

Aus dem Institut für Immunologie
der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. rer.nat. Thomas Brocker

**Proteasenexpression einzelner disseminierter Tumorzellen aus Lymphknoten
und Knochenmark von Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sabine Schilling
aus Schechen

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
Universität München

Berichterstatter:

1. PD Dr. med. C. Klein
2. Prof. Dr.med. C. Sommerhoff

Mitberichterstatter:

1. PD Dr. med. G. Meinhardt
2. PD Dr. med. A. Lebeau

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dekan:

Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung:

21.04.2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	8
1.1	Das Bronchialkarzinom	8
1.1.1	Epidemiologie	8
1.1.2	Einteilung	8
1.1.3	Stadieneinteilung	10
1.1.4	Pathogenese	10
1.2	Die minimale residuale Tumorerkrankung	11
1.3	Die extrazelluläre Matrix (EZM)	12
1.4	Die Rolle von Proteasen bei der Disseminierung	12
1.5	Inhibitoren.....	14
1.6	Klassifikation der für Tumorprogression und Metastasierung wichtigen Proteasen.....	16
1.7	Expressionsanalysen mithilfe von cDNA-Arrays	19
1.8	Aufgabenstellung und Zielsetzung	19
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Material	21
2.1.1	Puffer und sonstige Lösungen.....	21
2.1.2	Chemikalien.....	24
2.1.3	Enzyme	25
2.1.4	Antikörper.....	26
2.1.5	Agarplatten.....	26
2.1.6	Plasmide	26
2.1.7	Geräte.....	26
2.1.8	Oligonukleotide	27
2.2	Methoden.....	33
2.2.1	Herstellung von pBS/E.coli-Blockierungs-DNA	33
2.2.2	Herstellung kompetenter Bakterien	33
2.2.3	Isolation und Amplifikation neuer Sonden.....	33
2.2.4	Gelelektrophorese	36
2.2.5	Extraktion der DNA aus dem Agarosegel.....	37
2.2.6	Konzentrationsbestimmung	37
2.2.7	Ligation.....	37
2.2.8	Transformation.....	37

2.2.9	Klonierung/ Kontroll-PCR mit M13-Primern.....	37
2.2.10	Plasmid – Präparation.....	39
2.2.11	Amplifikation des Inserts.....	39
2.2.12	Restriktionsverdau.....	40
2.2.13	Auftragen der Sonden auf die Nylonmembranen.....	40
2.2.14	Patientenproben.....	41
2.2.15	Anreicherung	41
2.2.16	Färbung	42
2.2.17	Isolierung EpCAM-positiver Zellen.....	43
2.2.18	cDNA-Synthese	43
2.2.19	Amplifikation.....	44
2.2.20	Kontroll-PCR	46
2.2.21	Digoxigenin-Markierung.....	47
2.2.22	Prähybridisierung der Arrays	48
2.2.23	Hybridisierung der Arrays.....	48
2.2.24	Waschen der Arrays.....	48
2.2.25	Blockieren unspezifischer Antikörperbindungsstellen.....	49
2.2.26	Entwicklung mit dem „Dig Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids“.	49
2.2.27	Ablösen der gebundenen cDNA.....	49
2.2.28	Auswertung der Arrays	49
2.2.29	Statistik.....	50
3	Ergebnisse.....	51
3.1	Detektion und Isolierung einzelner disseminierter Tumorzellen aus Knochenmark und Lymphknoten.....	51
3.1.1	Vergleich der Detektionsraten in der Lebendfärbung und auf Haftobjektträgern (HOT).....	51
3.1.2	Detektionsrate EpCAM-positiver Zellen in Abhängigkeit von Histologie sowie pTNM-Status im Knochenmark bzw. in Lymphknoten.....	54
3.1.3	Beispiel für die Isolierung einer Tumorzelle	54
3.1.4	Häufigkeit von Aggregaten in Lymphknoten und Knochenmark.....	55
3.2	Kontrolle der globalen Amplifikation des Einzelzelltranskriptoms und Austestung von zwei verschiedenen Terminalen Desoxynukleotidtransferasen....	56
3.2.1	Expressionsnachweis von Haushaltsgenen und epithelialen Markern (Kontroll-PCR).....	56

3.2.2	Vergleich der Ergebnisse der Kontroll-PCR mit den Arrayergebnissen...	59
3.2.3	Vergleich von zwei Terminalen Desoxynukleotidtransferasen verschiedener Hersteller	59
3.3	Herstellung der Proteasenarrays	61
3.3.1	Isolierung der Sonden-cDNA aus Zelllinien-cDNA an einem Beispiel.....	62
3.3.2	Ligation, Klonierung und Auswahl der Klone sowie Plasmidpräparation an einem Beispiel.....	63
3.3.3	Abschließende Amplifikation an einem Beispiel.....	64
3.3.4	Restriktionsverdau der neuen Sonden.....	64
3.3.5	Klonierung der nicht kodierenden cDNA-Sonde „x“	66
3.4	Hybridisierungsergebnisse	66
3.4.1	Expression der untersuchten Moleküle	68
3.4.2	Höhe der Proteasen- und Inhibitorenexpression in Einzelzellen und Aggregaten	75
3.4.3	Proteasenexpression in Abhängigkeit von der Tumorhistologie.....	75
4	Diskussion.....	77
4.1	Methodische Gesichtspunkte	77
4.1.1	Tumorzellisolierung	77
4.1.2	Globale Amplifikation des Einzelzelltranskriptoms.....	79
4.1.3	Kontroll-PCR.....	80
4.1.4	Vor- und Nachteile der selbst hergestellten Nylonarrays	80
4.2	Validierung des epithelialen und neoplastischen Ursprung der isolierten Zellen.....	81
4.2.1	Zytokeratine	81
4.2.2	MAGE (Melanomantigen E).....	81
4.2.3	Karzinomembryonales Antigen (CEA).....	82
4.3	Proteasenexpression in den untersuchten Einzelzellen und Mikroaggregaten..	82
4.3.1	UPA/ uPAR.....	82
4.3.2	Bikunin.....	83
4.3.3	MMP	84
4.3.4	Cathepsine.....	85
4.3.5	Kallikreine	86
4.4	Zusammenfassung.....	86

5 Literatur 88

Abkürzungsverzeichnis

cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CA	Karzinom
CGH	Komparative Genomische Hybridisierung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
EZM	Extrazelluläre Matrix
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HOT	Haftobjektträger
KM	Knochenmark
LK	Lymphknoten
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NSCLC	Non-small cell lung cancer
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SCLC	Small cell lung cancer

1 Einleitung

1.1 Das Bronchialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Jährlich sterben in Deutschland etwa 30 000 Männer und 10 000 Frauen an einem Bronchialkarzinom. Weltweit ist das Bronchialkarzinom der häufigste bösartige Tumor des Mannes und steht bei Frauen an dritter Stelle. Die Fünfjahres-Überlebensrate liegt bei nur 13% (Häußinger und Kohlhäufel 2000); ist der Tumor operabel, so liegt sie nach Resektion bei 25 - 30% (Präuer, Fürst et al. 2000). In etwa 30 % der Fälle kann mit kurativem Ansatz operiert werden, wenn geringe Tumorgröße, fehlende Fernmetastasierung und Allgemeinzustand des Patienten dies erlauben (Präuer, Fürst et al. 2000). Bei Frauen zeigt die Mortalität noch immer eine steigende Tendenz, während sie bei Männern rückläufig ist.

