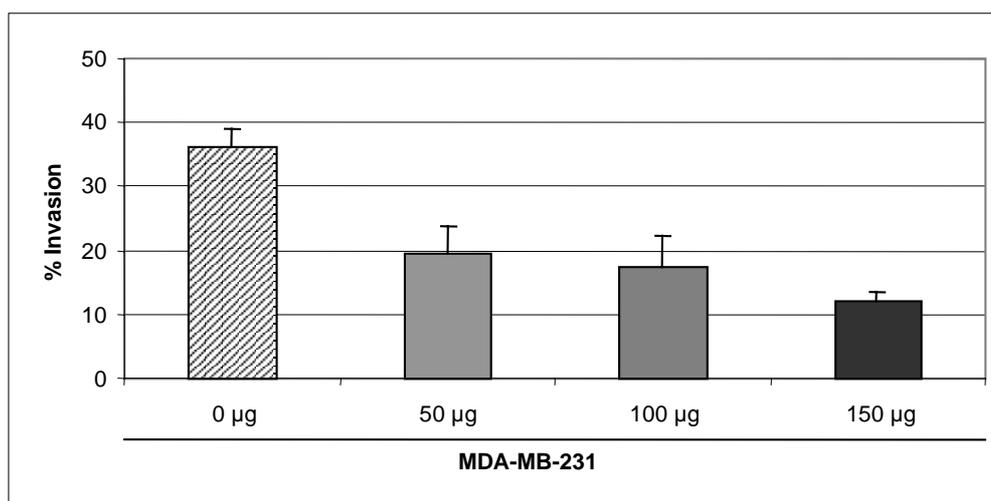


Abbildung 24.A: *In vitro* Invasionstest mit der invasiven Zelllinie MDA-MB-231 zur Ermittlung der optimalen Matrigelmenge. Der Invasionstest wurde mit unterschiedlichen Matrigelmengen zur Beschichten der Membranen durchgeführt. Die Mengen sind jeweils unter den Balken angegeben. MDA-MB-231 zeigte bei einer Beschichtung mit 50, 100 und 150 μg Matrigel eine reduzierte Invasionsfähigkeit gegenüber der unbeschichteten Membran

Auch bei stärkerer Beschichtung von 100 μg bzw. 150 μg wanderten nur noch 18 bzw. 12 % der Zellen durch die Membran. Dies machte aber keinen signifikanten Unterschied zu der Beschichtung mit 50 μg aus.

In einem weiteren Experiment wurden ebenfalls die Zelllinien MCF-7 und MCF-7_{ADR} verwendet und die Membraneinsätze unbeschichtet, mit 25 μg und mit 50 μg Matrigelbeschichtung eingesetzt.

Abbildung 24.B zeigt, daß sowohl MDA-MB-231 (38 %) als auch MCF-7_{ADR} (42 %) Zellen gut durch die unbeschichteten Filter wandern konnten. Bei MCF-7 konnten dagegen selbst an unbeschichteten Filtern nur 4 % der Zellen an der Unterseite der Membran nachgewiesen werden, durch die Matrigel beschichteten Filter war nahezu keine Invasion zu beobachten. Dagegen zeigten die beiden invasiven Zelllinien durch die mit 25 μg Matrigel beschichteten Filter mit 23 und 22 % gute Invasionsfähigkeit, die bei MCF-7_{ADR} aber auf 12 % bei Beschichtung mit 50 μg Matrigel pro Filter zurückging.

Um eine Invasion durch die Matrigelmembraneinsätze zu gewährleisten, die tatsächlich auf enzymatischer Auflösung der Matrix und aktiver Wanderung durch die Membran beruhen, wurden für die nachfolgenden Experimente immer Beschichtungen mit 50 μg gewählt.

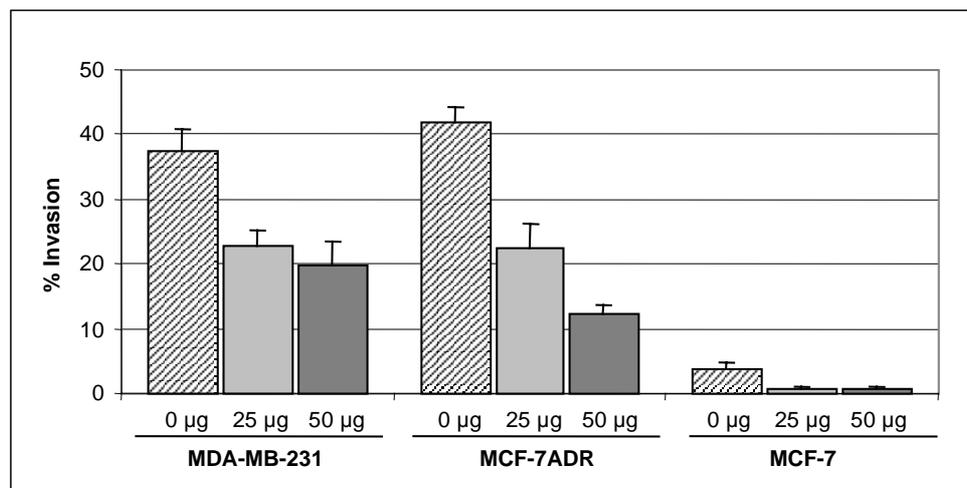


Abbildung 24.B: *In vitro* Invasionstest mit den Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7_{ADR} und MCF-7 zur Ermittlung der optimalen Matrigelmenge. Der Invasionstest wurde mit unterschiedlichen Matrigelmengen zum Beschichten der Membranen durchgeführt. Die Mengen sind jeweils unter den Balken angegeben. MCF-7_{ADR} zeigte ein ähnlich starkes Invasionsverhalten wie MDA-MB-231, während MCF-7 nur in geringem Maß durch unbeschichtete Membranen wandern konnte, durch beschichtete fast gar nicht.

Die Grafik in Abbildung 25 stellt die Ergebnisse der Invasionstests mit den PAP- und Mock-transfizierten MCF-7-Klonen dar. Der Test wurde auf unbeschichteten Membranen und auf mit 50 µg Matrigel beschichteten Filtern bei 24 und 48 Stunden Inkubationszeit durchgeführt. Abbildung 25.A läßt deutlich erkennen, daß die MCF-7-Zellen im Gegensatz zu den invasiven Zelllinien MCF-7_{ADR} und MDA-MB-231 nur in geringem Maße (3 % Invasion) durch die Filter wandern konnten. Weder die Mock-Klone IRESneo7^{lacZ}, IRESneo11^{lacZ} und MCF-7^{lacZ} noch die PAP-Klone PAP4.1.^{lacZ}, PAP7.17.^{lacZ} und PAP9.6.^{lacZ} zeigten eine signifikante Änderung der Wanderungsfähigkeit. Der Anteil der durch die Membran gewanderten Zellen lag zwischen einem und vier Prozent. Die MCF-7_{ADR}-Zellen konnten in 24 Stunden zu einem Anteil von 12 %, die MDA-MB-231-Zellen zu einem Anteil von 19 % die Matrigel-Beschichtung durchdringen. Bei allen Klonen konnte lediglich für einen geringen Anteil von maximal 3 % der ausgesäten Zellen eine Invasion durch die Matrigelmatrix nachgewiesen werden. Zwischen den Mock- und den PAP-Klonen war dabei keine Differenz zu erkennen (Abbildung 25.B).

Ein höherer Anteil gewanderter Zellen wurde für MCF-7_{ADR} bestimmt, wenn die Invasionskammern für 48 Stunden inkubiert wurden. Dies erhöhte die Invasion von 12 % (nach 24 Stunden) auf 21 % und zeigte damit bei einer invasiven Zelllinie die zeitliche Abhängigkeit der Anzahl der gewanderten Zellen (Abbildung 25.C). Eine solche Korrelation konnte für die Klone nicht festgestellt werden, da sich die Werte für die ermittelte Invasionsfähigkeit nicht von denen nach 24 Stunden unterschieden. Die Invasionsfähigkeit lag erneut für alle Klone und für MCF-7 zwischen einem und vier Prozent. Diese Ergebnisse zeigten, daß durch die konstitutive ektopische Expression von PAP in MCF-7 keine Veränderung in der in-vitro-Invasivität der Zellen erzielt werden konnte.

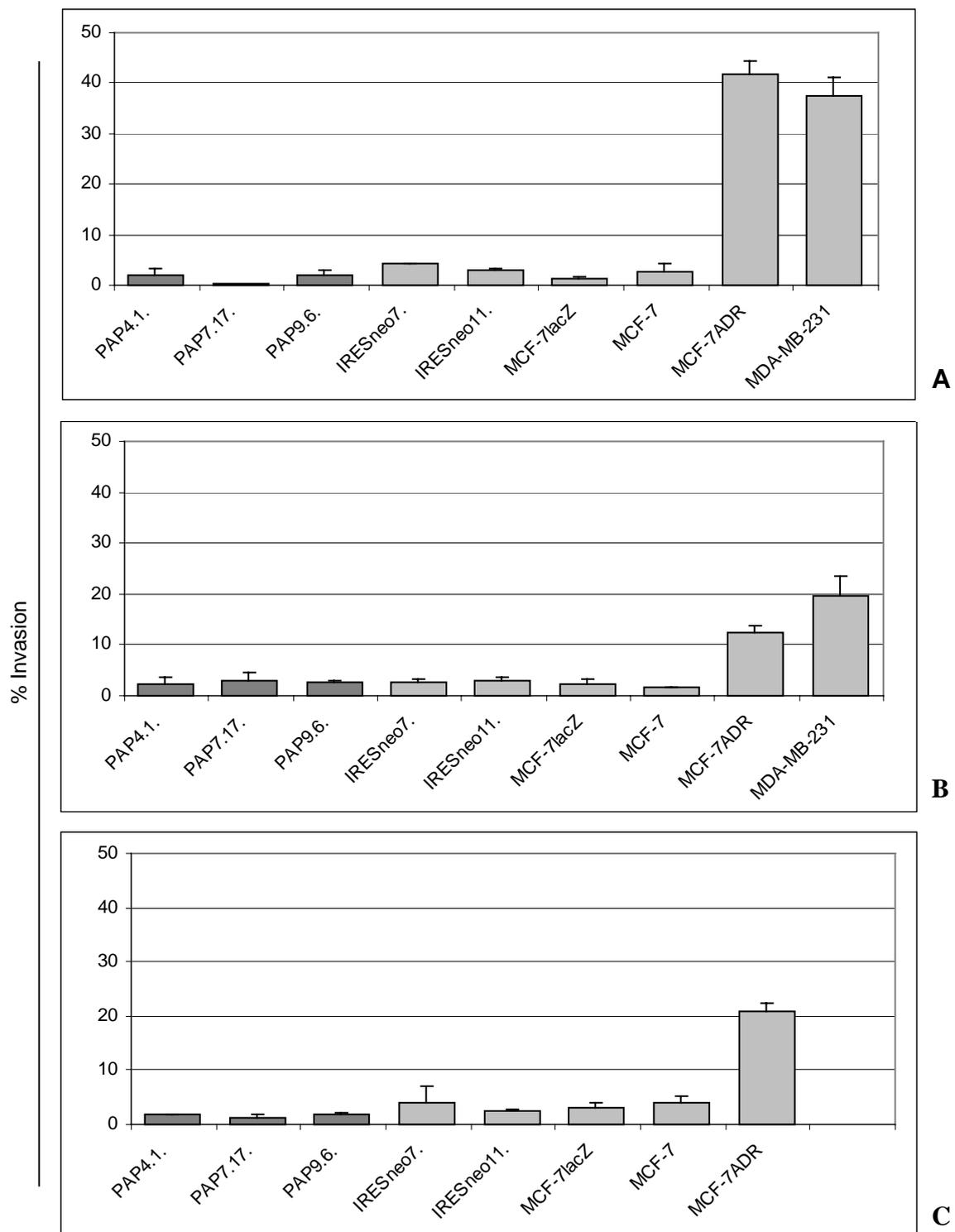


Abbildung 25: *In vitro* Invasionstest zur Bestimmung der Invasionsfähigkeit der transfizierten **MCF-7-Klone**. Mittels MTT-Test wurde die relative Anzahl der Zellen (in % Invasion) ermittelt, die in 24 Stunden durch eine unbeschichtete Membran (**A**), durch eine mit 50 µg Matrigel beschichtete Membran (**B**) oder nach 48 Stunden durch eine mit 50 µg Matrigel beschichtete Membran (**C**) gewandert waren.

3. Korrelation der PAP-Expression mit induziertem G1-Arrest

3.1. G1-Arrest primärer Zellen

PAP gehört zur Familie der Viertransmembran-Rezeptoren und im engeren Sinn zur PMP22-Genfamilie. Über PMP22 existieren bislang die meisten funktionellen und klinischen Daten. So war bereits bekannt, daß die Expression von PMP22, das auch als „*growth arrest specific gene 3*“ (gas-3) bezeichnet wird, in NIH3T3-Zellen mit einem durch Serumentzug induzierten G1-Arrest korrelierte (Manfioletti *et al.*, 1990).

In dieser Arbeit sollte in einem Experiment geklärt werden, ob PAP in humanen Zellen in ähnlicher Weise reguliert wird, wie PMP22.

Verschiedene primäre Zellen und humane Zelllinien wurden auf den Status der PAP-Expression im proliferierenden und im arretierten Zustand untersucht. Kontrolliert wurde dabei die Hemmung der Proliferation der Zellen mittels Durchflußzytometrie. Alle Zellen wurden zunächst im vierfachen Ansatz ausgesät. Nach 16 Stunden (Zeitpunkt Null der Untersuchung) wurde jeweils ein Ansatz zur durchflußzytometrischen Untersuchung verwendet. Die Zellen wurden wie beschrieben geerntet, einer Färbung mit Propidiumiodid unterzogen und anschließend im FACS-Gerät analysiert. Parallel dazu wurde aus den Zellen eines zweiten Ansatzes Gesamt-RNS isoliert.

Die Proliferation der Zellen in den zwei weiteren Ansätzen sollte dagegen durch Serumentzug in der G1-Phase des Zellzyklus angehalten werden. Dazu wurden die subkonfluenten Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Medium mit 0,1 % FKS versorgt. Nach 72 Stunden wurde jeweils einer der beiden Ansätze zur durchflußzytometrischen Untersuchung verwendet und aus den Zellen der zweiten Ansätze die Gesamt-RNS isoliert.

Von der Gesamt-RNS der Zellen vor und nach dem Serumentzug wurden jeweils 20 µg für einen *Northern Blot* eingesetzt und die Membran mit der PAP-spezifischen Sonde aus dem 3'UTR hybridisiert. Eine zweite Hybridisierung erfolgte mit einer PMP22-spezifischen Sonde, die mittels PCR und der Primer pmp1 und pmp2 aus dem Vektor pGDSV7-FL-hGas3 (C. Schneider, C.I.B. Laboratory, Triest) isoliert worden war. Abschließend wurde noch ein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-spezifisches PCR Fragment als Sonde eingesetzt. Zur Kontrolle der RNS-Menge wurde vor Durchführung des Transfers die 18S-rRNS-Bande im Gel fotografiert und quantifiziert.

Folgende humane primäre Zellen wurden untersucht:

Name	Zelltyp	Herkunft	Passage
VH83-1	Dermale Fibroblasten	Vorhaut	p5
H94-17	Lungenfibroblasten	Embryonales Lungengewebe	p9
HUVEC	Endothelzellen	Nabelschnurvene	p13
HMEC	Mammaepithelzellen	Brustdrüsenepithel	p9

Abbildung 26 zeigt das Ergebnis der *Northern-Blots*-Analyse für die primären Zellen. Deutlich ist zu erkennen, daß in den Mammaepithelzellen (HMEC) und in den dermalen Fibroblasten (VH83-1) die Expression von PAP mit der Proliferation der Zellen korrelierte: eine hohe Abundanz der PAP-Transkripte konnte in den proliferierenden Zellen ermittelt werden, in den durch Serumentzug arretierten Zellen signifikant erniedrigte Mengen. In den VH83-1-Zellen konnte außerdem die inverse Regulation für die mRNS von PMP22 gezeigt werden. So konnte bestätigt werden, daß die PMP22-Expression in arretierten Zellen höher ist, als in proliferierenden. In HMEC konnten unter keinen Bedingungen Transkripte für PMP22 nachgewiesen werden.

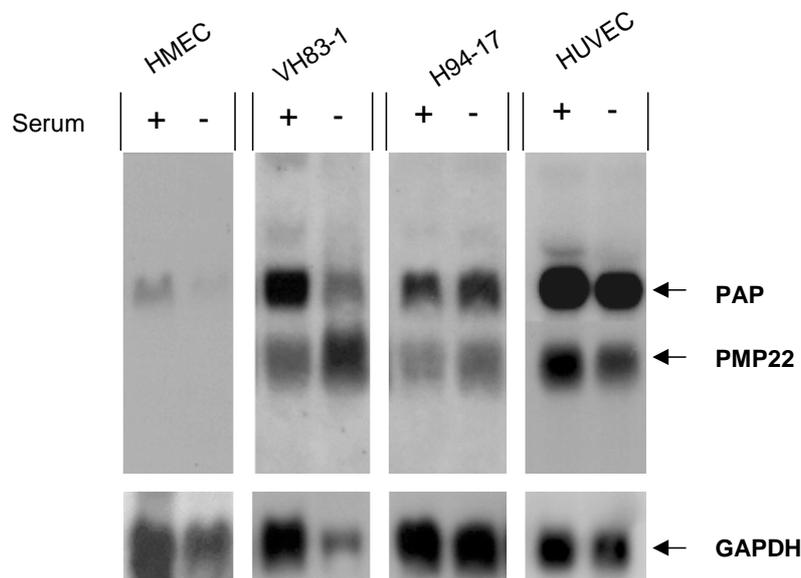


Abbildung 26: *Northern Blot* zur Untersuchung der PAP- und PMP-22-Expression in proliferierenden primären Zellen und in Zellen mit induzierten G1-Arrest. In den *Northern Blot* wurde jeweils 20 µg Gesamt-RNS eingesetzt. Die Zellen wurden zur Proliferation in Medium mit 10 % Serum (+) und zur Induktion des G1-Arrests für 72 Stunden in Medium mit 0,1 % Serum (-) kultiviert. HMEC: humane Mammaepithelzellen; VH83-1: humane Vorhautfibroblasten; H94-17: humane embryonale Lungenfibroblasten; HUVEC: humane Nabelschnurendothelzellen. Als Sonden dienten wie beschrieben die PAP-, PMP22- und GAPDH-spezifische PCR-Fragmente

Wie in Abbildung 26 zu sehen ist konnte aber sowohl für die Lungenfibroblasten (H94-17), als auch für die Endothelzellen (HUVEC) keine Veränderung der Transkriptmengen von PAP oder PMP22 durch den Serumentzug festgestellt werden.

Allerdings zeigten diese beiden Zelltypen auch keinen Unterschied in der Expressionshöhe des Stoffwechsellzyms GAPDH, während beide Zelltypen, die eine Regulation für PAP und für PMP22 aufwiesen, auch eine deutliche Abnahme der GAPDH-mRNS in der arretierten Phase zeigten. Unter Bedingungen des Serumentzugs erfolgte also mit dem Abfall der PAP-Expression ebenfalls eine Erniedrigung der GAPDH- und eine Erhöhung der PMP22-Expression.

Durch die Zellzyklusanalyse im Durchflußzytometer konnte zusätzlich eine Aussage über die Menge der Zellen gemacht werden, die durch den Serumentzug in der G1-Phase gehemmt werden konnten. Abbildung 27 läßt erkennen, daß die Mammaepithelzellen HMEC unter normalen Kulturbedingungen sehr gut proliferierten. 54 % der Zellen waren in G1-Phase und zusammengenommen 41 % in den Teilungsphasen S und G2/M. Durch den Entzug des Serums wurden nach 72 Stunden 73 % der Zellen in G1- und nur noch 26 % in S- und G2/M-Phase ermittelt. Ein ähnliches Bild ergab sich auch für die dermalen Fibroblasten (VH83-1): 46 % in G1-Phase und 47 % in S- und G2/M-Phase unter proliferierenden Bedingungen, während durch Serumentzug nach 72 Stunden 68 % der Zellen in G1 angereichert wurden und nur noch 29 % in S- und G2/M-Phase nachweisbar waren. Dies entsprach also für HMEC einer Erhöhung der Zellen in G1 um annähernd 20 %, für die VH83-1-Zellen um etwas mehr als 20 %.

Ein anderes Bild ergab sich allerdings für die Zellzyklen der Lungenfibroblasten (H94-17) und der Endothelzellen (HUVEC). Die H94-17-Zellen zeigten von Anfang an ein recht schlechtes Wachstumsverhalten: bereits unter Mediumbedingungen mit 10 % FKS befanden sich 74 % der Zellen in G1-Phase, nur 16 % in S- und G2/M-Phase. Diese Werte verschoben sich kaum durch den Entzug des Serums aus dem Medium. Ebenso wiesen die Bilder der Endothelzellen (HUVEC) fast konstante Werte für die Anzahl der Zellen in G1 auf. Dies kann zum einen auf nicht optimale Mediumbedingungen und zum anderen auch auf möglicherweise zu hohe Passage (13. Passage für HUVEC) zurückzuführen sein.

Somit wurde hier durch den Serumentzug keine quantitativ ausreichende Zellzahl in G1-Arrest gebracht, was sich in den Ergebnissen des dazugehörigen *Northern Blots* widerspiegelt. Nur die Zellen, die eine signifikante Veränderung in der Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zellzyklusphasen aufwiesen, zeigten auch einen Unterschied in der PAP- und PMP22-Expression.

Aus diesen Experimenten ging deutlich hervor, daß PAP ein inverses Expressionsmuster zu dem homologen Protein PMP22 aufwies. Die Expression von PAP korrelierte mit der Proliferation der primären Zellen, PMP22 wurde verstärkt in arretierten Zellen exprimiert.

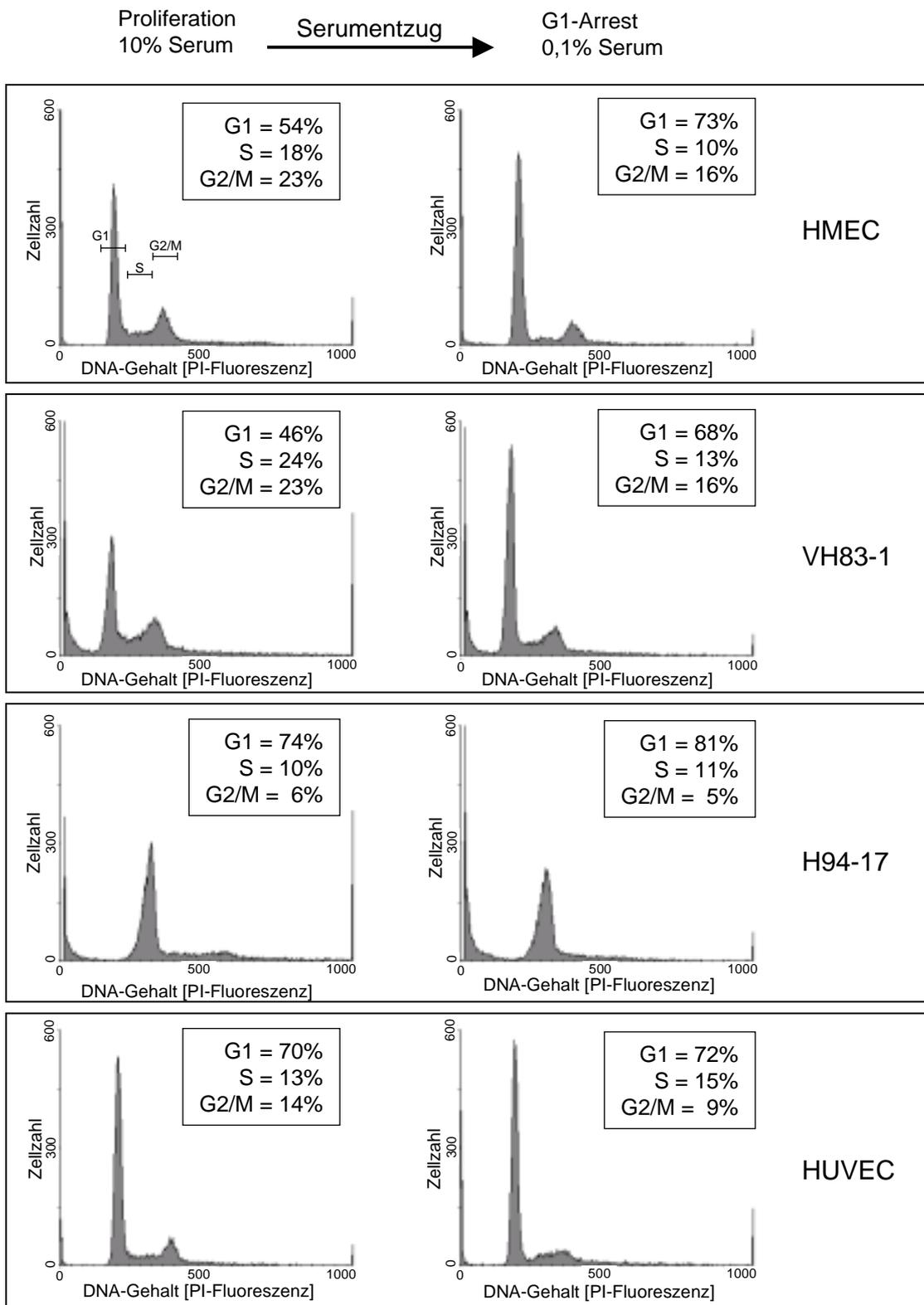


Abbildung 27: Zellzyklusanalyse mittels Durchflußzytometrie zur Kontrolle des G1-Arrests in humanen primären Zellen nach Serumentzug. Die DNS der Zellen wurde mit Propidiumiodid (PI) gefärbt und im FACS der Anteil der Zellen in G1-, S- und G2/M-Phase bestimmt. Das linke Histogramm zeigt jeweils die Zellen in Medium mit 10 % Serum, das rechte Histogramm die Zellen 72 Stunden nach Serumentzug.

3.2. Zelllinien

Dasselbe Experiment wurde im Weiteren mit den folgenden Zelllinien durchgeführt:

Name	Herkunft		Passage
MCF-7	Mammakarzinom		p74
MCF-7 _{ADR}	MCF-7		p16
MTSV1-7	Mammaepithelzellen	SV40-immortalisiert	-
G361	Melanom		p20

Der Versuch wurde für diese Tumorzelllinien bzw. immortalisierten Zellen in gleicher Weise wie für die Primärzellen durchgeführt. Der *Northern Blot* in Abbildung 28 zeigt zunächst, daß MCF-7-Zellen weder PAP noch PMP22 exprimierten, immortalisierte Mammaepithelzellen (MTSV1-7) allerdings PAP exprimierten und MCF-7_{ADR} ebenso wie die Melanomzelllinie G361 Transkripte für PAP und PMP22 aufwiesen.

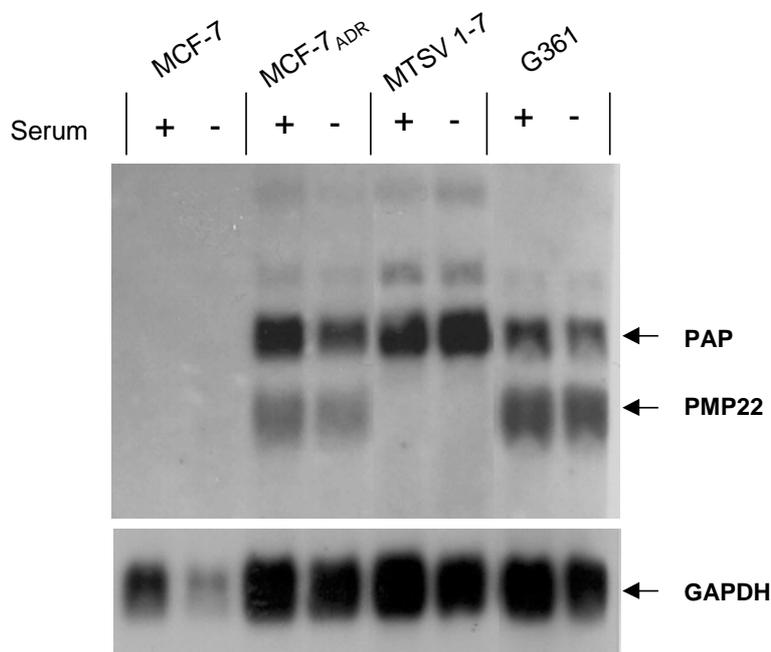


Abbildung 28: Northern Blot zur Untersuchung der PAP- und PMP22-Expression in humanen Zelllinien in Gegenwart von Serum und bei Serumentzug. Die Zellen wurden in Medium mit 10 % FKS kultiviert (+) bzw. für 72 Stunden in Medium mit 0,1 % FKS gehalten (-). Anschließend wurde Gesamt-RNS isoliert, die mittels Northern Blot mit den PAP-, PMP22- und GAPDH-spezifischen Sonden wie beschrieben analysiert wurde.

Eine Reduktion bzw. Induktion der Transkripte konnte jedoch in keinem Fall durch die Wegnahme des Serums aus dem Kulturmedium erreicht werden. Das Ergebnis zeigte, daß die inverse Expression von PAP und PMP22 durch Serumentzug nicht in den Zelllinien induziert werden konnte. Selbst Zellen der Linie G361, die in der FACS-Analyse eine Anreicherung der Zellen in der G1-Phase nach Serumentzug zeigten (ohne Abbildung), wiesen keine unterschiedlichen mRNS-Mengen für PAP oder PMP22 auf.

Die Zelllinie MCF-7 zeigte in der Zellzyklusanalyse eine leichte Verschiebung von 63 % G1-Phase-Zellen unter Kultur in serumhaltigem Medium auf 74 % nach 72 Stunden Kultur in serumreduziertem Medium. Keinerlei Reduktion der Proliferation konnte für MCF-7_{ADR} und für MTSV1-7 festgestellt werden. Die untersuchten Zelllinien zeigten in keinem Fall einen quantitativ mit den primären Zellen vergleichbaren G1-Arrest (ohne Abbildung).

Auch die Menge der Transkripte für GAPDH wurden nicht reduziert wie im Fall der Primärzellen (für MCF-7, Spur 2, war keine eindeutige Aussage möglich, da die Analyse der 18S-rRNS-Bande zeigte, daß hier eine geringere Menge RNS aufgetragen worden war).

Somit korrelierte die erniedrigte Expression von PAP, sowie die erhöhte Expression von PMP22 mit einem G1-Arrest durch Serumentzug nur in den diploiden normalen Zellen. In Tumorzellen oder SV40-immortalisierten Zellen hatte die Variation der Serumkonzentration im Medium keinen Einfluß auf die Expression der Transkripte für PAP, PMP22 und auch GAPDH.