Die meisten Erkrankungsfälle sind durch exogene Noxen bedingt, mit 85 % steht an erster Stelle das Rauchen, 8 % werden durch Karzinogene wie Asbest und Uran hervorgerufen, 5 % durch Luftverschmutzung und 2 % durch andere Faktoren, zu denen auch genetische Ursachen gezählt werden (Häußinger und Kohlhäufel 2000). Das Risiko des Rauchens scheint dosisabhängig zu sein: wird mit dem Rauchen aufgehört, so verringert sich das Risiko, es bleibt jedoch über dem des Nichtraucher (Häußinger und Kohlhäufel 2000).

1.1.2 Einteilung

Das Bronchialkarzinom wird histologisch eingeteilt in Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome, adenosquamöse Karzinome, Kleinzellige Karzinome, Großzellige Karzinome, pleomorphe sarkomatoide Karzinome und Karzinoide.

Das Plattenepithelkarzinom ist mit dem Rauchen assoziiert und ist meist hilusnah lokalisiert. Seine Inzidenz ist während der letzten 15 Jahren rückläufig, dennoch ist es mit 30-40% noch immer das häufigste Bronchialkarzinom. Das Adenokarzinom entsteht eher peripher und weist eine frühe hämatogene Metastasierung und eine schlechtere Prognose als das Plattenepithelkarzinom auf. Sein Anteil liegt bei 25-

30%. Eine Sonderform stellt das bronchioalveoläre Karzinom dar, das klinisch oft wie eine Lungenentzündung imponiert. Großzellige Karzinome machen 10-15% aus. Das Kleinzellige Karzinom ist wie das Plattenepithelkarzinom stark mit dem Rauchen assoziiert. Es ist von besonders hoher Malignität und umfaßt 15-20% der Fälle (Müller-Höcker 2000).

Klinisch wichtig ist vor allem die Einteilung in Kleinzellige (SCLC) und Nicht-kleinzellige Karzinome (NSCLC). Das SCLC weist eine höhere Teilungsrate und eine frühere Metastasierung auf als das NSCLC, deshalb kommen hier v.a. Radio- und Chemotherapie zum Einsatz. Das NSCLC ist im Gegensatz dazu auch bei fortgeschrittener Erkrankung noch operabel.

Weiterhin läßt sich das Bronchialkarzinom nach seinem Differenzierungsgrad in differenzierte (Plattenepithel- und Adenokarzinome) und undifferenzierte Karzinome (Kleinzelliges und Großzelliges Karzinom) einteilen (Müller-Höcker 2000). Die Zuordnung zum Großzelligen Karzinom erfolgt dann, wenn die Zellen keine Differenzierung aufweisen und nicht kleinzellig sind. Der Differenzierungsgrad sagt aus, inwieweit die Zellen den spezialisierten (differenzierten) Epithelzellen, die normalerweise nicht mehr teilungsfähig sind, oder den pluripotenten (undifferenzierten) Stammzellen ähneln. Klinisch-pathologisch findet diese Unterscheidung Eingang in das sogenannte Grading, also in die Einteilung in G₁ (gut differenzierte Karzinome) bis G₄ (undifferenzierte oder anaplastische Karzinome). Das Kleinzellige Karzinom und das Karzinoid stammen vermutlich von pulmonalen neuroendokrinen Zellen ab, einige großzellige Karzinome weisen ebenfalls eine neuroendokrine Differenzierung auf. Die SCLC werden daher zusammen mit den Karzinoiden und großzelligen neuroendokrinen Karzinomen manchmal auch unter dem Begriff neuroendokrine Karzinome zusammengefaßt (Müller-Höcker 2000). Das SCLC exprimiert in weit geringerem Maße den epithelialen Marker Zytokeratin als das NSCLC, dafür vermehrt Vimentin, ein mesenchymales Protein (Mitsuuchi und Test 2002). Karzinoide sind für beide Marker oft negativ. Da der Nachweis einzelner disseminierter Tumorzellen in dieser Arbeit vom Vorhandensein epithelialer Differenzierungsmarker abhängt, wurden SCLC und Karzinoide in die folgenden Untersuchungen nicht eingeschlossen.

1.1.3 Stadieneinteilung

Die TNM-Klassifikation gibt Auskunft darüber, wie weit der Tumor (T) lokal fortgeschritten ist, sowie über den nodalen Status (N) und eventuell vorhandene Metastasen (M). Ergänzend dazu existiert die mehr klinisch orientierte Einteilung in die Stadien I-IV, die aus dem TNM-Status bestimmt werden können.

Tabelle 1: Stadien des Bronchialkarzinoms gemäß UICC von 1997 (Union Internationale Contre le Cancer), nach (Hauck 2003)

Okkultes Karzinom	T _x N ₀ M ₀
Stadium 0	T _{is} N ₀ M ₀
Stadium IA Stadium IB	T ₁ N ₀ M ₀ T ₂ N ₀ M ₀
Stadium IIA Stadium IIB	T ₁ N ₁ M ₀ T ₂ N ₁ M ₀ T ₃ N ₀ M ₀
Stadium IIIA Stadium IIIB	T ₃ N ₁ M ₀ T ₁ N ₂ M ₀ T ₂ N ₂ M ₀ T ₃ N ₂ M ₀ jedes T N ₃ M ₀ T ₄ jedes N M ₀
Stadium IV	jedes T jedes N M ₁

Das NSCLC ist bis einschließlich Stadium IIIA operabel. Beim SCLC können evtl. sehr kleine Primärtumore bei Fehlen von Lymphknoten- und Fernmetastasen kurativ operiert werden.

1.1.4 Pathogenese

Bei der Entstehung des Bronchialkarzinoms und seiner Progression handelt es sich um einen mehrschrittigen Prozeß (Mitsuuchi und Testa 2002), bei dem es u.a. zu einer Reihe von Mutationen im Genom und damit zu einer Aktivierung von Protoonkogenen und zur Inaktivierung von Suppressorgenen kommt (Hanahan und Weinberg 2000). Beim Kleinzelligen Karzinom scheint tendenziell der Ausfall von Tumorsuppressorgenen zu überwiegen, während bei Nicht-kleinzelligen die dominante

Expression von Onkogenen die größte Rolle zu spielen scheint (Mitsuuchi und Testa 2002). Sobald der Tumor invasiv geworden ist, d.h. die Basalmembran durchbrochen hat, können einzelne Zellen disseminieren und Metastasen begründen. Das Bronchialkarzinom metastasiert bevorzugt in das Skelett, die Nebennieren, in das Gehirn sowie in Leber und Lunge. Das Vorliegen von Fernmetastasen bedingt automatisch die Zugehörigkeit zu Stadium IV, eine Heilung ist unabhängig von anderen Parametern dann nicht mehr möglich.

1.2 Die minimale residuale Tumorerkrankung

Trotz radikaler Resektion im Gesunden (R_0) und ohne primär vorhandene Lymphknoten- oder Fernmetastasen (N_0M_0) kann die Tumorerkrankung fortschreiten, wenn sich bereits vor der Operation Zellen abgesiedelt haben und in andere Organe disseminiert sind. Diese können nach einer mehr oder weniger langen Latenzphase (Dormancy genannt) zu proliferieren beginnen und im Verlauf Metastasen gründen. Die ersten Untersuchungen, die sich diesen Zellen widmeten, konzentrierten sich auf ihren immunzytochemischen Nachweis in Knochenmark und Lymphknoten. Ein wertvolles Werkzeug, das zu diesem Zweck entwickelt wurde, sind Färbungen gegen Zytokeratine im Knochenmark bzw. gegen EpCAM-Antigen im Lymphknoten. Zytokeratine und EpCAM sind epitheliale Antigene, die so in einer mesenchymalen Umgebung detektiert werden können.