Diskussion

1. Das Progressions-assoziierte Protein (PAP) besitzt vier Transmembrandomänen und gehört zur PMP22-Genfamilie

PAP wird von der invasiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7_{ADR} stark exprimiert, in der nicht invasiven Zelllinie MCF-7 ist PAP dagegen nicht nachweisbar. Die Entdeckung der unterschiedlichen Expression von PAP in diesem Modellsystem für die Progression des Mammakarzinoms gab Anlaß zu der Hypothese, daß PAP eine wichtige Rolle bei der Veränderung von einer nicht invasiven Zelle zu einer invasiven Zelle spielen könnte.

PAP gehört zur PMP22-Genfamilie und ist ein integrales Membranprotein mit vier Transmembranbereichen, zwei extrazellulären Domänen und kurzen intrazellulären Bereichen. Durch Immunfluoreszenz-Studien nach Transfektion von COS-7-Zellen mit einem Expressionsvektor, der für das PAP-Polypeptid mit einem angehängten HA-Tag kodierte, konnte die Lokalisierung an der Zytoplasmamembran bestätigt werden (s. Abbildung 14).

Während des Metastasierungsprozesses sind membranständige Moleküle, die Funktionen an der Zelloberfläche wahrnehmen, von entscheidender Bedeutung. Sie spielen sowohl bei der Induktion der Angiogenese als auch als Adhäsionsmoleküle bei der Anhaftung und Migration der Zellen und Signal übertragende Rezeptoren eine Rolle. Bei der Auflösung der ECM-Komponenten sind der uPA-Rezeptor und membranständige MMP für die gerichtete Degradation der Basalmembran verantwortlich. Andere Rezeptoren können Tumorzellen in bestimmte Zielorgane dirigieren („*homing*“) und Wachstumsfaktor-Rezeptoren stimulieren die Proliferation von Zellen. Außerdem ist ein Zusammenspiel zwischen Tumorzellen und Normalgewebe (Stromazellen) bei der Invasion zu beobachten, so daß Rezeptoren auch bei der Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen eine Rolle spielen können.

Dies macht deutlich, daß bei einem solchen komplexen Vorgang wie der Metastasierung von Tumorzellen sehr viele verschiedene Funktionen von Transmembran-Rezeptoren wahrgenommen werden.

Neben den Proteinen der PMP22-Genfamilie existieren noch weitere integrale Membranproteine mit vier Transmembrandomänen (TM), die auch zur TM4-Superfamilie zusammengefaßt werden können. Die Übereinstimmungen innerhalb dieser Superfamilie beschränken sich allerdings in erster Linie auf die gleichen Strukturvorhersagen. Homologien in den Aminosäure-Sequenzen bestehen zum Teil nur in geringem Ausmaß. Zu diesen Rezeptoren mit vier Transmembrandomänen zählen z.B. die Gruppe der Connexine sowie die CD81-Familie der Tetraspanine (Maecker *et al.*, 1997). Der Verlust der „*gap junction*“ Proteine Connexin 26 und 43 wurde in Mammakarzinomen beschrieben und korreliert mit

einem erhöhten Metastasierungsverhalten von Mammakarzinom-Zelllinien (Nicolson *et al.*, 1988; Nicolson *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1992).

Die mit Integrinen assoziierten Proteine der CD81-Familie sollen an der Aktivierung, Adhäsion und Motilität von Zellen beteiligt sein und eine Rolle beim Tumorwachstum spielen (Maecker *et al.*, 1997). Interessant ist vor allem die ihnen zugesprochene Rolle als Metastasierung supprimierende Faktoren. So wurde für CD9 (MRP-1, „*motility related protein 1*“) eine Korrelation mit der Metastasierung von Brustkrebs beschrieben. CD9-Expression war in Zellen aus Lymphknoten-Metastasen wesentlich niedriger als in Zellen des Primärtumors und scheint die Interaktion von Zellen mit Fibronektin zu beeinflussen (Miyake *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 1999). CD63-Expression scheint in späten Stadien von Melanomen unterdrückt zu sein, und für CD82 (KAI1) wurde eine Metastasierung-supprimierende Funktion beim Prostatakarzinom postuliert (Atkinson *et al.*, 1984; Dong *et al.*, 1995). Durch die Blockierung von Proteinen der CD81-Familie konnte gezeigt werden, daß diese Rezeptoren im Komplex mit $\alpha_3\beta_1$ -Integrin für die Motilität von Mammakarzinomzellen und die Induktion von MMP-2 verantwortlich sein könnten (Sugiura und Berditchevski, 1999).

Im Gegensatz dazu wurde das ebenfalls zur CD81-Familie gehörende Protein CO-029 in verschiedenen metastasierenden Pankreas- und Kolonkarzinom-Zelllinien nachgewiesen, nicht aber in den entsprechenden nicht metastasierenden Zelllinien. Die Transfektion von CO-029 in eine schwach metastasierende Kolonkarzinomzelllinie resultierte in einem erhöhten Metastasierungspotential der Zellen (Claas *et al.*, 1998). Ebenfalls als ein positives Metastasierungs-gen wurde PETA-3 (CD151) aus einer stark metastasierenden Hautkrebs-Zelllinie isoliert (Testa *et al.*, 1999).

Dies zeigt, daß Proteine, die wie PAP vier Transmembranregionen und nur geringe intrazelluläre Sequenzen aufweisen, die Metastasierungs-fähigkeit von Zellen beeinflussen können. Allerdings wurden die Proteine der CD81-Familie sowohl als Metastasierung-induzierende als auch als supprimierende Faktoren beschrieben und scheinen sich nicht in ein generelles Schema einordnen zu lassen.

Da alle bisher bekannten Metastasierungs-gene auch normale physiologische Funktionen wahrnehmen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, in welchen normalen Geweben PAP exprimiert wird und somit in physiologische Prozesse involviert sein könnte.

2. Korrelationsstudien: PAP-Expression in Normalgeweben, Tumorbiopsien und Zelllinien

2.1. PAP wird in vielen Organen mit Ausnahme von Gehirn und peripherer Blutlymphozyten exprimiert

Die Untersuchung von verschiedenen humanen Geweben in *Northern-Blot*-Analysen (Abbildung 5) zeigte, daß in fast allen normalen Geweben eine PAP-Expression nachweisbar war. Hohe mRNA-Spiegel zeigten Lunge, Magen und Herz. Ein besonders starkes Signal wurde für PAP in normalem Brustdrüsengewebe nachgewiesen, welches möglicherweise auf eine besondere Funktion in diesem Gewebe hindeuten könnte.

Die einzigen humanen Gewebe, für die weder hier noch in vorigen Studien (Schiemann *et al.*, 1997) PAP-Expression nachweisbar war, sind Gehirn und periphere Blutlymphozyten (PBL).

Interessant ist, daß im Gegensatz zu den ausdifferenzierten Lymphozyten im Blutsystem, PAP in frühen Vorläuferzellen von Lymphozyten nachgewiesen werden konnte und einen möglichen Marker für Pre-B-Zellen darstellt (Ruegg *et al.*, 1996). Diese Zellen haben bereits CD34 verloren, exprimieren aber noch nicht CD20 oder zytoplasmatische μ -Ketten. Sie sind positiv für CD19, HLA-DR und CD45. Dieser $CD19^+CD20^-CD34^-DR^+\mu\text{-Kette}^-$ Phänotyp wurde in einer Fraktion von akuter lymphatischer B-Zell-Leukämie („*B-acute lymphocytic leukemia*“, B-ALL) beschrieben (Ludwig *et al.*, 1994). Ruegg *et al.* konnten allerdings keine PAP-Expression in B-ALL- oder anderen hämatopoetischen Zelllinien nachweisen, was sich mit den Beobachtungen in dieser Arbeit deckt. Die Zelllinien HL-60, K-562, MOLT-4 und Raji wiesen nämlich im Gegensatz zu den Kolonkarzinom- bzw. Melanomzelllinien SW480 und G361 keine PAP-Transkripte auf (Abbildung 8).

Ein *Northern Blot*, der RNA einzelner Abschnitte des Zentralnervensystems (ZNS) enthielt, bestätigte, daß PAP in den meisten Regionen des Gehirns nicht transkribiert wird (Abbildung 6). Lediglich im Nachhirn war eine schwache Expression nachweisbar sowie eine recht starke Expression in sich anatomisch daran anschließenden Rückenmark. Somit konnte hier deutlich gezeigt werden, daß PAP in Teilen des Nervensystems sehr differenziert exprimiert wird. Die genaue Bedeutung dieser Unterschiede kann aber erst dann verstanden werden, wenn z.B. mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen genau geklärt werden kann, welcher Zelltyp im Rückenmark für die Expression von PAP verantwortlich ist. Da hier viele Zellen (Neuronen) des peripheren Nervensystems (PNS) mit denen des ZNS zusammenlaufen, stellt sich z.B. die Frage, ob die PAP-Expression von Zellen des ZNS oder PNS herrührt und ob es sich bei den PAP-exprimierenden Zellen um Gliazellen oder Neuronen handelt. PAP könnte dann aber im Fall einer zelltypspezifischen Expression einen interessanten Marker für bestimmte Zellen des peripheren oder zentralen Nervensystems darstellen.

Untersuchungen zur Gewebeexpression in Organen aus Maus und Ratte zeigten für PAP und das PAP-homologe Protein PMP22 ein etwa gleiches Expressionsmuster, das auch mit den hier untersuchten humanen Geweben übereinstimmte (Patel, 1992; Taylor *et al.*, 1995; Lobsiger, 1996). Ein Unterschied in der Expression zwischen PAP und PMP22 zeigte sich nur in Gewebe des peripheren Nervensystems. PMP22 wurde in Zellen des Ischiasnervs von Ratten um ein vielfaches stärker exprimiert als PAP. PMP22, das in der Myelinscheide (Schwann'sche Zellen) peripherer Nerven eines der am häufigsten vorkommenden Proteine darstellt (Suter und Snipes, 1995), wird eine wichtige Rolle bei der Myelinisierung von Neuronen durch Schwann'sche Zellen zugesprochen. Mutationen in *PMP22* oder Amplifikationen des Gens werden für verschiedene vererbte Krankheiten des PNS verantwortlich gemacht. *PMP22* Knock-out Mäuse zeigen spezifisch nur Defekte im PNS, nicht aber in anderen Organen (Adlkofer *et al.*, 1995).

Ein weiterer Unterschied zwischen PAP und PMP22 zeigte sich bei der Untersuchung von Mäuseembryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien. PAP wurde hier vor allem in Bereichen des sich differenzierenden Nervensystems exprimiert (Wulf und Suter, 1999). Dabei konnte beobachtet werden, daß die PAP-Expression genau in den Bereichen erhöht war, in denen zu diesem Zeitpunkt eine Differenzierung einsetzte, woraus sich eine wichtige Rolle von PAP bei der frühen neuronalen Entwicklung ableiten läßt. In adulten Mäusen war PAP dagegen in den entsprechenden Bereichen des Gehirns nicht mehr detektierbar. In einem *in vitro* Modellsystem für die neuroektodermale Differenzierung wurde PAP von auswachsenden Neuriten (Axonen) und von Zellen, die einem frühen Stadium von Neuronen entsprachen, exprimiert. Dagegen war für PMP22 im Vergleich zu PAP eine stärkere Expression im PNS und in unreifen neuroepithelialen Stammzellen nachweisbar (Wulf und Suter, 1999; Parmantier *et al.*, 1997). Somit scheinen sowohl PAP als auch PMP22 in Differenzierungsprozesse im Nervensystem eingebunden, jedoch an anderen strukturellen Vorgängen beteiligt zu sein.

2.2. PAP-Expression in Tumorbiopsien

Einige Studien deuten also auf eine Aufgabe von PAP bei der embryonalen Differenzierung vor allem in neuronalem Gewebe hin. In Mäusen exprimieren Strukturen des ZNS, wie das Gehirn, während der Embryogenese besonders große Mengen von PAP-mRNS, während PAP in adultem Gehirn nicht mehr nachweisbar ist. Für einige Onkogene ist bekannt, daß sie während der Embryogenese eine regulatorische Funktion wahrnehmen, bei einer Überexpression in adultem Gewebe aber zu Tumoren führen können. Dazu zählen z.B. INT-2, c-FOS oder TCL3/HOX11 (Dony und Gruss, 1987; Represa *et al.*, 1991; Roberts *et al.*, 1994).

Darüber hinaus gibt es Studien, die sowohl für PMP22 als auch für PAP eine regulatorische Funktion bei der Proliferation von Zellen beschreiben (s. auch Ergebnisse Kapitel 3) und sogar für PMP22 eine

onkogene Wirkung postulieren (Liehr *et al.*, 1997; Hühne *et al.*, 1999). Diese Hypothese basiert auf Amplifikationen im Bereich der chromosomalen Lokalisierung von *PMP22* auf Chromosom 17p in Osteosarkom- und Gliom-Zelllinien.

Ebenso stellt sich auch für PAP die Frage, ob es ein Gen mit tumorigener Wirkung sein könnte. Diese Hypothese scheint besonders plausibel, da seine Expression unter der Kontrolle des Proto-Onkogens *c-myc* zu stehen scheint, welches bei ektopischer Expression in transgenen Mäusen unter anderem zur Bildung von Tumoren des ZNS (Neuroblastomen) führen kann (Benvenisty *et al.*, 1992; Ben-Porath *et al.*, 1999).

Um zu untersuchen, ob PAP eine Bedeutung bei der Veränderung von normalem zu malignem Gewebe haben könnte, wurden verschiedene *Northern Blots*, die sowohl Normalgewebeproben als auch Proben aus dem Tumorgewebe von Patienten enthielten, mit einer PAP-spezifischen Sonde hybridisiert (Abbildung 7). Eine Patientin mit Mammakarzinom sowie zwei Patienten mit Kolonkarzinomen zeigten eine niedrigere PAP-Expression in den Tumorproben im Vergleich zum Normalgewebe. Drei Patientinnen mit Brustkrebs und zwei Patienten mit Darmkrebs zeigten dagegen keine veränderten RNS-Mengen für PAP. Somit konnte für diese Tumorarten keine Korrelation der PAP-Expression mit der Tumorentstehung gezeigt werden.

Ein interessantes Bild ergaben dennoch die Untersuchungen von Biopsien aus Patienten mit Hirntumoren. In Normalgewebe von zwei Patienten wurde PAP schwach exprimiert, in den übrigen sechs Normalgewebeproben war PAP nicht nachweisbar. Vier der Patienten, die keine PAP-Expression in Normalgewebe zeigten, wiesen dagegen in den entsprechenden Tumorproben PAP-spezifische Transkripte auf.

Weiterführende Studien könnten nun zeigen, ob tatsächlich in bestimmten Tumorarten des ZNS eine Korrelation mit der PAP-Expression vorhanden ist. Wichtig wäre dabei zu spezifizieren, welcher Zelltyp PAP exprimiert und ob PAP eventuell sogar für die maligne Entartung des Gewebes mitverantwortlich ist und einen potentiellen therapeutischen Angriffspunkt darstellt. Sollte PAP nicht Ursache der Tumorentstehung sein, so sprechen doch die hier behandelten Aspekte und Beobachtungen zumindest für eine quantitative Zunahme der PAP-mRNS. Dies könnte PAP als putativen zelltypspezifischen Marker oder als diagnostisch relevantes Molekül bei malignen Erkrankungen des ZNS interessant machen.

2.3. PAP-Expression korreliert in Brusttumor-Zelllinien mit dem Invasionspotential

Die Ursachen der klinischen Progression des Mammakarzinoms sind bis heute nicht bekannt, auch wenn für viele molekulare Faktoren deutliche Korrelationen mit dem Fortschreiten der Erkrankung bekannt sind und als klinische Marker eingesetzt werden können. Dennoch ist nicht klar, was die betroffenen Zellen vom hormonabhängigen, nicht invasiven und differenzierten zum

hormonunabhängigen, invasiven und dedifferenzierten Phänotyp treibt. Das Modellsystem aus den sich voneinander ableitenden Zelllinien MCF-7 und MCF-7_{ADR} spiegelt genau diese beiden unterschiedlichen Phänotypen wider und stellt deshalb ein ideales Modellsystem zur Untersuchung der Ursachen für die Progression des Mammakarzinoms dar.

Es wird allerdings deutlich, daß mit fortschreitender Entwicklung des Tumors nicht nur invasive Eigenschaften zunehmen, sondern damit auch viele andere phänotypische Veränderungen einhergehen, die nicht direkt einen Einfluß auf die Invasionsfähigkeit der Zellen haben müssen.

So findet mit der Progression des Tumors eine Dedifferenzierung der malignen Zellen statt, die mit der sogenannten epidermalen-mesenchymalen Transition (EMT) während der Embryonalentwicklung verglichen wird (Birchmeier, 1996). Dies konnte auch für MCF-7 und MCF-7_{ADR} bestätigt werden. Während MCF-7 epitheliale Strukturproteine wie Zytokeratine des Zytoskeletts, Desmoplakine der Desmosomen und Proteine der „tight junctions“ exprimiert, sind diese in MCF-7_{ADR} nicht nachweisbar. Gleichzeitig treten in MCF-7_{ADR} mesenchymale Marker wie etwa das Intermediärfilament Vimentin auf (Sommers *et al.*, 1992). Die invasiven Eigenschaften der Zelllinie MCF-7_{ADR} beruhen wohl in erster Linie auf der Expression von proteolytischen Komponenten wie Serin- und Matrixmetalloproteinasen (Schiemann *et al.*, 1997).

Die Untersuchungen zur Expression von PAP in unterschiedlichen Tumorzelllinien und primären Zellen macht deutlich, daß PAP offensichtlich nicht von allen Zellen epithelialen Ursprungs exprimiert wird und auch andere Zelltypen PAP-Expression aufweisen. Die Karzinomzelllinien HeLaS3 (Zervix) und A549 (Lunge) sind PAP-negativ und die Tumorzelllinien SW480 (Kolonkarzinom) und G361 (Melanom) (Abbildung 8) sowie normale Endothelzellen und Fibroblasten sind PAP-positiv (Abbildung 28). Dies zeigt, daß PAP nicht generell einem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden kann und nicht von allen Zellen epithelialen Ursprungs exprimiert wird.

Um zu untersuchen, ob PAP als Marker für invasive Zellen des Mammakarzinoms geeignet sein könnte, wurden die Experimente zur Bestimmung der PAP-Expression auf Brusttumor-Zelllinien mit unterschiedlich hohem Invasionspotential ausgeweitet. Diese Zelllinien unterscheiden sich deutlich in diversen *in vitro* Invasionsassays und in ihrem Metastasierungsverhalten in Nacktmäusen. Das höchste Metastasierungspotential kann der epithelialen Zelllinie Hs578T, die aus einem Karzinosarkom stammt, zugeordnet werden. Die Zelllinien können entsprechend ihrer Invasions- und Metastasierfähigkeit in folgender Reihenfolge angeordnet werden (s. auch Tabelle 1 und Thompson *et al.*, 1992):

invasiv**nicht invasiv**

Hs578T > MDA-MB-231 > MDA-MB-435 > MDA-MB-436 > MCF-7_{ADR} > **MCF-7** > **ZR-75-1** > **T47D**



In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß alle Zelllinien PAP-mRNS enthielten, die eine hohe *in-vitro*-Invasivität in Matrigel- und Boydenkammer-Tests sowie *in-vivo*-Invasivität nach subkutaner Applikation in Nacktmäusen zeigten (Abbildung 9). Auch wenn die einzelnen Zelllinien unterschiedlich hohe Transkriptmengen für PAP aufwiesen, die nicht in der invasivsten Zelllinie sondern in MCF-7_{ADR} am höchsten waren, kann doch eine deutliche Korrelation der PAP-Expression mit einem invasiven Phänotyp festgestellt werden.

Es muß jedoch deutlich gemacht werden, daß hieraus nicht unbedingt ein kausaler Zusammenhang zwischen Metastasierung und PAP-Expression abgeleitet werden kann, sondern lediglich eine Korrelation mit der Invasivität von Tumorzellen bestätigt wurde. Nur zellbiologische Funktionsanalysen können zu einer genauen Aussage bezüglich der molekularen Bedeutung von PAP für die Metastasierung von Tumorzellen führen.

Eine Möglichkeit solche Analysen durchzuführen, stellt die Transfektion von cDNS in eine nicht invasive Zelle und die anschließende Ermittlung des veränderten Phänotyps dar. Um einen möglichst geringen Einfluß anderer molekularer Parameter auszuschließen wurde die Zelllinie MCF-7 für diese Experimente ausgewählt. Da sich MCF-7_{ADR} von MCF-7 ableitet, sollten möglichst identische molekulare Verhältnisse gegeben sein und die Transfektion von PAP in MCF-7 müßte zeigen können, ob PAP alleine eine Veränderung im Invasionsverhalten induzieren kann.

Prinzipiell könnte ein Transmembranrezeptor auf folgende Elemente der Metastasierung modifizierend wirken:

- Adhäsion
- Motilität
- ECM-Degradation

Nach der Etablierung der MCF-7 PAP-Transfektanten wurden einzelne ausgewählte Klone in Bezug auf diese Eigenschaften in verschiedenen *in-vitro*-Tests untersucht.

3. Funktionelle Studien: Untersuchungen *in vitro* zum Einfluß ektopischer PAP-Expression

3.1. Einfluß stabiler PAP-Expression auf Adhäsion

Die extrazelluläre Matrix (ECM) besteht aus zwei Kompartimenten: der Basalmembran und dem interstitiellen Bindegewebe. Die Basalmembran dient als Anhaftungsmatrix für Epithelzellen und trennt sie vom darunter liegenden Bindegewebe. Sie enthält sowohl Kollagen Typ IV, das den Hauptbestandteil dieser Schicht bildet, als auch Glykoproteine wie Laminin und Proteoglykane. Darüber hinaus sind hier Wachstumsfaktoren eingelagert, die das Wachstum und die Migration von Zellen beeinflussen können (Wagener, 1999). Das interstitielle Bindegewebe besteht dagegen aus

Kollagenen (hauptsächlich vom Typ I und III), Fibronectin, Elastin, Proteoglykanen und Hyaluronsäure.

Im Verlauf der Metastasierung müssen Zellen die Basalmembran auflösen und durchdringen, um anschließend durch das Bindegewebe wandern zu können. Die Motilität der Zellen wird dabei durch Wechselwirkungen zwischen zellulären Rezeptoren und den Bestandteilen der ECM vermittelt. Bekannte Rezeptoren für ECM-Komponenten gehören zu den Integrinen und den CD44-Varianten (Hynes, 1992; Naor *et al.*, 1997).

Eine Teilsequenz der PAP-cDNS, die den kompletten 5' untranslatierten Bereich sowie den offenen Leserahmen enthielt, wurde in einem Expressionsvektor zur konstitutiven ektopischen Expression in die Zelllinie MCF-7 eingebracht. Drei PAP-Klone wurden in einem Adhäsionstest mit zwei Mocktransfektanten und den Zelllinien MCF-7 und MCF-7_{ADR} verglichen. Untersucht wurde die Fähigkeit der Zellen an bestimmte Substrate der extrazellulären Matrix zu adhären.

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Adhäsionstests zeigten bezüglich der Substrataffinität keinen signifikanten Unterschied zwischen den PAP-Transfektanten und den MCF-7 Wildtypzellen bzw. den Mocktransfektanten. Alle Klone zeigten ebenso wie die Zelllinie MCF-7 die beste Anhaftung an die Basalmembrankomponente Kollagen IV und eine gute Adhäsion an die Bindegewebskomponente Vitronectin. An Laminin (Basalmembran) und Fibronectin (Bindegewebe) zeigte MCF-7_{ADR} eine wesentlich bessere Bindung als MCF-7 und alle Klone (Abbildung 22).

Es konnte also deutlich belegt werden, daß MCF-7 und MCF-7_{ADR} andere Adhäsionseigenschaften aufweisen. Da MCF-7_{ADR} im Gegensatz zu MCF-7 sowohl an Fibronectin als auch an Laminin binden kann, scheinen sich die beiden Zelllinien in der Expression von Integrin-Rezeptoren zu unterscheiden. Die Adhäsionsfähigkeit der MCF-7-Zellen blieb durch die Expression von PAP unbeeinflusst, wodurch sich zeigte, daß zumindest für die Substrate Laminin und Fibronectin PAP alleine keine Adhäsion vermitteln kann. Allerdings wurde in dieser Studie nur ein kleiner Ausschnitt aus dem Spektrum möglicher Substrate analysiert, so daß ein Einfluß von PAP auf die Adhäsion an andere Substrate nicht ausgeschlossen werden kann. Darüber hinaus könnte es außerdem möglich sein, daß PAP lediglich eine unterstützende Funktion bei der Adhäsion wahrnimmt und für die eigentliche Interaktion andere Adhäsionsmoleküle verantwortlich sind. Ähnliches wurde auch für die Rezeptoren der CD81-Familie postuliert, für die eine Interaktion mit Integrinen als gesichert gilt (Maecker *et al.*, 1997; Stipp und Hemler, 2000; Sterk *et al.*, 2000). Auch hier konnte durch die ektopische Expression von CD9, CO-029 oder CD151 keine veränderte Adhäsion an ECM-Komponenten oder Zellen festgestellt werden (Berditchevski und Odintsova, 1999; Claas *et al.*, 1998; Testa *et al.*, 1999), obwohl diese Proteine zusammen mit Integrinen in fokalen Adhäsionskomplexen nachweisbar sind.

Ebenso wäre vorstellbar, daß wenn PAP einen Interaktionspartner zur Induktion eines Effektes benötigt, dieser von MCF-7 nicht exprimiert wird. Interessant wäre also zu untersuchen, ob mit PAP

ein anderes Protein, welches an der Adhäsion beteiligt ist, kopräzipitiert werden kann und ob die Expression von PAP zusammen mit diesem möglichen Interaktor die Adhäsion verändern und die Invasion der Zellen erhöhen kann.

Auch wenn das hier durchgeführte Experiment zunächst keinen Hinweis geben konnte, daß PAP Adhäsion vermittelnde Eigenschaften haben könnte, und in den extrazellulären Bereichen von PAP keine bekannten Adhäsions- oder Interaktionsdomänen erkennbar sind, spricht trotzdem für eine direkte Funktion von PAP als Adhäsionsmolekül neben der postulierte Topologie vor allem die vorhandenen N-Glykosilierungsstellen. Der Asparaginrest an Position 43 tritt auch in dem PAP-homologen PMP22 auf und scheint hier das L2/HNK1 Epitop zu tragen (Snipes *et al.*, 1993). Diese Glykostruktur kommt hauptsächlich bei Proteinen der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-CAM) sowie bei Proteinen des PNS vor und ist vorwiegend an Zell-Zell-Kontakten beteiligt (Kunemund *et al.*, 1988; Uyemura, 1993; Schachner und Martini, 1995).

Um eine Assoziation von PAP mit Adhäsionsmechanismen weiter zu untersuchen, sollte deshalb zunächst geklärt werden, ob PAP ebenfalls mit dem HNK1-Antikörper reagiert und ob dadurch homo- oder heterotypische Zell-Zell-Kontakte oder die Bindung von Zellen an Substrate beeinflusst werden kann.

3.2. Einfluß stabiler PAP-Expression auf Invasion und Motilität

Ein Merkmal des progressiven Mammakarzinoms ist die Dedifferenzierung der malignen Zellen von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp. Diese Veränderung des Zelltyps tritt auch unter physiologischen Bedingungen während der Embryogenese und der Wundheilung auf und wird als epidermale-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet (Hay, 1995). Sowohl für die Prognose, als auch für eine mögliche Therapie wären Marker, die diesen Übergang definieren könnten, von weitreichender Bedeutung. Eine Möglichkeit, den Differenzierungsgrad einer Zelllinie zu definieren, stellt ein Test dar, bei dem die Zellen in einer Matrigelmatrix wachsen und sich je nach Grad der Differenzierung in ihrer Morphologie unterscheiden. Es konnte gezeigt werden, daß Zellen, die im Matrigel sternförmig wachsen Vimentin, aber wenig Cytokeratin und kein E-Cadherin exprimierten (Domagala *et al.*, 1990; Sommers *et al.*, 1994). Andererseits konnte durch die Transfektion einer dieser möglichen EMT-Marker, nämlich Vimentin, in die differenzierte epitheliale Zelllinie MCF-7 der mesenchymale Phänotyp und eine erhöhte Invasivität nicht induziert werden (Hendrix *et al.*, 1997; Sommers *et al.*, 1992).

Dies unterstreicht, daß ein Faktor, der mit einem invasiven Phänotyp korreliert, nicht unbedingt auch die entsprechende Eigenschaft induzieren können muß.

Ebenso war dies in der vorliegenden Arbeit für die PAP-transfizierten MCF-7-Zellen zu beobachten (Abbildung 23). Alle in einer Matrigel-Matrix gewachsenen Klone zeigten eine sehr kompakte aber große Zellkolonieform, die der Form der nicht invasiven, epithelialen Wildtypzelllinie MCF-7 entsprach. MCF-7_{ADR} zeigte dagegen einen intermediären Phänotyp mit gelockertem Zellverband, und für die stark invasive Zelllinie MDA-MB-231 war ein deutlich sternförmiges Auswachsen der Zellen mit langen Zellausläufern zu erkennen. Dies läßt sich unter anderem durch die Expression ECM-degradierender Enzyme erklären und resultiert in einer hohen Motilität der Zellen.

Somit kann die Expression von PAP zwar mit einem mesenchymalen invasiven Typ bei Mammakarzinomzelllinien korreliert werden (s. Abbildung 9), stellt allerdings keinen Faktor dar, der selbst Einfluß auf den Phänotyp der Zellen nehmen kann.

Im Gegensatz zu PAP (und Vimentin) konnte aber für andere Faktoren belegt werden, daß sie alleine EMT induzieren können. Eine vor kurzem veröffentlichte Studie zeigte, daß durch rekombinantes MMP3/Stromelysin-1 oder durch die ektopische Expression dieser Matrixmetalloproteinase epitheliale nicht invasive Zellen ihre Zell-Zell-Kontakte (E-Cadherin) verlieren, Vimentin exprimieren und invasiv werden (Sternlicht *et al.*, 1999).

Mit der Dedifferenzierung der Zellen geht aber vor allem auch eine erhöhte *in-vitro*- und *in-vivo*-Invasivität einher. Zelllinien mit mesenchymalen Eigenschaften sind auch in der Lage Matrigel aufzulösen und zu durchwandern (s. Tabelle 1; Thompson *et al.*, 1992).

Die untersuchten MCF-7 PAP-Klone zeigten allerdings weder eine erhöhte Motilität (Abbildung 25A), noch veränderte invasive Eigenschaften (Abbildung 25 B und C). Dies konnte auch nicht durch einen Gradienten mit konditioniertem Medium oder Wachstumsfaktoren erreicht werden (ohne Abbildung).