Das Vorhandensein epithelialer Zellen in Knochenmark und Lymphknoten von Bronchialkarzinompatienten ist bei vielen Tumorentitäten ein unabhängiger Prädiktor für eine schlechtere Prognose (Passlick, Izbicki et al. 1994), (Passlick, Kubuschok et al. 1999), (Pantel, Izbicki et al. 1996), (Kubuschok, Passlick et al. 1999). Bis jetzt ist jedoch wenig darüber bekannt, welche genetischen Veränderungen der Disseminierung zugrunde liegen, wie heterogen die disseminierten Zellen sind und welche Proteine sie exprimieren. Die meisten Daten, die es zur Tumorprogression gibt und auf die sich auch die etablierten Therapien stützen, stammen aus Untersuchungen an Primärtumoren und makroskopischen Metastasen (Klein 2000). Die oben genannte Immunzytochemie erlaubt durch Doppelfärbungen in eingeschränktem Maße eine molekulare Charakterisierung der disseminierten Zellen. Mit neueren Methoden ist es nun möglich, nach globaler Amplifikation sowohl die vielfältigen Mutationen, Deletionen und Amplifikationen des Genoms zu untersuchen

als auch die Genexpression dieser seltenen Zellen zu erfassen (Klein, Seidl et al. 2002). Dies wird in Zukunft dazu beitragen, zu einem besseren Verständnis der Biologie der frühen Disseminierung zu gelangen.

1.3 Die extrazelluläre Matrix (EZM)

Eine wichtige Rolle in der Tumorphorprogression scheint die EZM zu spielen. Dabei handelt es sich um ein komplexes Netzwerk aus sezernierten extrazellulären Makromolekülen. Sie dient dem Zusammenhalt des Gewebes, als Medium für Signaltransduktionskaskaden und reguliert die Migration von Zellen. Interaktionen von Zellen mit der EZM und den in ihr vorhandenen Wachstumsfaktoren üben bedeutenden Einfluß auf Morphologie, Differenzierung, Fähigkeit zur Migration und Überleben aus (Werb 1997). Die Verknüpfung von Zellen mit der EZM erfolgt über Adhäsionsmoleküle.

EZM bildet den Hauptbestandteil von Bindegeweben und setzt sich hier aus Kollagenfasern (v.a. Kollagen I-III), Proteoglykanen (das sind verschiedene Glykosaminoglykane = Polysaccharidketten, die um ein Kernprotein herum angeordnet sind), Hyaluronsäure und Multiadhäsionsproteinen zusammen. In Epithelien hingegen erfolgt der Zusammenhalt der Zellen in erster Linie über interzelluläre Bindungen; hier bildet die EZM die sogenannte Basalmembran, die sowohl eine Unterlage als auch eine Barriere für die Epithelzellen darstellt. Die Basalmembran ist etwa 60-100 nm dick, zu ihren Hauptbestandteilen gehören Kollagen IV und Laminin. Laminin lagert sich zu einem filzartigen Gewebe zusammen und enthält hochaffine Bindungsstellen für verschiedene Adhäsionsmoleküle.

1.4 Die Rolle von Proteasen bei der Disseminierung

Die Disseminierung von Tumorzellen wird als ein mehrschrittiger Prozeß verstanden: zuerst löst sich die Zelle aus dem Zellverband, welcher für gesunde Epithelien überlebenswichtig ist, durchbricht die Basalmembran (*Invasion*) und bewegt sich dann durch einen kombinierten Mechanismus aus Adhäsion mithilfe von Integrinen und enzymatischer Proteolyse durch die extrazelluläre Matrix (EZM) fort (*Migration*). Die Zelle ist hierbei in der Lage, durch Rezeptoren und gezielte Platzierung von

membranständige Proteasen die jeweils gewünschte Aktivität auf Zellausläufer, sog. Invadopodien, zu konzentrieren (DeClerck 2000). Dadurch kann sie sich an einem Ende mit einem Zellausläufer an die EZM anheften, am anderen Ende kann unterdessen die Bindung gelöst werden. Schließlich invadieren die Tumorzellen in Blutgefäße (*Intravasation*); auf diese Weise können sie auch in weit entfernte Regionen des Körpers gelangen und dort Kolonien gründen. Verschiedene Zelllinien, die in die Blutbahn von Mäusen gebracht werden, sind in unterschiedlichem Ausmaß in der Lage, die kleinen Blutgefäße zu verlassen (*Extravasation*). Somit erklären sich zwei Szenarien, die beide zur Bildung einer metastatischen Absiedelung führen können: intravasales Wachstum mit Bezug zur Basalmembran des Endothels und anschließende Extravasation (Ito, Nakanishi et al. 2001), (Wong, Song et al. 2002) und andererseits frühzeitiges Auswandern aus dem Gefäß. Eine elegante Methode, um das Verhalten der Zellen zu beobachten, ist die intravitale Videomikroskopie, bei der GFP-markierte Tumorzelllinien in Mäuse injiziert werden und deren Verbleib auf Einzelzellniveau durch Aufnahme der Fluoreszenz verfolgt werden kann (Ito, Nakanishi et al. 2001).

Ob sich aus der Tumorzelle ein neuer Klon bildet (*Proliferation*), hängt von mehreren Faktoren ab. Einer davon ist die Bildung neuer Blutgefäße (*Angiogenese*), welche die Versorgung der Metastase mit Sauerstoff und Nahrung und somit ihr Überleben ermöglichen (Hanahan und Folkman 1996; Parangi, O'Reilly et al. 1996), (Pepper 2001).

Proteasen sind Enzyme, die Peptidbindungen schneiden können. Physiologisch werden sie u.a. in der embryonalen Entwicklung und für die Wundheilung gebraucht. Sie tragen wesentlich zu sämtlichen Schritten in dieser Metastasierungskette bei, indem sie Kaskaden limitierter Proteolyse in Gang setzen und Proteine der EZM spalten. Sie werden als Proenzyme freigesetzt und müssen selbst erst durch die proteolytische Abspaltung einer inhibierenden Pro-Domäne aktiviert werden. Tumorzellen synthetisieren sie einerseits selbst, sie können ihre Expression aber auch in umliegenden Stromazellen induzieren (DeClerck 2000).

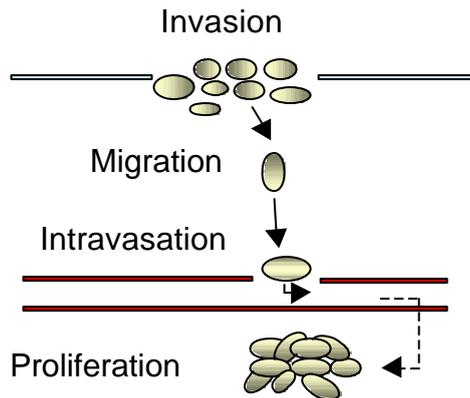


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Metastasierungsschritte, an denen Proteasen beteiligt sind

Abbildung 1 faßt die funktionellen Rollen der Proteasen bei der Metastasierung zusammen. Sie können nicht nur die EZM spalten, sondern auch Wachstumsfaktoren bindende Proteine, Vorläufer von Wachstumsfaktoren, Rezeptor-Tyrosinkinasen, Zelladhäsionsmoleküle und andere Proteasen (Egeblad und Werb 2002). Neuere Arbeiten zeigen, dass sie vielfältige regulatorische Aufgaben besitzen, die schon sehr früh einsetzen und nicht beendet sind, wenn eine Tumorzelle sich aus dem Verband gelöst und in andere Organe abgesiedelt hat. In einem Mausmodell (Sternlicht, Bissell et al. 2000) wurde gezeigt, dass MMP-3 als Tumorpromotor agieren kann. Die Interaktion der Tumorzellen mit der EZM kann den Zellen Signale übermitteln, die entscheiden, ob die Zelle überlebt oder apoptotisch wird (DeClerck 2000). Im SCLC reduziert z.B. die Adhäsion an Laminin, Fibronectin oder Kollagen IV die Rate an chemotherapieinduzierter Apoptose (Sethi, Rintoul et al. 1999) und damit die Chemosensitivität des Tumors.

1.5 Inhibitoren

Da Proteasen eine wichtige Rolle in der Tumorprogression und Metastasierung zu spielen scheinen, war zu prüfen, ob es sich bei ihnen um vielversprechende Zielobjekte für Therapeutika handeln könnte. Dies hat zur Entwicklung mehrerer Proteaseninhibitoren geführt. Verschiedene Therapieansätze sind denkbar:

1. In Mausmodellen konnte durch Transfektion mit Antisense-mRNA, mit Oligonukleotiden oder durch den Einsatz von Ribozym die Transkription inhibiert werden (Coussens, Fingleton et al. 2002).

2. Die proteolytische Eigenschaften könnten dazu verwendet werden, zytotoxische Substanzen zu aktivieren. Ob dieser Ansatz ausreichend spezifisch für Tumorzellen ist, wurde bisher noch nicht im Tiermodell gezeigt.
3. Die enzymatische Aktivität kann direkt durch peptidomimetische MMP-Inhibitoren blockiert werden, die die Bindung des eigentlichen Substrates reversibel kompetitiv hemmen. Dies ist der bisher am meisten praktizierte und am besten untersuchte Ansatz. Einer davon, Marimastat, hat zahlreiche Phase III- Studien durchlaufen, in denen sich keine oder nur sehr geringe Effekte zeigten. Neovastat, ein Extrakt aus Haiknorpel, befindet sich momentan in Phase III-Studien als Therapie für nicht resezierbare NSCLC, und BMS-275291 wird in Phase II-Studien beim Prostatakarzinom getestet. Metastat wird in Phase II am Kaposisarkom erprobt. Prinomastat wurde in Phase III am fortgeschrittenen NSCLC untersucht, die Studie wurde vorzeitig wegen ausbleibender Wirkung gestoppt. Studien mit Tanomastat mußten abgebrochen werden, da die Patienten ein verkürztes Überleben gegenüber der Placebogruppe hatten. (Coussens, Fingleton et al. 2002)

Eine gemeinsamer Nachteil all dieser Studien ist, dass Patienten mit sehr weit fortgeschrittenen Tumoren behandelt wurden. Die entscheidenden Schritte, für die Proteasen gebraucht werden (siehe Abb. 1), sind hier schon abgelaufen. Auch muß bedacht werden, dass Metalloproteaseninhibitoren eher zytostatisch als zytotoxisch wirken, so ist im Vergleich mit konventionellen Therapeutika der Nachweis eines Therapieerfolgs nur schwer möglich. In früheren Stadien eingesetzt, könnte sich ein deutlicherer Effekt einstellen; z.B. scheinen Metalloproteaseninhibitoren die Angiogenese zu hemmen (Coussens, Fingleton et al. 2002), so dass das Auswachsen von sogenannten Mikrometastasen verhindert werden könnte. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit Batimastat, einem dem Marimastat ähnlichen Inhibitor, nur in frühen Stadien Erfolg brachte (Coussens, Fingleton et al. 2002). Möglicherweise liegt der Wert der Inhibitoren in der Prävention, z.B. für Patienten, die eine erbliche Disposition für Tumoren haben. Die Nebenwirkungen, wie gastrointestinale Beschwerden und Übelkeit, müssen hier gegen eine möglichen Nutzen abgewogen werden.

Eine weitere Erklärung dafür, dass der Therapieansatz mit MMP-Inhibitoren in der klinischen Erprobung bisher enttäuschte, könnte die dem Proteolyseapparat eigene

Redundanz liefern. In Studien mit Nullmutanten für verschiedene Proteasen wie tPA, uPA, MMP und PAI-1 bzw. TIMP-1 hat sich ein relativ milder Phänotyp der Tiere ergeben. Dass die Tiere keine großen Defekte aufweisen, kann dahingehend gedeutet werden, dass die Funktionen einzelner ausgefallener Proteasen durch andere kompensiert werden können.

1.6 Klassifikation der für Tumorprogression und Metastasierung wichtigen Proteasen

Matrix-Metalloproteasen (MMP)

Eine große Proteasenfamilie stellen die MMP dar, sie haben ein Zinkatom in ihrem aktiven Zentrum gemeinsam. Ihre historische Einteilung in Stromelysine, Gelatinasen und Kollagenasen erscheint angesichts neu entdeckter Substrate nicht mehr angemessen und wird zunehmend durch eine strukturorientierte ersetzt. Man unterscheidet nun sezernierte von membrangebunden (MT-MMP) Formen. Auch sezernierte MMP können durch Integrine oder CD44 an der Membran gebunden vorliegen, wie es z.B. für MMP-2 der Fall ist (Egeblad und Werb 2002). Nur Matrilysin wird in erster Linie von den Tumorzellen selbst gebildet, andere MMP werden hauptsächlich von den umliegenden Stromazellen synthetisiert. Verschiedene Faktoren können die Expression von MMP anregen, wie z.B. EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer), ein oberflächliches Glykoprotein. Dieses wird von den Tumorzellen gebildet und induziert in Stromazellen die Bildung von MMP-1, MMP-2 und MMP-3 (Guo, Li et al. 2000). Auch Zytokine und Wachstumsfaktoren können die Expression von MMP in Stromazellen stimulieren. MMP werden nicht wie klassische Onkogene aufgrund von Genamplifikation oder Genmutationen aberrant exprimiert, sondern sehr wahrscheinlich aufgrund von Fehlfunktionen transkriptioneller Regulationsmechanismen (Koblinski, Ahram et al. 2000). Die „Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteases“ (TIMP) sind natürliche Inhibitoren der MMP, wirken aber nicht ausschließlich inhibierend, z.B. wird TIMP-2 zur Aktivierung von MMP-2 benötigt (Egeblad und Werb 2002). Es konnte auch gezeigt werden, dass hohe TIMP-Level mit einer schlechteren Prognose verbunden sind (Egeblad und Werb 2002) (Jiang, Goldberg et al. 2002), was aber noch keinen Beweis für einen kausalen Zusammenhang darstellt. Es kann auch sein, dass sie reaktiv auf ein möglicherweise erhöhtes Proteasenniveau vermehrt exprimiert

werden, also keine unabhängigen Prädiktoren sind. Neben den Gewebsinhibitoren werden MMP durch den Plasmainhibitor alpha2-Mikroglobulin inhibiert, der ihren Abbau bewirkt.