Somit wurde deutlich, daß die Expression von PAP alleine nicht ausreicht, um einen mesenchymalen, motilen und invasiven Phänotyp in MCF-7 zu induzieren. Da für den Prozeß der Invasion Proteasen unabdingbar sind, hätte dies vorausgesetzt, daß PAP entweder selbst proteolytische Eigenschaften besitzt oder andere Proteine mit solchen Eigenschaften aktivieren oder deren Expression induzieren kann. Andererseits wurde vielfach bewiesen, daß die meisten MMP nicht von den Tumorzellen selbst, sondern von den umgebenden Stromazellen synthetisiert werden (Coussens und Werb, 1996). Für das Mammakarzinom konnte mittels *in situ* Hybridisierungen nur für MMP-7 (Matrilysin) und MMP-8 (Kollagenase-3) eine Expression in Epithelzellen nachgewiesen werden (Heppner *et al.*, 1996). Dies belegt das komplexe Schema von Interaktionen zwischen Epithelzellen, Stromazellen und ECM-Komponenten und zeigt deutlich den Unterschied zwischen Systemen *in vitro* und den realen Gegebenheiten *in vivo*.

Eine genauere Aussage, ob die Expression von PAP zu einer erhöhten Invasivität der Zelllinie MCF-7 führen kann, ist also erst nach der Auswertung von *in-vivo*-Experimenten in Nacktmäusen möglich.

Aber selbst dann kann argumentiert werden, daß PAP eine zelltypspezifische Funktion wahrnehmen könnte, für die die notwendigen molekularen Interaktionspartner in MCF-7 nicht exprimiert werden. In diesem Zusammenhang wären deshalb Experimente mit invasiven PAP-positiven Zelllinien interessant, bei denen der Effekt einer Blockierung von PAP untersucht werden sollte. Dies könnte durch Anti-sense-Studien, Knock-out-Versuche oder mit Hilfe blockierender Antikörper erzielt werden und würde auch dann zu einer Aussage führen, wenn PAP lediglich als unterstützendes oder stabilisierendes Membranprotein bei invasiven Prozessen eine Rolle spielt.

3.3. Einfluß transienter PAP-Expression auf Zellform

Zum Nachweis der Transkription und Translation wurden COS-7-Zellen mit der klonierten PAP-cDNS transient transfiziert. Das PAP-Protein konnte über die Detektion des HA-Tags mit einem monoklonalen Antikörper in Immunfluoreszenz-Versuchen nachgewiesen werden. Einzelne Zellen mit einer auffallend starken Expression des Proteins zeigten dabei eine besonders intensive Fluoreszenz an der Plasmamembran und bestätigten somit die postulierte Lokalisierung von PAP (Abbildung 14). Die Färbung trat relativ gleichmäßig am Zellrand auf und war zwischen zwei benachbarten Zellen nicht stärker (ohne Abbildung), was darauf hin deutet, daß PAP keine homotypischen Zell-Zell-Kontakte vermittelt. Diese Zellen fielen jedoch durch eine besonders abgerundete Zellform auf und lagen oft in einer Ebene über den adhärenz gebildeten Zellen. Mittels DAPI-Färbung der Chromosomen konnte gezeigt werden, daß diese Zellen aber weder apoptotisch noch in der G2-Phase des Zellzyklus waren.

Die Abrundung der Zellen könnte ein von PAP unabhängiger unspezifischer Effekt, bedingt durch die besonders starke Expression des Proteins gewesen sein oder aber tatsächlich spezifisch durch die Expression von PAP induziert worden sein. Im Gegensatz zu den COS-7-Zellen konnte nach der Transfektion von MCF-7-Zellen mit PAP-cDNS kein Abrunden der transfizierten Zellen beobachtet werden. COS-7 sind immortalisierte Affennierenzellen und tragen das T-Antigen des SV40-Virus. Dadurch sind die Zellen in der Lage Plasmide mit einem SV40-Replikationsstartpunkt (wie hier verwendet) zu amplifizieren und eine höhere Expression der eingeschleusten cDNS zu bewirken. Somit könnte es also sein, daß der Effekt der Zellabrundung erst durch die besonders starke Expression von PAP in COS-Zellen möglich war.

Darüber hinaus exprimieren COS-7-Zellen selbst ein dem humanen PAP homologes Protein, welches in *Northern Blots* mit der humanen PAP-Sonde nachgewiesen werden konnte (ohne Abbildung). Würde PAP eine zelltypspezifische Funktion wahrnehmen, die vom Vorhandensein eines anderen Proteins als Interaktionspartner abhängt, so ist also wahrscheinlich, daß diese Voraussetzung in COS-7 gegeben waren und in MCF-7-Zellen, die PAP nachweislich überhaupt nicht exprimieren, nicht.

Da mock-transfizierte COS-7-Zellen trotz einer endogenen Expression von PAP eine „normale“ Adhäsion und Ausbreitung zeigten, scheint erst durch eine Überexpression von PAP der Effekt der Deadhäsion induzierbar zu sein. Sollte dieser Effekt tatsächlich PAP-spezifisch sein, könnte PAP entweder direkt selbst zur Loslösung der Zellen führen oder aber die Überexpression führt zu einer Störung in einem Signalweg, der die Adhäsion von Zellen und die Ausbreitung auf einem Substrat reguliert.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß durch die Expression des PAP-homologen Proteins PMP22 in Schwann'schen Zellen und in Fibroblasten ein ganz ähnlicher Effekt beobachtet werden konnte. PMP22-überexprimierende Zellen zeigten eine verminderte Bildung von fokalen Adhäsionsstellen und eine geringere Ausbreitung der Zellen (Brancolini *et al.*, 1999). Dies spricht für einen spezifisch durch Proteine der PMP22-Genfamilie induzierbaren Effekt und für die direkte Beteiligung an einem Signaltransduktionsweg, der für die Adhäsion und Deadhäsion sowie für die Zellform verantwortlich ist.

Ein solcher Signalweg würde ECM-Adhäsionsmoleküle in Verbindung mit dem Zytoskelett voraussetzen, um eine Veränderung der Zellform induzieren zu können. Integrine stellen solche Adhäsionsmoleküle dar, die nach der extrazellulären Wechselwirkung mit Matrixproteinen unter anderem intrazellulär Signale zur Organisation des Aktin-Zytoskeletts auslösen (Giancotti und Ruoslahti, 1999). Die Regulation der Aggregation der Aktinfilamente unterliegt der Kontrolle der kleinen GTP-bindenden Proteine der Rho-Familie (Sander und Collard, 1999). Die Aktivierung der Rho-Proteine (Rho, Rac und CDC42) kann in der Ausbildung von Filopodien, Lamellipodien oder fokalen Kontakten resultieren und ist somit für die Ausbreitung von Zellen auf Substraten und für die Bewegung von Zellen verantwortlich. Interessant wäre nun zu untersuchen, ob der von PAP induzierte Effekt der Zellabrundung und Substratloslösung von aktivierten Proteinen der Rho-GTPasen wieder aufgehoben werden kann. Dies konnte bereits für PMP22 gezeigt werden: durch die Koexpression von einer aktiven Form von RhoA mit PMP22 wurde die durch PMP22 induzierte Verringerung der Zellausbreitung wieder aufgehoben (Brancolini *et al.*, 1999).

Wie die Adhäsionsexperimente (Ergebnisse Kapitel 2.4.2.) gezeigt haben, kann die Expression von PAP alleine wahrscheinlich nicht die Adhäsion von Zellen modulieren, was für eine Funktion in einem Komplex mit anderen Membranproteinen spricht. Für Proteine der CD81-Familie, die die identische Struktur wie PAP aufweisen, gilt als gesichert, daß sie mit Integrinen interagieren und deren Funktion beeinflussen (Maecker *et al.*, 1997). Ebenso könnte postuliert werden, daß PAP über eine extrazelluläre Bindung an ein Integrin dessen Funktion und somit die Adhäsion von Zellen beeinflussen könnte.

4. PAP-Expression ist Zellzyklus-abhängig

4.1. PAP-Expression korreliert in normalen Zellen mit Proliferation

Northern-Blot-Analysen in dieser Arbeit konnten zeigen, daß eine deutliche Korrelation zwischen der Proliferation normaler Zellen und der Expression von PAP besteht.

Durch Serumentzug konnten Mammaepithelzellen und dermale Fibroblasten in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert werden (Abbildung 27). Während die Menge der RNS von PAP in den arretierten Fibroblasten deutlich reduziert wurde, zeigte das auch als „*growth arrest specific gene 3*“ (*gas3*) bekannte PMP22 einen deutlichen Anstieg der mRNS. Dies zeigte, daß PAP und PMP22 invers reguliert werden und spricht für unterschiedliche Funktionen der beiden Rezeptoren.

Die unterschiedliche Regulation von PAP und PMP22 läßt sich aufgrund der anderen Promotorstruktur der beiden Gene erklären. Die Expression von PMP22 unterliegt im Gegensatz zu PAP nicht der Regulation durch den Transkriptionsfaktor *c-myc*, sondern weist eine Promotorstruktur mit zwei Transkriptionsstartpunkten auf, für die keine Konsensus-Sequenz einer Transkriptionsfaktor-Bindestelle identifiziert werden konnte (Suter *et al.*, 1994). So scheinen PAP und PMP22 trotz ihrer starken Sequenzidentität von 41% unterschiedlich reguliert zu sein und könnten somit auch verschiedenartige Funktionen wahrnehmen. Dies zeigen auch Beispiele aus anderen Untersuchungen. So konnte nach der Verletzung des Ischiasnerv an Versuchsratten eine inverse Regulation der Transkripte von PAP und PMP22 beobachtet werden (Taylor *et al.*, 1995). Ein deutlicher Anstieg der Expression von PAP wurde hier an den proliferierenden Enden der Beschädigung verzeichnet, während gleichzeitig die Menge der PMP22-Transkripte zurückging.

Nach der Entdeckung von PAP in *c-myc* induzierten Gehirntumoren bei Mäusen konnte inzwischen bestätigt werden, daß die Promotorregion des Gens eine *c-myc* Bindestelle enthält (Ben-Porath und Benvenisty, 1996). Die Bindung des Transkriptionsfaktor-Komplexes aus *c-myc* und *max* an die klonierte Region aus dem ersten Intron von *PAP* führte in einem *in-vitro*-Experiment zur Aktivierung eines Reportergens (Ben-Porath *et al.*, 1999). Außerdem wurde eine Teilsequenz von PAP bereits 1994 in einer Veröffentlichung erwähnt, die die Identifizierung von *c-myc* regulierten Serum-induzierten Genen der mittleren G1-Phase des Zellzyklus beschreibt (Tavtigian *et al.*, 1994).

C-myc ist nicht nur an Differenzierung und Apoptose beteiligt, sondern ist vor allem ein zentraler Regulator der Proliferation. Dies wurde dadurch belegt, daß seine konstitutive Expression zur Wachstumsfaktor-unabhängigen Zellteilung und umgekehrt die Blockierung von *c-myc* zur Hemmung der Proliferation führten (Henriksson und Luscher, 1996). Das Heterodimer aus den Proteinen *myc* und *max* bildet einen Transkriptionsfaktor, der die Expression zahlreicher Gene sowohl induzieren als auch reprimieren kann (Dang *et al.*, 1999; Facchini und Penn, 1998).

Durch Translokation in Immunglobulingene bei akuten B-Zell-Leukämien und beim Burkitt-Lymphom ist die Regulation der Expression von c-myc aufgehoben und führt zur unkontrollierten Proliferation. In soliden Tumoren (Lungen-, Kolon- und Mammakarzinom) treten häufig Amplifikationen des c-myc-Gens auf (Watson *et al.*, 1996).

Die Expression von c-myc wiederum unterliegt der Kontrolle des Östrogenrezeptors (ER), der durch die Bindung von Östrogen aktiviert wird (Dubik und Shiu, 1992). Während der Progression des Mammakarzinoms vom hormonabhängigen zum hormonunabhängigen Wachstum ist es deshalb möglich, daß die Expressionskontrolle von c-myc durch den Östrogenrezeptor verloren geht und somit eine konstitutive c-myc-Expression ebenfalls zur Progression des Tumors beitragen kann (Watson *et al.*, 1996). Da PAP in der ER-negativen Zelllinie MCF-7_{ADR} exprimiert wird, setzt dies voraus, daß c-myc hier nicht östrogenabhängig induziert wird.

4.2. Einfluß stabiler PAP-Expression auf Proliferation

Nachdem deutlich wurde, daß die Expression von PAP zellzyklusabhängig ist, ergab sich hieraus die Frage, ob nicht nur eine Korrelation, sondern ein kausaler Zusammenhang zwischen PAP-Expression und Zellzyklusverlauf vorliegt. Sollte PAP tatsächlich selbst einen Einfluß auf die Zellteilung haben, wäre zu erwarten gewesen, daß die konstitutive Expression von PAP in den stabil transfizierten Klonen also eher eine induktive als eine supprimierende Wirkung zeigen würde.

Die Bestimmung der Generationszeiten der PAP-transfizierten MCF-7-Klone läßt aber nicht auf einen ursächlichen Zusammenhang zwischen PAP-Expression und einer veränderten Zellteilungsrate schließen (Abbildung 21). Die Klone PAP7.17. und PAP9.6. wuchsen etwas langsamer als MCF-7-Wildtyp oder Mock-Transfektanten, während der Klon PAP4.1. eine unveränderte Generationszeit aufwies. Dies kann durch bereits in der Population der MCF-7-Zellen vorhandenen klonalen Diversität oder durch die unterschiedlichen Integrationsorte der Vektoren bedingt sein. Es bestand also in den drei untersuchten PAP-Klonen kein einheitliches Proliferationsverhalten, was somit keinen Schluß auf die Beeinflussung des zellulären Wachstums durch die PAP-Expression zuläßt.

5. Schlußfolgerungen und Entwicklung eines Modells für die Funktion von PAP

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Klärung der Frage, ob das Progressions-assoziierte Protein PAP einen Einfluß auf das Invasionsverhalten von Zellen nehmen und somit als ein Metastasierung-induzierendes Gen einen kausalen Faktor für die Progression des Mammakarzinoms darstellen kann.

Die hier gemachten Beobachtungen in Korrelations- und Funktionsstudien und der Vergleich mit Sequenz-homologen oder Struktur-homologen Proteinen können zwar nicht beweisen, daß PAP im komplexen Netzwerk des Metastasierungsprozesses tatsächlich eine Rolle spielt, geben aber trotzdem Anhaltspunkte, die auf eine mögliche Funktion des Proteins und eine Beeinflussung von zellulären Mechanismen schließen lassen.

Seit 1995 konnte in verschiedenen Studien eine Korrelation der PAP-Expression mit Prozessen der Differenzierung, Proliferation, Embryogenese und Metastasierung beobachtet werden, und es fällt auf, daß PAP immer wieder dort nachgewiesen wurde, wo Proliferation und Migration von Zellen eine Rolle spielen (s. Tabelle 4). So etwa bei der Entwicklung des ZNS, beim Auswachsen von Axonen oder bei der Regeneration eines verletzten Nervs des peripheren Nervensystems. Die Expression von PAP korreliert zudem mit der Invasivität von Mammakarzinomzelllinien. Metastasierung, die Entwicklung neuronaler Strukturen und das Auswachsen von Axonen sind zwei völlig verschiedene Vorgänge, die aber die Gemeinsamkeit haben auf die Bewegung von Zellen angewiesen zu sein.

Die Zellzyklus-abhängige PAP-Expression wurde inzwischen *in vitro* in verschiedenen Zellen belegt. Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, daß PAP an den proliferierenden Enden von regenerierenden peripheren Nerven exprimiert wird und scheint unter physiologischen Bedingungen der Kontrolle von *c-myc* zu unterliegen.

Wie kann nun ein Transmembranrezeptor mit geringen intrazellulären Anteilen für die Proliferation und Migration von Zellen eine Rolle spielen?

Die postulierte Topologie spricht eher für eine extrazelluläre Funktion oder für eine funktionelle Bedeutung der Transmembrandomänen sowie aufgrund der N-Glykosilierungsstellen für eine Funktion als Adhäsionsmolekül.

Untersuchter Prozeß	PAP-Expression nachgewiesen in	Literaturstelle
B-Zell-Reifung	Prä-B-Zellen	Ruegg <i>et al.</i> , 1996
Embryogenese	späte Strukturen des ZNS Auswachsende Neurite (Axone)	Wulf und Suter, 1999
Regeneration des PNS	proliferierende Enden nach Verletzung des Ischiasnervs bei Ratten	Taylor <i>et al.</i> , 1995
Zellzyklus	mittlere G1-Phase	Tavtigian <i>et al.</i> , 1996
	c-myc induziert	Ben-Porath und Benvenisty, 1996 Ben-Porath <i>et al.</i> , 1999
Metastasierung	invasive Mammkarzinom-Zelllinien	Schiemann <i>et al.</i> , 1997

Tabelle 4: Überblick über die unterschiedlichen Studien, in denen PAP identifiziert wurde.

Eine mögliche funktionelle Rolle von PAP bei Adhäsionsvorgängen läßt sich aus den Beobachtungen an transient transfizierten COS-7-Zellen ableiten. Durch die unkontrollierte Überexpression von PAP wurde ein Abrunden der adhärenen Zellen und ein Ablösen vom Substrat induziert. Ein ähnlicher Effekt wurde ebenfalls für das PAP-homologe PMP22 beschrieben.

Das Abrunden von Zellen tritt unter physiologischen Bedingungen unter anderem in der G2-Phase des Zellzyklus auf und macht hier einen Regulationsmechanismus notwendig, der die Deadhäsion und das Abrunden der Zellen genau kontrolliert. Ebenso muß eine strenge Kontrolle von Adhäsion und Deadhäsion vorliegen, wo Migrationsprozesse unter physiologischen Bedingungen eine Rolle spielen. Wäre dieser Mechanismus in malignen Zellen gestört, könnte das einen Vorteil für metastasierende Zellen aufgrund einer erleichterten Ablösung von der Basalmembran und ein erleichtertes Wandern durch die Extrazelluläre Matrix darstellen.

Sollte tatsächlich ein solcher Mechanismus von PAP reguliert oder zumindest beeinflusst werden, setzt dies zum einen in physiologischen Abläufen eine strenge Regulation der PAP-Expression voraus und zum anderen einen Mechanismus, der Zellen zum Loslösen von der Matrix und zur gleichzeitigen Umorganisation ihres Zytoskeletts bringen kann. Wenn durch eine erhöhte Expression von PAP die Adhäsion vermindert werden würde und PAP selbst diesen Effekt bedingen würde, so müßten die extrazellulären Domänen des Proteins entweder selbst proteolytische Eigenschaften haben, um die Zelle von den ECM-Komponenten zu lösen, oder eine abstoßende Wirkung auf die ECM ausüben. Ein abstoßender Effekt wäre aber mit Sicherheit nicht ausreichend, um andere Adhäsionsstrukturen aufzulösen und würde weitere Ereignisse erfordern. Etwa die Expression von Proteasen, die dann

durch Proteolyse die Ankerproteine zur ECM abspalten würden. Dies wiederum wäre ein energetisch aufwendiger, undynamischer und langsamer Prozeß, der ständig neue Biosynthese verlangen würde.

Da das Ablösen der Zellen durch eine Überexpression von PAP nicht in allen Zellen induzierbar zu sein scheint, wäre es denkbar, daß PAP mit einem anderen zelltypspezifischen Protein interagiert, welches im Endeffekt für das Loslösen und Abrunden der Zellen verantwortlich ist und PAP erst in einem solchen Komplex eine regulatorische oder stabilisierende Funktion wahrnimmt.

Sowohl für die Adhäsion von Zellen an die ECM als auch für die Organisation des Zytoskeletts sind in erster Linie Integrine verantwortlich. Somit würde sich für PAP eine mögliche Assoziation mit Integrinen anbieten. Diese These kann außerdem durch die Strukturhomologie von PAP zu Proteinen der CD81-Familie, die mit Integrinen interagieren, gestützt werden.

Integrine übernehmen wichtige signalvermittelnde Funktionen. Die Bindung über Integrine an ECM-Komponenten führt zu einer Stimulierung der Zellproliferation durch die Aktivierung von Signalkaskaden oder durch eine Verstärkung der Wirkung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Zudem führt die Aktivierung von Integrinen zu Veränderungen in der Organisation des Aktinzytoskeletts und Ausbildung fokaler Adhäsionsstrukturen („*outside-in-signaling*“) (Giancotti und Ruoslahti, 1999).

Die Aktivität von Integrinen wird allerdings oft durch intrazelluläre Signale moduliert, die zu einer veränderten Affinität zwischen Integrinen und ihren Liganden in der ECM führt („*inside-out-signaling*“) (Shattil *et al.*, 1998). Die Proteine können in einem hoch- und einem niedrig-affinen Zustand vorkommen. Strukturbiochemische Untersuchungen bestätigen, daß diese Zustände durch Konformationsänderungen in extrazellulären Domänen der Integrine reguliert werden (Emsley *et al.*, 2000). Für diese Konformationsänderungen werden zum einen zahlreiche intrazelluläre Bindeproteine verantwortlich gemacht, zum anderen aber auch lateral gelegene andere Membranproteine (Hughes und Pfaff, 1998). Für das Transmembranprotein CD98 konnte sogar bereits gezeigt werden, daß es β 1-Integrin-abhängige Zelladhäsion beeinflussen kann (Fenczik *et al.*, 1997). Es wäre also durchaus vorstellbar, daß ebenso eine Interaktion zwischen PAP und Integrinen einen Einfluß auf die Konformation und damit auf den Affinitätszustand des Integrins nimmt. Dabei muß nicht PAP selbst für die Konformationsänderung verantwortlich sein, sondern könnte ebenso für die Stabilisierung eines bestimmten (niedrig-affinen) Zustands notwendig sein.

Bisher ist nicht bekannt, daß die Veränderung der Affinität von Integrinen auch mit einer gesteigerten Motilität von Zellen assoziiert ist. Jedoch ist vorstellbar, daß durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den beiden Affinitätszuständen eines Integrins zugunsten des niedrig-affinen Rezeptors die Beweglichkeit einer Zelle erleichtert würde. Somit könnte eine unkontrollierte oder gesteigerte Expression eines Proteins (PAP), das den niedrig-affinen Zustand eines Integrins unterstützt oder induziert, zu einer gesteigerten Invasivität von Tumorzellen beitragen.

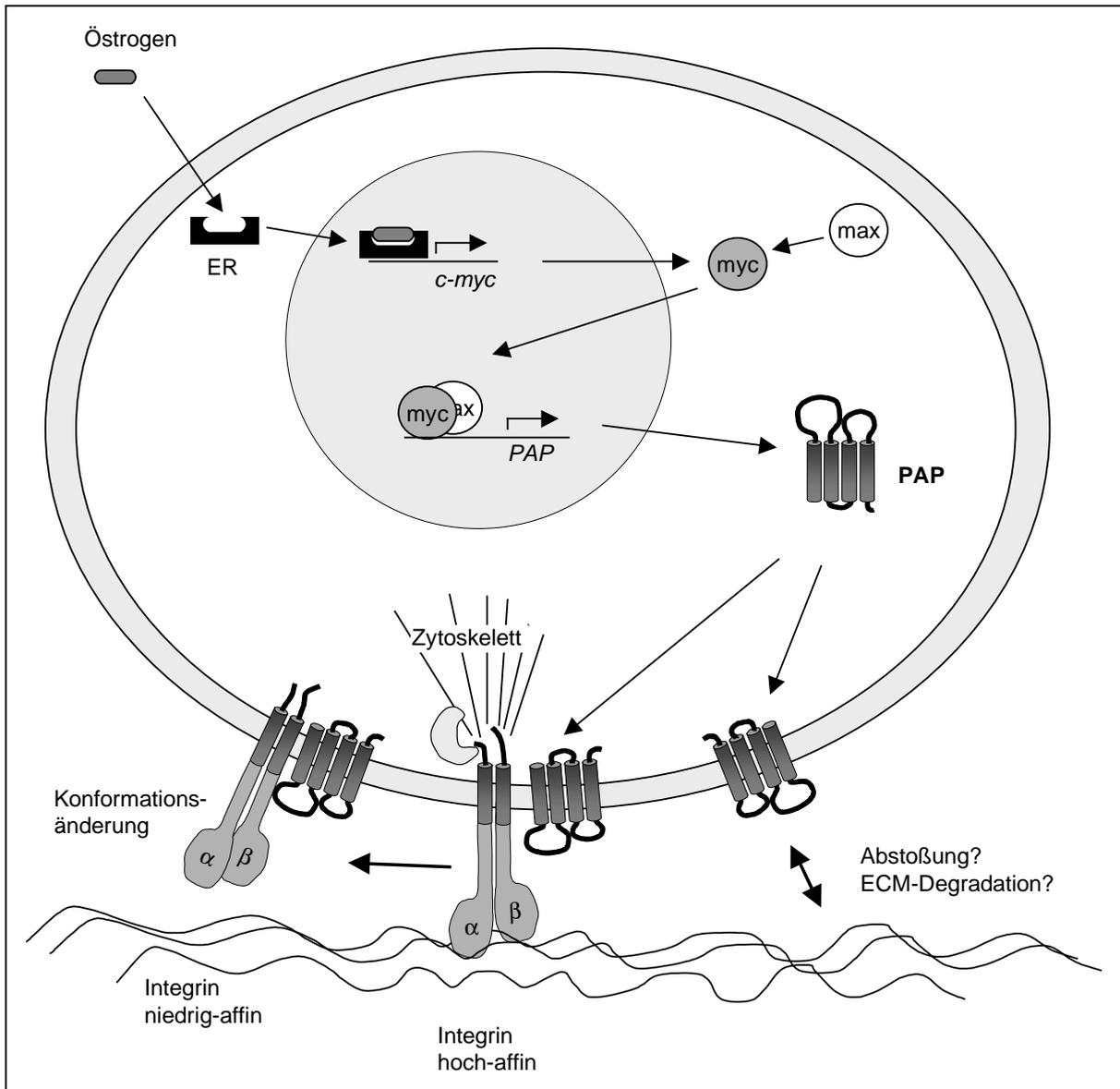


Abbildung 29: Hypothese zur Funktion von PAP bei einer Interaktion mit einem Integrin-Rezeptor. Die Interaktion von PAP mit einem Integrin an der Außenseite der Zelle könnte zu einer Stabilisierung des niedrig-affinen Konformationszustandes des Integrins führen und so eine Loslösung von der ECM induzieren.

Die kontrollierte Expression von PAP könnte dann unter physiologischen Bedingungen im Verlauf des Zellzyklus für die Überführung oder Stabilisierung im niedrig-affinen Zustand eines Integrins zur Loslösung der sich teilenden Zelle vom Substrat führen.

Würde durch Östrogen die Proliferation einer Zelle stimuliert, könnte dies zu einer Expression des Transkriptionsfaktors c-myc führen, der wiederum die Transkription von PAP induzieren kann. Die erhöhte Expression von PAP in mitotischen Zellen könnte dann an der Zellmembran eine vermehrte Interaktion mit einem Integrin-Rezeptor bedingen und dessen niedrig-affinen Zustand begünstigen. Dies würde schließlich zu einer Substratloslösung der Zellen führen (Abbildung 29).

Ebenso wäre die Expression von PAP dort erforderlich, wo Migrationsprozesse eine Rolle spielen und schnelle und kontrollierte Veränderungen in Integrin-abhängigen Adhäsionsvorgängen durch die Modulierung der Affinität bewerkstelligt wird.

6. Ausblick

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit und die veröffentlichten Studien anderer Arbeitsgruppen führten zu der Hypothese, daß PAP durch die Interaktion mit Integrinen die Adhäsion von Zellen an Substrate modifizieren kann. Dieser Mechanismus könnte sowohl bei der Zellteilung als auch bei Migrationsvorgängen eine Rolle spielen.

Fortführende Untersuchungen könnten nun gezielt dieser Annahme folgen und klären, ob PAP eine derartige Funktion wahrnehmen könnte. Wichtig wäre dabei zunächst zu verfolgen, ob die PAP-Expression tatsächlich bei der Zellteilung mit der Loslösung der Zellen in der G2-Phase korreliert. In synchronisierten Zellen müßte dann mehr PAP-Protein in G2-Phase-Zellen nachgewiesen werden können als in G1- und S-Phase-Zellen. Mit Hilfe spezifischer Antikörper könnte PAP-Protein auf der Zelloberfläche mittels Durchflußzytometrie gut quantifiziert werden. Gleichzeitig könnte untersucht werden, ob durch eine Blockierung der PAP-Expression, z.B. durch anti-sense-Moleküle, eine Verzögerung im Zellzyklus in der G2-Phase zu beobachten ist.

Um den Einfluß von PAP auf die Adhäsion von Zellen zu untersuchen wäre zunächst notwendig zu klären, ob PAP tatsächlich mit anderen Rezeptoren interagiert. Dies könnte durch Kopräzipitations-Studien in Zellen mit endogener PAP-Expression erfolgen. Es könnte dabei zunächst gezielt analysiert werden, ob PAP mit Laminin- und Fibronectin-Rezeptoren assoziiert ist, da sich MCF-7_{ADR} und MCF-7 in diesen Rezeptoren unterscheiden. Eine Überexpression von PAP in solchen Zellen, die das entsprechende Integrin und PAP endogen exprimieren, sollte zu einer Verminderung der Adhäsion an das Integrin-spezifische Substrat führen. Dieser Effekt müßte dagegen durch die Blockierung der PAP-Expression oder durch PAP-spezifische Antikörper wieder aufgehoben werden können.

Weitere Arbeiten mit invasiven Zelllinien könnten prüfen, ob mit Hilfe PAP-spezifischer Antikörper, die zuvor die Adhäsion vermindern konnten, auch die Invasivität der Zellen vermindert werden kann. Sollte dies in Systemen *in vitro* nachweisbar sein würde sich ebenfalls eine Untersuchung *in vivo* anbieten und es könnte geprüft werden, ob durch PAP-Inhibitoren die Invasivität von Tumoren eingeschränkt werden kann.

Interessant wären zudem Studien von PAP-Knock-out-Mäusen, die zeigen könnten, ob der Verlust von PAP zu Störungen während der Embryonalentwicklung in der Ausbildung des zentralen und peripheren Nervensystems führt. Würde PAP ähnlich wie PMP22 zu spezifischen Defekten in adulten Mäusen führen, würden sich neue Möglichkeiten der PAP-Funktion und eventuell die Beteiligung von PAP bei pathologischen Prozessen zeigen.