MMP stehen auch mit anderen Signalwegen, die am Tumorgeschehen beteiligt sind, in Wechselwirkung. So können sie IGF aktivieren, indem sie es von IGF-bindendem Protein abspalten. MMP-3 und -7 spalten E-Cadherin und bewirken dadurch dessen Aktivierung, was zur EMT (Epithelial-mesenchymalen Transition) führt (Egeblad und Werb 2002). Die EMT scheint ein wesentliches Charakteristikum von invasiven Tumorzellen zu sein.

Tabelle 2 Übersicht über die bekannten MMP

Funktionsorientierter Name	Offizieller Name
Kollagenase 1	MMP1
Kollagenase 2	MMP8
Kollagenase 3	MMP13
Stromelysin 1	MMP3
Stromelysin 2	MMP10
Stromelysin 3	MMP11
Metalloelastase	MMP12
Matrilysin	MMP7
Matrilysin 2	MMP26
Gelatinase A	MMP2
Gelatinase B	MMP9
MT1-MMP	MMP14
MT2-MMP	MMP15
MT3-MMP	MMP16
MT4-MMP	MMP17
MT5-MMP	MMP24
MT6-MMP	MMP25
-----	MMP19
Enamelysin	MMP20

-----	MMP23
-----	MMP27
-----	MMP28

ADAM („A Disintegrin And Metalloprotease“)

Strukturell mit den MMP verwandt sind die ADAM, von denen mittlerweile 29 Vertreter bekannt sind. Es handelt sich dabei um transmembranäre Proteine, die extrazellulär wie die MMP eine Zinkproteasendomäne besitzen und zusätzlich eine Disintegrindomäne, über die sie mit Integrinen interagieren können. Jedoch scheint nur etwa die Hälfte der bekannten ADAM tatsächlich zur Proteolyse fähig zu sein. TACE, ein Mitglied dieser Familie, setzt membrangebundenes TNF-alpha frei, was zu dessen Aktivierung führt. Inwieweit diese interessanten Moleküle in das Tumorgeschehen involviert sind, ist noch weitgehend ungeklärt (Primakoff und Myles 2000).

Serinproteasen

Dazu gehören u.a. uPA, Kallikreine und Plasmin. Der uPA-bindende Rezeptor (uPAR) ist zusätzlich ein Adhäsionsrezeptor für Vitronectin und bindet lateral β_2 -Ketten.

UPA liegt als Proenzym vor und kann nach Aktivierung Plasminogen in die aktive Serinprotease Plasmin umwandeln. Darüberhinaus kann uPA Fibronectin, Laminin und Kollagen spalten und die proteolytische Kaskade der MMP auslösen. Bedeutsam für die Funktion ist seine Bindung an den uPA-Rezeptor (uPAR), dadurch kann die Wirkung fokussiert und verstärkt werden. Dieser Komplex fungiert weiterhin als Vitronectinrezeptor, was die Fähigkeit der Zelle zur Migration erhöht. P53 reguliert uPA negativ (Aguirre Ghiso, Alonso et al. 1999). In den meisten Tumoren liegt eine konstitutive Überexpression von uPA vor. Es konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein uPA-positiver Einzelzellen beim Magenkarzinom einen unabhängigen Prädiktor für eine schlechte Prognose darstellt (Heiss, Allgayer et al. 1995). Auch hohe uPAR- und PAI-1 (Plasminaktivator-Inhibitor) -Level korrelieren mit einer schlechten Prognose (Andreasen, Kjoller et al. 1997).

Cystein- und Aspartatproteasen

Dazu gehören die Cathepsine B, L, S, H, C, D, und E. Cathepsine sind Proteasen, die normalerweise, aber nicht ausschließlich intrazellulär, genauer gesagt in Lysosomen gefunden werden. Unter verschiedenen Bedingungen kommt es jedoch zur Sekretion dieser Proteasen: bei Arthritis, beim Morbus Alzheimer und in malignen Tumoren, hier nachgewiesen für Cathepsin B, D und L (Yan, Sameni et al. 1998), (Kos und Lah 1998). Cathepsin D ist an der Apoptose beteiligt und scheint das Wachstum von Tumorzellen zu hemmen (Wu, Saftig et al. 1998). Cathepsin B und L können direkt EZM und Basalmembranen degradieren.

1.7 Expressionsanalysen mithilfe von cDNA-Arrays

Die Arraytechnologie bietet im Gegensatz zu immunzytochemischen Methoden die Möglichkeit, gleichzeitig alle Transkripte in einer einzigen Probe zu untersuchen. Somit ist dieses Verfahren besonders zur Charakterisierung von einzelnen disseminierten Tumorzellen geeignet, die nur selten detektiert und isoliert werden können. Die am weitesten verbreitete und entwickelte Methode ist die Analyse der Genexpression mittels cDNA- bzw. RNA-Arrays. Während bis vor einigen Jahren noch bekannte und unbekannte Sequenzen auf Nylonmembran aufgebracht wurden, kann dies nun in erweitertem Umfang auf Glas-Chips geschehen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, RNA-Oligonukleotide direkt auf einem Glas-Chip zu synthetisieren, die dann als Sonden für die mRNA der Probe dienen. Die so erhobenen Datenmengen können nun explorativ analysiert werden.

In (Klein, Seidl et al. 2002) ist dargestellt, wie aus einer Zelle Transkriptionsdaten gewonnen werden können. Die genomische DNA bleibt dabei erhalten und kann für CGH (Comparative Genomic Hybridisation)- Analysen weiterverarbeitet werden, um chromosomale Amplifikationen und Deletionen nachzuweisen.

1.8 Aufgabenstellung und Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde die von (Klein, Seidl et al. 2002) entwickelte Methode auf einzelne disseminierte Tumorzellen sowie kleine Tumorzellaggregate aus Lymphknoten und Knochenmark von Patienten mit Nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom angewendet. Auf diese Weise sollte die Fragestellung bearbeitet

werden, welche Proteasen, Inhibitoren und funktionell verwandte Moleküle in welchem Ausmaß exprimiert werden und ob Unterschiede zwischen Tumorzellen aus Lymphknoten und Knochenmark oder zwischen Einzelzellen und Aggregaten bestehen. Der Vergleich von Zellen aus dem Knochenmark mit Zellen aus Lymphknoten sollte stellvertretend Informationen darüber liefern, ob sich hämatogene (KM) von lymphogener (LK) Metastasierung hinsichtlich der Proteasenexpression unterscheidet. Zu diesem Zweck wurden aus intraoperativ gewonnenen Knochenmark- und Lymphknotenproben EpCAM+ Zellen isoliert, ihr Transkriptom global amplifiziert und dieses auf selbst zusammen- und hergestellte cDNA-Arrays hybridisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Puffer und sonstige Lösungen

cDNA-Waschpuffer	50 mM Tris-HCl 75 mM KCl 10 mM DTT 0,25% Igepal 0,5 % TWEEN 20
LB-Medium	50 g Pepton 25 g Hefeextrakt 50 g NaCl H ₂ O ad 5 l pH 7.0
Ligationspuffer 10x Roche	660 mM Tris-HCl 50 mM MgCl ₂ 50 mM DTT 10 mM ATP pH 7.5
NEBuffer2 New England Biolabs	50 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM Dithiothreitol pH 7.9
NEBuffer3 New England Biolabs	100 mM NaCl 50 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂

	1 mM Dithiothreitol pH 7.9
NEBuffer4 New England Biolabs	50 mM K-Acetat 20 mM Tris-Acetat 10 mM Mg-Acetat 1 mM Dithiothreitol pH 7.9
NEBufferU BamH I New England Biolabs	150 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM Dithiothreitol pH 7.9
NEBufferU Taq1 New England Biolabs	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ pH 8.4
PBS	150 mM NaCl 3 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7.4
PCR-Puffer 10x plus dNTP	100 mM Tris/HCl (pH 8.4) 500 mM KCl 10 mM MgCl ₂ dNTP je 1 mM
PCR-Puffer 10x Roche 1	100 mM Tris/HCl (pH 8.) 500 mM KCl 17,5 mM MgCl ₂

Puffer R (Lysispuffer, siehe 2.2.1)	50 mM EDTA 50 mM Tris Tween 20 0,5 % Triton X-100 0,5 % H ₂ O ad 100 ml PH 8.0
Puffer 1 (Arrayhybridisierung)	4,64 g Maleinsäure 3,50 g NaCl H ₂ O ad 400 ml pH 7.5
Puffer 3 (Arrayhybridisierung)	100 mM Tris 100 mM NaCl pH 9.5
SDS 10%	100 g SDS H ₂ O ad 1 l pH 7.2
SSC 20x	175,3 g NaCl 88,2 g Natriumcitrat H ₂ O ad 1 l pH 7.0
Tailing-Waschpuffer	50 mM KH ₂ PO 1 mM DTT 0,25% Igepal
TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	Tris 89 mM Borat 89 mM EDTA 2 mM pH 8.3

TfB I (sterilfiltriert)	30 mM KAc
	50 mM MgCl ₂
	100 mM KCl
	10 mM CaCl ₂
	Glycerol 15%

TfB II (sterilfiltriert)	10 mM Na-MOPS
	50 mM CaCl ₂
	10 mM KCl
	Glycerol 15%
	pH 7.0

2.1.2 Chemikalien

AB-Serum	Biotest, Dreieich
Agarose GTG Seakem	Biozym, Hess. Oldendorf
BSA	Roche, Mannheim
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Amersham Biosciences, Freiburg
Dig Luminescent Detection Kit:	
DIG Easy, Blockierungsreagenz,	
Anti-Digoxigenin-AP/	
Fab-Fragmente 0,75 U/μl, CSPD	Roche, Mannheim
Digoxigenin-11-dUTP alkalilabil	Roche, Mannheim
DNA-Größenmarker	Invitrogen, Karlsruhe
Dynabeads [®] mRNA DIRECT [™] Kit	Dynal, Oslo/ Norwegen
Ethanol unvergällt	JT Baker, Griesheim
Ethanol vergällt	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Hank's Salzlösung	Biochrom KG, Berlin
Herring Sperm DNA 10 mg/ml	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe

Kaliumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumsulfat	Merk, Darmstadt
Maleinsäure	Sigma, Deisenhofen
Natriumazetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merk, Darmstadt
Natriumcitrat	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merk, Darmstadt
PCR-Öl	Sigma, Deisenhofen
Percoll	Amersham Biosciences, Freiburg
Phenol/ Chloroform	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (rauchend)	Merk, Darmstadt
SDS	Sigma, Deisenhofen
SYBR Gold	Molecular Probes, Leiden, NL
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
TRIS	Sigma, Deisenhofen
Wasser (LiChrosolv für Chromatographie)	Merk, Darmstadt

2.1.3 Enzyme

2.1.3.1 Polymerasen

Taq-Polymerase 5 U/μl	Roche/Pan
Terminale Desoxy Nucleotidyltransferase (TdT) 10 U/μl	Amersham Pharmacia Biotech
Thermo Sequenase™ DNA Polymerase 32 U/μl	Amersham Pharmacia Biotech
Expand Long Template 5 U/μl	Roche
Superscript II RT-Polymerase 200 U/μl	GibcoBRL

2.1.3.2 Restriktionsenzyme

Aci I 10 000 U/μl	NEB
-------------------	-----

BamH I 20 000 U/μl	NEB
Bgl II 10 000 U/μl	NEB
Bpm I 2 000 U/μl	NEB
Hinf I 10 000 U/μl	NEB
Hph I 5 000 U/μl	NEB
Mse I 4 000 U/μl	NEB
Msp I 20 000 U/μl	NEB
Nco I 10 000 U/μl	NEB
Pst I 20 000 U/μl	NEB
Taq I 20 000 U/μl	NEB

2.1.3.3 Ligase

T4 DNA Ligase 1-3 U/μl	Promega
------------------------	---------

2.1.4 Antikörper

3B10 anti-EpCAM (Maus) 0,5 mg/ml	Micromet
anti-Maus-IgG, Cy3-gekoppelt (Ziege) 1,4mg/ml	Jackson

2.1.5 Agarplatten

Zur Bakterienanzucht wurden Agarplatten benötigt. Dafür wurden 4 g Agarose in 350 ml LB-Medium kochend aufgelöst und nach Abkühlen 35 mg Ampicillin zugegeben, diese Lösung dann in Petrischalen gegossen.

2.1.6 Plasmide

Für die Klonierungen wurde das pGEMT Easy Plasmid von Promega verwendet sowie die im Kit enthaltene T4-Ligase und 10x-Ligationspuffer von Roche.

2.1.7 Geräte

Centrifuge 5417 C	Eppendorf
Cytospinzentrifuge Cytospin2	Shandon

Elektronische Präzisionswaage	Sartorius Laboratory
Elektrophoresis Power Supply EPS 200	Pharmacia Biotech
Entwicklermaschine – Compact 35	Airclean 200
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer
Horizontal Gel Electrophoresis System	Gibco BRL
Hybri-Ofen Shake `n´ Stack	Hybaid
Medimaschine	Dako
Microinjector 5242	Eppendorf
Mikroskop Labovert FS	Leitz
Mini-Zentrifuge	Costar
Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research Inc.
RC-3B Zentrifuge	Sorvall Instruments
Robo Cycler Gradient 96	Stratagene
Roller/Mixer SRT 1	Stuart Scientific
Spektrometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech
Thermomixer 5436	Eppendorf
UV-Lampe	INTAS
Vortexgerät Type REAX 1 DR	Heidolph
Wasserbad Lauda MT/2	MGW

2.1.8 Oligonukleotide

2.1.8.1 Primer des Proteasenfilters (8 µM)

Laborname	Gename nach dem HUGO Nomenclature Committee	Symbol	Primersequenzen
ADAM 8	A disintegrin and metalloproteinase domain 8	ADAM8	5´-Primer: 5'-cct gca tga caa cgt aca gc 3´-Primer: 5'-gca ctc ctg gca gca ggt ac
ADAM 9	A disintegrin and metalloproteinase domain 9	ADAM9	5´-Primer: 5'-act tta gca gtt gca gtg ca 3´-Primer: 5'-gga aga tct gat cct agc tg
ADAM 10	A disintegrin and metalloproteinase domain 10	ADAM10	5´-Primer: 5'-gat gaa tgc tgc ttc gat gc 3´-Primer: 5'-tga gcc aca atc cat tca gc
ADAM 11	A disintegrin and metalloproteinase domain 11	ADAM11	5´-Primer: 5'-cca ctg ttc gag cag atg c 3´-Primer: 5'-ctg gtt gta ctc gtc gat gc
ADAM 15	A disintegrin and metalloproteinase domain 15	ADAM15	5´-Primer: 5'-agg tgc aca gtg tgc atc tg 3´-Primer: 5'-cag ctg cag ttc agc tca gt

ADAM 20	A disintegrin and metalloproteinase domain 20	ADAM20	5'-Primer: 5'-gca cac cag atg gag ttg ca 3'-Primer: 5'-cca cta gat tcc cac agt ac
ADAM 21	A disintegrin and metalloproteinase domain 21	ADAM21	5'-Primer: 5'-ctt ggc cta gcc tat gtt gc 3'-Primer: 5'-agt agg cac tgt cac tac ag
TACE	A disintegrin and metalloproteinase domain 17	ADAM17	5'-Primer: 5'-tgt gaa gat gtt gct aga gc 3'-Primer: 5'-ctc act gct att acc tgt gc
β-Aktin	Actin, beta	ACTB	5'-Primer: 5'-gtg ggg cgc ccc agg cac ca 3'-Primer: 5'-ctc ctt aat gtc acg cac gat ttg
Bikunin	Serine protease inhibitor, Kunitz type, 2	SPINT2	5'-Primer: 5'-tac aat gtc act gac gga tc 3'-Primer: 5'-cat atg tgt tct tca cca gct
CK 7	Keratin 7	KRT7	5'-Primer: 5'-aga gct gca gtc caa gat c 3'-Primer: 5'-cgg tag gtg gcg atc tcg a
CK 8	Keratin 8	KRT8	5'-Primer: KER8FOR 5'-cca agt tgt ccg agc tgg ag 3'-Primer: KER8REV 5'-tga gcc tca ggt ggg tct c
CK 10	Keratin 10	KRT10	5'-Primer: 5'-cag atc gac aat gcc agg ct 3'-Primer: 5'-gcc tga atc tgt gag agc tg
CK 13	Keratin 13	KRT13	5'-Primer: 5'-ctg aat gaa gag cta gcc tac 3'-Primer: 5'-cca gac gtg tct tga tgt cca
CK 18	Keratin 18	KRT18	5'-Primer: 5'-gtt ctg cag att gac aat gcc 3'-Primer: II 5'-cat gga gtc cag gtc gat c
CK 19	Keratin 19	KRT19	5'-Primer: 5'-gaa gat ccg cga ctg gta c 3'-Primer: 5'-ttc atg ctc agc tgt gac tg
CK 20	Keratin 20	KRT20	5'-Primer: 5'-tac gtc taa cag tgg aag ctg 3'-Primer: 5'-ctg gag ttc tat ctc aag gct
Caspase 1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine protease	CASP1	5'-Primer: 5'-cat ggc cga caa ggt cct gaa g 3'-Primer: 5'-ccc tgc cca cag aca ttc ata cag
Caspase 2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine protease	CASP2	5'-Primer: 5'-gga cgc agg ata ttg gga gtg tgt 3'-Primer: 5'-acg gca ggc ctg gat gaa ga
Caspase 3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine protease	CASP3	5'-Primer: 5'-gtt agc gag ccc tgc tca cac tc 3'-Primer: 5'-gta ccc tct gca gca tga gag tag gtc
Caspase 4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	CASP4	5'-Primer: 5'-tgt tcc cta tgg cag aag g 3'-Primer: 5'-tgc cag gaa aga ggt aga aat
Caspase 6	Caspase 6, apoptosis-related cysteine protease	CASP6	5'-Primer: 5'-gcg ttt ggc tgc aat gag ct 3'-Primer: 5'-ctc cag gca gcg tgt aaa c
Caspase 7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine protease	CASP7	5'-Primer: 5'-atg gca gat gat cag ggc tgt att 3'-Primer: 5'-cta ttg act gaa gta gag ttc ctt ggt ga
Caspase 8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	CASP8	5'-Primer: 5'-caa acc tcg ggg ata ctg tct gat 3'-Primer: 5'-ctg ttt ccc cat gtt ttt ctt gtc
Caspase 9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine protease	CASP9	5'-Primer: 5'-gga cat gct ggc ttc gtt tct 3'-Primer: 5'-gcc ctg gcc tta tga tgt ttt a

Caspase 10	Caspase 10, apoptosis-related cysteine protease	CASP10	5'-Primer: 5'-aag ccg agt cgt atc aag gag agg 3'-Primer: 5'-cca ggg gca cag gga ata cta
Cath B	Cathepsin B	CTSB	5'-Primer: 5'-gat ctg gtt ccc acc tca g 3'-Primer: 5'-gct att gga gac gct gta g
Cath D	Cathepsin D	CTSD	5'-Primer: 5'-agt gct tca cag tcg tct tcg 3'-Primer: 5'-tga cat tca ggt agg aca gag
Cath F	Cathepsin F	CTSF	5'-Primer: 5'-cgg gcc aag ggt cgc tgt a 3'-Primer: 5'-act tgg ctt gct tca tgt tg
Cath H	Cathepsin H	CTSH	5'-Primer: 5'-cgt gga ctg gcg gaa aaa 3'-Primer: 5'-cag agg gat ggg gta gga g
Cath K	Cathepsin K	CTSK	5'-Primer: 5'-gtg tgg ttc ctg ttg ggc ttt tag 3'-Primer: 5'-atc ctt tgt ttc ccc agt ttt ctc
Cath L	Cathepsin L	CTSL	5'-Primer: 5'-gag cag aat ctg gta gac tg 3'-Primer: 5'-gtc aag tcc ttc ctc atc ac
Cath S	Cathepsin S	CTSS	5'-Primer: 5'-atg gca aac aat aca agg aa 3'-Primer: 5'-atg acg cgc atc tac acc
Cath V	Cathepsin V	CTSV	5'-Primer: 5'-ata tgg cgc gaa tga aga agg atg 3'-Primer: 5'-aaa gcc gta gcc aac cac cag aac
Cath W	Cathepsin W	CTSW	5'-Primer: 5'-tgc tca ccg cct gga cat ctt t 3'-Primer: 5'-gcc gat atc ccc tcc tct gac ttg
CEA	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	CEACAM5	5'-Primer: 5'-tga ata caa gtt tct gat acc ac 3'-Primer: 5'-gaa ctt gtg caa taa cta tat tac
c-ets-1	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)	ETS1	5'-Primer: 5'-gac atc tta tgg gaa cat cta g 3'-Primer: 5'-tgg tcc act gcc tgt gta gc
Chymotrypsin	Chymotrypsinogen B1	CTRB1	5'-Primer: 5'-agt ttg acc agg gct ctg ac 3'-Primer: 5'-tct tgc att cgg cat tgg ac
Cystatin A	Cystatin A	CSTA	5'-Primer: 5'-atc ctg tcc agc aaa gaa gc 3'-Primer: 5'-cag caa gga tca tga ctc ag
Cystatin B	Cystatin B	CSTB	5'-Primer: 5'-ggg gag gtc cca gct tga ag 3'-Primer: 5'-gca aaa gca gct gca gaa tc
Cystatin C	Cystatin C	CST3	5'-Primer: 5'-agc aac gac atg tac cac ag 3'-Primer: 5'-tct cct ggt gca ggc aca tg
EF-1alpha	Eukaryotic translation elongation factor alpha 1	EE1A1	5'-Primer: 5'-tgc ccc agg aca cag aga ct 3'-Primer: 5'-ctg tgt cgg ggt tgt agc ca
EMMPRIN	Basigin	BSG	5'-Primer: 5'-cat gct ggt ctg caa gtc a 3'-Primer: 5'-gtg tat gat ggg aat cta cg
EMMPRIN II	Basigin	BSG	5'-Primer: II 5'-agt gct tgc aag att cca ag 3'-Primer: II 5'- gct tct gcg gtt ctg gag tc
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPD	5'-Primer: 5'-ggc tct cca gaa cat cat cc 3'-Primer: 5'-ggg tgt cgc tgt tga agt ca
Gel A	Matrix metalloproteinase 2	MMP2	5'-Primer: 5'-act cag cca gca cct tgg ag 3'-Primer: 5'-agc cca aag cag ggc tgc gt