Literaturverzeichnis

- Adlkofer K**, Martini R, Aguzzi A, Zielasek J, Toyka KV, Suter U.: Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22-deficient mice. *Nat Genet.* 1995; 11: 274-80.
- Aitken SC**, Lippman ME, Kasid A, Schoenberg DR.: Relationship between the expression of estrogen-regulated genes and estrogen-stimulated proliferation of MCF-7 mammary tumor cells. *Cancer Res.* 1985; 45: 2608-15.
- Albini A**, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN.: A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.* 1987; 47: 3239-45.
- Al-Mehdi AB**, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ.: Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med.* 2000; 6: 100-2.
- Atkinson B**, Ernst CS, Ghrist BF, Herlyn M, Blaszczyk M, Ross AH, Herlyn D, Stepkowski Z, Koprowski H.: Identification of melanoma-associated antigens using fixed tissue screening of antibodies. *Cancer Res.* 1984; 44: 2577-81.
- Ben-Porath I**, Benvenisty N.: Characterization of a tumor-associated gene, a member of a novel family of genes encoding membrane glycoproteins. *Gene.* 1996; 183: 69-75.
- Ben-Porath I**, Yanuka O, Benvenisty N.: The tmp gene, encoding a membrane protein, is a c-Myc target with a tumorigenic activity. *Mol Cell Biol.* 1999; 19: 3529-39.
- Benvenisty N**, Ornitz DM, Bennett GL, Sahagan BG, Kuo A, Cardiff RD, Leder P.: Brain tumours and lymphomas in transgenic mice that carry HTLV-I LTR/c-myc and Ig/tax genes. *Oncogene.* 1992; 7: 2399-405.
- Berdichevski F**, Odintsova E.: Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *J Cell Biol.* 1999; 146: 477-92.
- Berg PE**, Sheffery M, King RS, Gong Y, Anderson WF.: The expression of integrated plasmid DNA depends on copy number. *Exp Cell Res.* 1987; 168: 376-88.
- Behrens J**, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W.: Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* 1989; 108: 2435-47.
- Birchmeier C**, Birchmeier W, Brand-Saberi B.: Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Acta Anat (Basel).* 1996; 156: 217-26.

- Bolin LM**, McNeil T, Lucian LA, DeVaux B, Franz-Bacon K, Gorman DM, Zurawski S, Murray R, McClanahan TK.: HNMP-1: a novel hematopoietic and neural membrane protein differentially regulated in neural development and injury.
J Neurosci. 1997; 17: 5493-502.
- Brancolini C**, Marzinotto S, Edomi P, Agostoni E, Fiorentini C, Muller HW, Schneider C.: Rho-dependent regulation of cell spreading by the tetraspan membrane protein Gas3/PMP22.
Mol Biol Cell. 1999; 10: 2441-59.
- Bracke ME**, Van Roy FM, Mareel MM.: The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis.
Curr Top Microbiol Immunol. 1996; 213: 123-61.
- Brancolini C**, Marzinotto S, Edomi P, Agostoni E, Fiorentini C, Muller HW, Schneider C.: Rho-dependent regulation of cell spreading by the tetraspan membrane protein Gas3/PMP22.
Mol Biol Cell. 1999; 10: 2441-59.
- Braun S**, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmuller G, Schlimok G.: Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer.
N Engl J Med. 2000; 342: 525-33.
- Brünnner N**, Thompson EW, Spang-Thomsen M, Rygaard J, Dano K, Zwiebel JA.: lacZ transduced human breast cancer xenografts as an in vivo model for the study of invasion and metastasis.
Eur J Cancer. 1992; 28A: 1989-95.
- Burnette WN.:** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.
Anal Biochem. 1981; 112: 195-203.
- Chan S. :** Docetaxel vs doxorubicin in metastatic breast cancer resistant to alkylating chemotherapy.
Oncology (Huntingt). 1997; 11: 19-24.
- Chance PF**, Alderson MK, Leppig KA, Lensch MW, Matsunami N, Smith B, Swanson PD, Odelberg SJ, Distèche CM, Bird TD. : DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies.
Cell. 1993; 72: 143-51.
- Chen Y**, Medvedev A, Ruzanov P, Marvin KW, Jetten AM. : cDNA cloning, genomic structure, and chromosome mapping of the human epithelial membrane protein CL-20 gene (EMP1), a member of the PMP22 family.
Genomics. 1997; 41: 40-8.
- Chomczynski P**, Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal Biochem. 1987; 162: 156-9.
- Church RL**, Wang JH.: The human lens fiber-cell intrinsic membrane protein MP19 gene: isolation and sequence analysis.
Curr Eye Res. 1993; 12: 1057-65.
- Claas C**, Seiter S, Claas A, Savelyeva L, Schwab M, Zoller M.: Association between the rat homologue of CO-029, a metastasis-associated tetraspanin molecule and consumption coagulopathy.
J Cell Biol. 1998; 141: 267-80.

Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ.: Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease.

J Clin Oncol. 1999; 17: 2639-48.

Coleman RE, Rubens RD.: The clinical course of bone metastases from breast cancer.

Br J Cancer. 1987; 55: 61-6.

Cook GA, Wilkinson DA, Crossno JT Jr, Raghov R, Jennings LK.: The tetraspanin CD9 influences the adhesion, spreading, and pericellular fibronectin matrix assembly of Chinese hamster ovary cells on human plasma fibronectin.

Exp Cell Res. 1999; 251: 356-71.

Coussens LM, Werb Z.: Matrix metalloproteinases and the development of cancer.

Chem Biol. 1996; 3: 895-904.

Dang CV, Resar LM, Emison E, Kim S, Li Q, Prescott JE, Wonsey D, Zeller K.

Function of the c-Myc oncogenic transcription factor.

Exp Cell Res. 1999; 253: 63-77.

Domagala W, Lasota J, Bartkowiak J, Weber K, Osborn M.: Vimentin is preferentially expressed in human breast carcinomas with low estrogen receptor and high Ki-67 growth fraction.

Am J Pathol. 1990; 136: 219-27.

Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, Barrett JC.: KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2.

Science. 1995; 268: 884-6.

Dony C, Gruss P.: Proto-oncogene c-fos expression in growth regions of fetal bone and mesodermal web tissue.

Nature. 1987; 328: 711-4.

Dubik D, Shiu RP.: Mechanism of estrogen activation of c-myc oncogene expression.

Oncogene. 1992; 7: 1587-94.

Eisen A, Weber BL.: Recent advances in breast cancer biology.

Curr Opin Oncol. 1998; 10: 486-91.

Elston CW, Ellis IO.: Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up.

Histopathology. 1991; 19: 403-10.

Emsley J, Knight CG, Fardale RW, Barnes MJ, Liddington RC.: Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1.

Cell. 2000; 101: 47-56.

Fabbretti E, Edomi P, Brancolini C, Schneider C.: Apoptotic phenotype induced by overexpression of wild-type gas3/PMP22: its relation to the demyelinating peripheral neuropathy CMT1A.

Genes Dev. 1995; 9: 1846-56.

Facchini LM, Penn LZ.: The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights.
FASEB J. 1998; 12: 633-51.

Fairchild CR, Ivy SP, Kao-Shan CS, Whang-Peng J, Rosen N, Israel MA, Melera PW, Cowan KH, Goldsmith ME.: Isolation of amplified and overexpressed DNA sequences from adriamycin-resistant human breast cancer cells.
Cancer Res. 1987; 47: 5141-8.

Fearon ER, Vogelstein B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis.
Cell. 1990; 61: 759-67.

Felding-Habermann B, Mueller BM, Romerdahl CA, Cheresch DA.: Involvement of integrin alpha V gene expression in human melanoma tumorigenicity.
J Clin Invest. 1992; 89: 2018-22.

Fenczik CA, Sethi T, Ramos JW, Hughes PE, Ginsberg MH.: Complementation of dominant suppression implicates CD98 in integrin activation.
Nature. 1997; 390: 81-5.

Fidler IJ, Hart IR.: Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications.
Science. 1982; 217: 998-1003.

Fidler IJ.: Rationale and methods for use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis.
Cancer Metastasis Rev. 1986; 5: 29-49.

Friedrichs K, Ruiz P, Franke F, Gille I, Terpe HJ, Imhof BA.: High expression level of alpha 6 integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival.
Cancer Res. 1995; 55: 901-6.

Giancotti FG, Ruoslahti E.: Integrin signaling.
Science. 1999; 285: 1028-32.

Gottesman MM, Pastan I: The multidrug transporter, a double-edge sword.
J Biol Chem. 1988; 263: 12168-12166.

Gron Dahl-Hansen J, Christensen IJ, Rosenquist C, Brunner N, Mouridsen HT, Dano K, Blichert-Toft M.: High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis.
Cancer Res. 1993; 53: 2513-21.

Hanahan D, Folkman J.: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.
Cell. 1996; 86: 353-64.

Hanks SK, Polte TR.: Signaling through focal adhesion kinase.
Bioessays. 1997; 19: 137-45.

Harris AL.: Antiangiogenesis for cancer therapy.
Lancet. 1997; 349: SIII3-5.

Hay ED.: An overview of epithelio-mesenchymal transformation.
Acta Anat (Basel). 1995; 154: 8-20.

Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Trevor KT.: Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior.
Am J Pathol. 1997; 150: 483-95.

Henriksson M, Luscher B.: Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation.
Adv Cancer Res. 1996; 68: 109-82.

Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH.: Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response.
Am J Pathol. 1996; 149: 273-82.

Holst-Hansen C, Johannessen B, Hoyer-Hansen G, Romer J, Ellis V, Brunner N.: Urokinase-type plasminogen activation in three human breast cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness.
Clin Exp Metastasis. 1996; 14: 297-307.

Hughes PE, Pfaff M.: Integrin affinity modulation.
Trends Cell Biol. 1998; 8: 359-64.

Hühne K, Park O, Liehr T, Rautenstrauss B.: Expression analysis of the PMP22 gene in glioma and osteogenic sarcoma cell lines.
J Neurosci Res. 1999; 58: 624-31.

Hupperets PS, Volovics L, Schouten LJ, Jager JJ, Schouten HC, Hillen HF, Blijham GH.: The prognostic significance of steroid receptor activity in tumor tissues of patients with primary breast cancer.
Am J Clin Oncol. 1997; 20: 546-51.

Huttenlocher A, Ginsberg MH, Horwitz AF.: Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity.
J Cell Biol. 1996; 134: 1551-62.

Hynes RO.: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.
Cell. 1992; 69: 11-25.

Jänicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Hofler H, Graeff H.: Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer.
Breast Cancer Res Treat. 1993; 24: 195-208.

Juliano RL, Ling V.: A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.
Biochim Biophys Acta. 1976; 455: 152-62.

Kantor JD, Zetter BR.: Cell motility in breast cancer.
Cancer Treat Res. 1996; 83: 303-23.

Kaye SB.: Multidrug resistance: clinical relevance in solid tumours and strategies for circumvention.
Curr Opin Oncol. 1998; 10: S15-9.

Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR.: Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry*. 1986; 25: 312-8.

Knight WA, Livingston RB, Gregory EJ, McGuire WL.: Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res*. 1977; 37: 4669-71.

Kozak M.: Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*. 1986; 44: 283-92.

Kunemund V, Jungalwala FB, Fischer G, Chou DK, Keilhauer G, Schachner M.: The L2/HNK-1 carbohydrate of neural cell adhesion molecules is involved in cell interactions. *J Cell Biol*. 1988; 106: 213-23.

Laemmli UK.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-5.

Lee SW, Tomasetto C, Paul D, Keyomarsi K, Sager R.: Transcriptional downregulation of gap-junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines. *J Cell Biol*. 1992; 118: 1213-21.

Liapis H, Flath A, Kitazawa S.: Integrin alpha V beta 3 expression by bone-residing breast cancer metastases. *Diagn Mol Pathol*. 1996; 5: 127-35.

Liehr T, Park O, Feuerstein BG, Gebhart E, Rautenstrauss B.: The peripheral myelin protein 22 kDa (PMP22) gene is amplified in cell lines derived from glioma and osteosarcoma: a new candidate for an oncogene? *Int J Oncol*. 1997; 10: 915-919.

Linderholm B, Lindh B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R.: p53 and vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) expression predicts outcome in 833 patients with primary breast carcinoma. *Int J Cancer*. 2000; 89: 51-62.

Lippman M, Bolan G, Huff K.: The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Res*. 1976; 36: 4595-601.

Lobsiger CS, Magyar JP, Taylor V, Wulf P, Welcher AA, Program AE, Suter U.: Identification and characterization of a cDNA and the structural gene encoding the mouse epithelial membrane protein-1. *Genomics*. 1996; 36: 379-87.

Ludwig WD, Reiter A, Loffler H, Gokbuget, Hoelzer D, Riehm H, Thiel E.: Immunophenotypic features of childhood and adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): experience of the German Multicentre Trials ALL-BFM and GMALL. *Leuk Lymphoma*. 1994; 13: 71-6.

Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC.: Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol*. 1998; 153: 865-73.

- Maecker HT**, Todd SC, Levy S.: The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J.* 1997; 11: 428-42.
- Manfioletti G**, Ruaro ME, Del Sal G, Philipson L, Schneider C.: A growth arrest-specific (gas) gene codes for a membrane protein. *Mol Cell Biol.* 1990; 10: 2924-30.
- Marvin KW**, Fujimoto W, Jetten AM.: Identification and characterization of a novel squamous cell-associated gene related to PMP22. *J Biol Chem.* 1995; 270: 28910-6.
- McGuire WL**.: Prognostic factors in primary breast cancer. *Cancer Surv.* 1986; 5: 527-36.
- Mitjans F**, Sander D, Adan J, Sutter A, Martinez JM, Jaggle CS, Moyano JM, Kreysch HG, Piulats J, Goodman SL.: An anti-alpha v-integrin antibody that blocks integrin function inhibits the development of a human melanoma in nude mice. *J Cell Sci.* 1995; 108: 2825-38.
- Moustafa AS**, Nicolson GL.: Breast cancer metastasis-associated genes: prognostic significance and therapeutic implications. *Oncol Res.* 1997; 9: 505-525.
- Mukhopadhyay D**, Tsiokas L, Sukhatme VP.: Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res.* 1995; 55: 6161-5.
- Mundy GR**, Yoneda T.: Facilitation and suppression of bone metastasis. *Clin Orthop.* 1995; 312: 34-44.
- Murphy G**, Knäuper V.: Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? *Matrix Biol.* 1997; 15: 511-8.
- Naef R**, Suter U.: Many facets of the peripheral myelin protein PMP22 in myelination and disease. *Microsc Res Tech.* 1998; 41: 359-71.
- Naor D**, Sionov RV, Zahalka M, Rochman M, Holzmann B, Ish-Shalom D.: Organ-specific requirements for cell adhesion molecules during lymphoma cell dissemination. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1998; 231: 143-66.
- Nicolson GL**, Dulski KM, Trosko JE.: Loss of intercellular junctional communication correlates with metastatic potential in mammary adenocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85: 473-6.
- Nicolson GL**, Gallick GE, Dulski KM, Spohn WH, Lembo TM, Tainsky MA.: Lack of correlation between intercellular junctional communication, p21rasEJ expression, and spontaneous metastatic properties of rat mammary cells after transfection with c-H-rasEJ or neo genes. *Oncogene.* 1990; 5: 747-53.
- Nicolson GL**.: Gene expression, cellular diversification and tumor progression to the metastatic phenotype. *Bioassays.* 1991; 13: 337-42.

Niemann S, Sereda MW, Rossner M, Stewart H, Suter U, Meinck HM, Griffiths IR, Nave KA.: The "CMT rat": peripheral neuropathy and dysmyelination caused by transgenic overexpression of PMP22. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 883: 254-61.

Nishikura K, ar-Rushdi A, Erikson J, Watt R, Rovera G, Croce CM.: Differential expression of the normal and of the translocated human c-myc oncogenes in B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983; 80: 4822-6.

Miyake M, Nakano K, Ieki Y, Adachi M, Huang CL, Itoi S, Koh T, Taki T.: Motility related protein 1 (MRP-1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. **Cancer Res.** 1995; **55**: 4127-31.

Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada KM.: Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol.* 1996; 135: 1633-42.

Ogretmen B und Safa AR.: Expression of the mutated p53 tumor suppressor protein and its molecular and biochemical characterization in multidrug resistant MCF-7/ADR human breast cancer cells. *Oncogene.* 1997; 14: 499-506.

Parmantier E, Braun C, Thomas JL, Peyron F, Martinez S, Zalc B.: PMP-22 expression in the central nervous system of the embryonic mouse defines potential transverse segments and longitudinal columns. *J Comp Neurol.* 1997; 378: 159-72.

Patel PI, Roa BB, Welcher AA, Schoener-Scott R, Trask BJ, Pentao L, Snipes GJ, Garcia CA, Francke U, Shooter EM: The gene for the peripheral myelin protein PMP-22 is a candidate for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet.* 1992; 1: 159-65.

Pietras RJ, Pegram MD, Finn RS, Maneval DA, Slamon DJ.: Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. *Oncogene.* 1998; 17: 2235-49.

Prechtl A, Harbeck N, Thomssen C, Meisner C, Braun M, Untch M, Wieland M, Lisboa B, Cufer T, Graeff H, Selbmann K, Schmitt M, Janicke F.: Tumor-biological factors uPA and PAI-1 as stratification criteria of a multicenter adjuvant chemotherapy trial in node-negative breast cancer. *Int J Biol Markers.* 2000; 15: 73-8.

Represa J, Leon Y, Miner C, Giraldez F.: The int-2 proto-oncogene is responsible for induction of the inner ear. *Nature.* 1991; 353: 561-3.

Reuning U, Magdolen V, Wilhelm O, Fischer K, Lutz V, Graeff H, Schmitt M.: Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review). *Int J Oncol.* 1998; 13: 893-906.

Roa BB, Dyck PJ, Marks HG, Chance PF, Lupski JR.: Dejerine-Sottas syndrome associated with point mutation in the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene. *Nat Genet.* 1993; 5: 269-73.

Roberts CW, Shutter JR, Korsmeyer SJ.: Hox11 controls the genesis of the spleen. *Nature*. 1994; 368: 747-9.

Ruegg CL, Wu HY, Fagnoni FF, Engleman EG, Laus R.: B4B, a novel growth-arrest gene, is expressed by a subset of progenitor/pre-B lymphocytes negative for cytoplasmic mu-chain. *J Immunol*. 1996; 157: 72-80.

Sander EE, Collard JG.: Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. *Eur J Cancer*. 1999; 35: 1905-11.

Sauer H (Hrsg.): Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Mammakarzinome Tumorzentrum München. 7. Auflage 1998.

Schachner M, Martini R.: Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. *Trends Neurosci*. 1995; 18: 183-91.

Schiemann S, Schwirzke M, Brunner N, Weidle UH.: Molecular analysis of two mammary carcinoma cell lines at the transcriptional level as a model system for progression of breast cancer. *Clin Exp Metastasis*. 1998; 16: 129-39.

Schiemann S, Ruckels M, Engelholm LH, Schwirzke M, Brunner N, Weidle UH.: Differential gene expression in human mammary carcinoma cells: identification of a new member of a receptor family. *Anticancer Res*. 1997 (a); 17: 13-20.

Schiemann S, Valentine M, Weidle UH.: Assignment of the human progression associated protein (PAP) to chromosome 12p12.3. *Anticancer Res*. 1997 (b); 17: 4281-5.

Schwirzke M, Schiemann S, Gnirke AU, Weidle UH.: New genes potentially involved in breast cancer metastasis. *Anticancer Res*. 1999; 19: 1801-14.

Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N.: Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood*. 1998; 91: 2645-57.

Shaw LM. : Integrin function in breast carcinoma progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1999; 4: 367-76.

Snipes GJ, Suter U, Shooter EM.: Human peripheral myelin protein-22 carries the L2/HNK-1 carbohydrate adhesion epitope. *J Neurochem*. 1993; 61: 1961-4.

Sommers CL, Heckford SE, Skerker JM, Worland P, Torri JA, Thompson EW, Byers SW, Gelmann EP.: Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriamycin- and vinblastine-resistant human breast cancer cell lines. *Cancer Res*. 1992; 52: 5190-7.

Sommers CL, Byers SW, Thompson EW, Torri JA, Gelmann EP.: Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. 1994; 31: 325-35.

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M.: A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1973; 51: 1409-16.

Spreyer P, Kuhn G, Hanemann CO, Gillen C, Schaal H, Kuhn R, Lemke G, Muller HW.: Axon-regulated expression of a Schwann cell transcript that is homologous to a 'growth arrest-specific' gene. *EMBO J.* 1991; 10: 3661-8.

Sterk LM, Geuijen CA, Oomen LC, Calafat J, Janssen H, Sonnenberg A.: The Tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin $\alpha 6 \beta 4$ and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *J Cell Biol.* 2000; 149: 969-982.

Sternlicht MD, Lochter A, Sympton CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, Pinkel D, Bissell MJ, Werb Z.: The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell.* 1999; 98: 137-46.

Stipp CS, Hemler ME.: Transmembrane-4-superfamily proteins CD151 and CD81 associate with $\alpha 3 \beta 1$ integrin, and selectively contribute to $\alpha 3 \beta 1$ -dependent neurite outgrowth. *J Cell Sci.* 2000; 113: 1871-1882.

Sugiura T, Berditchevski F.: Function of $\alpha 3 \beta 1$ -tetraspanin protein complexes in tumor cell invasion. Evidence for the role of the complexes in production of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). *J Cell Biol.* 1999; 146: 1375-89.

Suter U, Snipes GJ.: Peripheral myelin protein 22: facts and hypotheses. *J Neurosci Res.* 1995; 40: 145-51.

Sutherland RL, Green MD, Hall RE, Reddel RR, Taylor IW.: Tamoxifen induces accumulation of MCF 7 human mammary carcinoma cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1983; 19: 615-21.

Swain SM, Whaley FS, Gerber MC, Weisberg S, York M, Spicer D, Jones SE, Wadler S, Desai A, Vogel C, Speyer J, Mittelman A, Reddy S, Pendergrass K, Velez-Garcia E, Ewer MS, Bianchini JR, Gams RA.
Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. *J Clin Oncol.* 1997; 15: 1318-32.

Tavtigian SV, Zabludoff SD, Wold BJ.: Cloning of mid-G1 serum response genes and identification of a subset regulated by conditional myc expression. *Mol Biol Cell.* 1994; 5: 375-88.

Taylor V, Welcher AA, Program AE, Suter U.: Epithelial membrane protein-1, peripheral myelin protein 22, and lens membrane protein 20 define a novel gene family. *J Biol Chem.* 1995; 270: 28824-33.

Taylor V, Suter U.: Epithelial membrane protein-2 and epithelial membrane protein-3: two novel members of the peripheral myelin protein 22 gene family. *Gene.* 1996; 175: 115-20.

Testa JE, Brooks PC, Lin JM, Quigley JP.: Eukaryotic expression cloning with an antimetastatic monoclonal antibody identifies a tetraspanin (PETA-3/CD151) as an effector of human tumor cell migration and metastasis. *Cancer Res.* 1999; 59: 3812-20.

Thompson EW, Paik S, Brunner N, Sommers CL, Zugmaier G, Clarke R, Shima TB, Torri J, Donahue S, Lippman ME.: Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol.* 1992; 150: 534-44.

Uyemura K.: Functional glycoproteins expressed in Schwann cell membrane. *Neurosci Res.* 1993; 16: 9-13.

Van Aelst L, D'Souza-Schorey C.: Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 1997; 11: 2295-322.

Vickers PJ, Dickson RB, Shoemaker R, Cowan KH.: A multidrug-resistant MCF-7 human breast cancer cell line which exhibits cross-resistance to antiestrogens and hormone-independent tumor growth in vivo. *Mol Endocrinol.* 1988; 2: 886-92.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL.: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988; 319: 525-32.

Wagener, C.: Molekulare Onkologie
1999; Thieme Verlag, Stuttgart.

Watson PH, Singh R, Hole AK.: Influence of c-myc on the progression of human breast cancer. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; 213: 267-83.

Weidle UH, Buckel P, Wienberg J.: Amplified expression constructs for human tissue-type plasminogen activator in Chinese hamster ovary cells: instability in the absence of selective pressure. *Gene.* 1988; 66: 193-203.

Weidle UH, Wollisch E, Ronne E, Ploug M, Behrendt N, de Vries TJ, Quax PH, Verheijen JH, van Muijen GN, Ruiter DJ: Studies on functional and structural role of urokinase receptor and other components of the plasminogen activation system in malignancy. *Ann Biol Clin (Paris).* 1994; 52: 775-82.

Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G.: Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1992; 84: 1875-87.

Welcher AA, Suter U, De Leon M, Snipes GJ, Shooter EM.: A myelin protein is encoded by the homologue of a growth arrest-specific gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88: 7195-9.

Westermarck J, Kähäri VM.: Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 1999; 13: 781-92.

Wigler M, Silverstein S, Lee LS, Pellicer A, Cheng Yc, Axel R.: Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell.* 1977; 11: 223-32.

Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA.: General mechanisms of metastasis. *Cancer.* 1997; 80: 1529-37.

Wulf P, Suter U.: Embryonic expression of epithelial membrane protein 1 in early neurons.
Brain Res Dev Brain Res. 1999; 116: 169-80.

Yamakita Y, Totsukawa G, Yamashiro S, Fry D, Zhang X, Hanks SK, Matsumura F.: Dissociation of FAK/p130(CAS)/c-Src complex during mitosis: role of mitosis-specific serine phosphorylation of FAK.
J Cell Biol. 1999; 144: 315-24.

Yamashita J, Ogawa M, Yamashita S, Nomura K, Kuramoto M, Saishoji T, Shin S.: Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer.
Cancer Res. 1994; 54: 1630-3.

Zoidl G, D'Urso D, Blass-Kampmann S, Schmalenbach C, Kuhn R, Muller HW.: Influence of elevated expression of rat wild-type PMP22 and its mutant PMP22Trembler on cell growth of NIH3T3 fibroblasts.
Cell Tissue Res. 1997; 287: 459-70.

Zoidl G, Blass-Kampmann S, D'Urso D, Schmalenbach C, Muller HW.: Retroviral-mediated gene transfer of the peripheral myelin protein PMP22 in Schwann cells: modulation of cell growth.
EMBO J. 1995; 14: 1122-8.

Eigene Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Gnirke AU, Weidle UH: Investigation of prevalence and regulation of expression of progression associated protein (PAP).

Anticancer Res 1998; 18: 4363-4369.

Schwirzke M, Gnirke A, Bork P, Tarin D, Weidle UH: Differential gene expression in mammary carcinoma cell lines: identification of DRIM, a new gene down-regulated in metastasis.

Anticancer Res 1998; 18: 1409-1421.

Schwirzke M, Schiemann S, Gnirke AU, Weidle UH: New genes potentially involved in breast cancer metastasis.

Anticancer Res 1999; 19: 1801-1814.

Posterpräsentation

1998 Meeting on Cancer Genetics and Tumor Suppressor Genes, 19.08. – 23.08.1998, Cold Spring Harbor, NY

Gnirke, AU und Weidle, UH: Expression of PAP – a newly discovered receptor – correlates with cell proliferation.

Vortrag

Dechema Jahrestagungen '98, 26.05. – 28.05.1998, Wiesbaden

16. Jahrestagung der Biotechnologen

Gnirke, AU und Weidle, UH: Identification of new tumor progression genes – implication for diagnosis and therapy.

Danksagung

Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß danke ich sehr für die Erstellung des Erstgutachtens, für ihr stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und ihre konstruktive Kritik.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Weiher möchte ich mich für die spontane Übernahme des Koreferates bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. U. H. Weidle für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit.

Bei meinen Laborkolleginnen Alexandra Daser, Karin Gaus, Christiane Hartl sowie bei Dr. Michael Weidner möchte mich ganz besonders für die tolle Laboratmosphäre und für die technischen, theoretischen und „menschlichen“ Hilfestellungen bedanken.

Wichtig zum Überleben als Doktorand in Penzberg waren vor allem meine Mitdoktoranden Dr. Andreas Machl, Dr. Anja Haussmann, Dr. Barbara Zehentner, Bettina Gansneder, Christian Klein, Dirk Demuth, Dr. Jochen Peter, Josef Preiherr, Katrin Sichler, Dr. Markus Rückels, Nesrine Tarbé, Robert DeLange, Dr. Somine Planitzer-Hagehülsmann, Dr. Stephan Reschauer, Tanja Ligensa, Tanja Schneider, Thorsten Gutjahr, Thorsten Hövel, Tobias Hildebrandt und Vesna Evtimova. Vielen Dank für die fachlichen und oft auch privaten Gespräche, die mir sehr geholfen haben („geteiltes Leid halbes Leid“).

Beigetragen zum Gelingen dieser Arbeit hat vor allem auch die Unterstützung durch Marina Schwirzke und durch die Mitarbeiter der Abteilung Dr. Anne Stern. Vielen Dank!

Bei Herrn Prof. Dr. Manfred Kubbies möchte ich mich für die sehr hilfreiche Unterstützung bei den FACS-Analysen und den Immunfluoreszenz-Versuchen herzlich bedanken.

Bei Herrn Dr. Nils Brünner und seinen Mitarbeitern bedanke ich mich für die Bereitstellung mehrerer Zelllinien, für die Durchführung der Tierexperimente und für die freundliche Aufnahme in seinem Labor. Vor allem danke ich Bente Johannessen für die Hilfe bei den Invasionstests.

Für die hier gewonnenen Freunde Nicole, Simone, Anja, Barbara, Tanja, Erica, Thorsten, André, Andreas, Jochen, Jörg, Brian, Markus und Josef bin ich zutiefst dankbar. Ihr wart mir eine unerlässliche Stütze und Hilfe in vielen Lagen und ich werde Euch immer dankbar dafür sein. Ihr habt mir geholfen das Leben neben der Doktorarbeit zu genießen; es hätte wohl nicht besser sein können!!!

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für die Ermöglichung meines Studiums. Vor allem aber danke ich ihnen, meinen Schwestern Katharina und Gisela und vor allem Frank für die Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir gegeben haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, daß die vorliegende Arbeit von mir selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Penzberg, 19. Juni 2000

Lebenslauf

Name: Andrea Ursula Gnirke
Geburtsdatum: 2. März 1971
Geburtsort: Groß-Umstadt
Familienstand: ledig

Schulbildung

1977 – 1981 Grundschule Groß-Bieberau
1981 – 1984 Förderstufe der Albert-Einstein-Schule Groß-Bieberau
1984 – 1990 Gymnasium der Albert-Einstein-Schule Groß-Bieberau
1990 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/1990 – 05/1995 Biologie-Studium an der Technischen Universität Darmstadt
06/1995 – 12/1995 Diplomarbeit an der Technischen Universität Darmstadt
Titel der Diplomarbeit: „Charakterisierung eines Antikörpers gegen die 5-Oxo-L-prolinase und Reinigung des Enzyms zur Sequenzanalyse“, angefertigt am Institut für Biochemie unter Anleitung von Prof. Dr. H. G. Gassen
seit 05/1996 Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität, Fakultät für Biologie
Titel der Doktorarbeit: „Studien zur zellbiologischen Funktion des „Progressions-assoziierten Proteins“ (PAP) und dessen Bedeutung für die Invasivität von Mammakarzinomzellen“, angefertigt am Institut für Anthropologie und Humangenetik unter Anleitung von Prof. Dr. E. H. Weiß;
Durchführung der praktischen Arbeiten bei der Roche Diagnostics GmbH, Pharma Forschung Penzberg, unter Anleitung von Prof. Dr. U. H. Weidle