Gel B	Matrix metalloproteinase 9	MMP9	5'-Primer: 5'-ctt cta cgg cca cta ctg tg 3'-Primer: 5'-cac tgc agg atg tca tag gt
GFP	Green fluorescent protein		5'-Primer: GFP _{in} 5'-agc aga gct ggt tta gtg aac c; 3'-Primer: GFP _{back} 5'-atg gct gat tat gat cta gag tcg
Granzym A	Granzyme A	GZMA	5'-Primer: 5'-ctc att caa gac cct aca tg 3'-Primer: 5'-aat ctc cat tgc acg agt c
Granzym B	Granzyme B	GZMB	5'-Primer: 5'-cta cat ggc tta tct tat gat c 3'-Primer: 5'-cgc aca act caa tgg tac tg
Granzym H	Granzyme H	GZMH	5'-Primer: 5'-tgc tga cag ctg ctc act g 3'-Primer: 5'-gag aat acc ttg ggc tac gt
Granzym K	Granzyme K	GZMK	5'-Primer: 5'-atc cac agt ggg tgc tga c 3'-Primer: 5'-att cat gac ctc cag aga ct
Granzym M	Granzyme M	GZMM	5'-Primer: 5'-cgt aca tgg cct cac tgc a 3'-Primer: 5'-ctt cct gat cca gga cac gt
Heparanase	Heparanase	HPSE	5'-Primer: 5'-cta cca gga gca att gct ac 3'-Primer: 5'-cca ttc aaa tag tag tga tgc
a 2	Integrin alpha 2	ITGA2	5'-Primer: 5'-gac aag tgg ttc aac tct ggt ca 3'-Primer: 5'-agc agg gta gcc tac atc gc
a 4	Integrin alpha 4	ITGA4	5'-Primer: 5'-gct gat tta cag gtt tct gca 3'-Primer: 5'-tgg cat tct cca gta gta gtc
a 5	Integrin alpha 5	ITGA5	5'-Primer: 5'-cca cca tgt cta tga gct ca 3'-Primer: 5'-ctt ggt cca ttg cac agc tg
a 6	Integrin alpha 6	ITGA6	5'-Primer: 5'-gta cag ttg ttg gcg agc aag 3'-Primer: 5'-gaa ggc tcg cat gag aat gtc
a v	Integrin alpha V	ITGAV	5'-Primer: 5'-ctt agc aag act ttc ctg tgc 3'-Primer: 5'-gtc tca gtc cac agt aat gac
β 1	Integrin beta 1	ITGB1	5'-Primer: 5'-gtt ggt aga cat tgt gaa tgc 3'-Primer: 5'-agg aac att cct gtg tgc atg
β 2	Integrin beta 2	ITGB2	5'-Primer: 5'-tgc acg aag ttc aag gtc ag 3'-Primer: 5'-tgg tca gct tca gca cgt gc
β 3	Integrin beta 3	ITGB3	5'-Primer: 5'-atg gac ctg tct tac tcc atg 3'-Primer: 5'-cat tgc tgg aat cca tgg ac
β 4	Integrin beta 4	ITGB4	5'-Primer: 5'-acc tgt aca tcc tca tgg ac 3'-Primer: 5'-gtg aag ctt ctc gta gta gc
β 5	Integrin beta 5	ITGB5	5'-Primer: 5'-agt tgt cag tct ggg atc ag 3'-Primer: 5'-tgt gct gat gtc tgt cga gc
β 7	Integrin beta 7	ITGB7	5'-Primer: 5'-cta cct tat gga cct gag ct 3'-Primer: 5'-tgt acc acg ttg ctg gag tc
KLK 2	Kallikrein 2	KLK 2	5'-Primer: 5'-gat gac gct gta aac ata gc 3'-Primer: 5'-aac ctc agg tct gag gac t
KLK 5	Kallikrein 5	KLK 5	5'-Primer: 5'-ttc gtc cca cta aag atg tc 3'-Primer: 5'-gag tcc tgg gat gac tca g
KLK 6	Kallikrein 6	KLK 6	5'-Primer: 5'-gca gat aca cga act gga tc 3'-Primer: 5'-gac agt aag cag cgg agc t

KLK 7	Kallikrein 7	KLK 7	5'-Primer: 5'-aca gga gag ctc aga gga tc 3'-Primer: 5'-tgc aca ctt gag tgt aga c
KLK 8	Kallikrein 8	KLK 8	5'-Primer: 5'-ctg cta caa cag cag cga t 3'-Primer: 5'-gag atc tag tgc tta tcc tag
Mage 1	Melanoma antigen, family A, 1	MAGEA1	5'-Primer: "gesamt" 5'-cca gag tcc tca gg agc 3'-Primer: "gesamt" 5'-ctg caa cat gtg ctg aga ct
Mage 3	Melanoma antigen, family A, 3	MAGEA3	5'-Primer: "gesamt" 5'-cca gag tcc tca gg agc 3'-Primer: "gesamt" 5'-ctg caa cat gtg ctg aga ct
Mage 4	Melanoma antigen, family A, 4	MAGEA4	5'-Primer: "gesamt" 5'-cca gag tcc tca gg agc 3'-Primer: "gesamt" 5'-ctg caa cat gtg ctg aga ct
Mage 6	Melanoma antigen, family A, 6	MAGEA6	5'-Primer: "gesamt" 5'-cca gag tcc tca gg agc 3'-Primer: "gesamt" 5'-ctg caa cat gtg ctg aga ct
Mage 12	Melanoma antigen, family A, 12	MAGEA12	5'-Primer: "gesamt" 5'-cca gag tcc tca gg agc 3'-Primer: "gesamt" 5'-ctg caa cat gtg ctg aga ct
Mage 1F	Melanoma antigen, family A, 1	MAGEA1	5'-Primer: out 5'-gta gag ttc ggc cga agg aac 3'-Primer: out 5'-cag gag ctg ggc aat gaa gac
Mage 2F	Melanoma antigen, family A, 2	MAGEA2	5'-Primer: out 5'-cat tga agg aga aga tct gcc t 3'-Primer: out 5'-gag tag aag agg aag aag cgg t
Mage 3F	Melanoma antigen, family A, 3	MAGEA3	5'-Primer: out 5'-gaa gcc ggc cca ggc tcg 3'-Primer: out 5'-gat gac tct ggt cag ggc aa
Mage 4F	Melanoma antigen, family A, 4	MAGEA4	5'-Primer: out 5'-cac caa gga gaa gat ctg cct 3'-Primer: out 5'-tcc tca gta gta gga gcc tgt
Mage 12F	Melanoma antigen, family A, 12	MAGEA12	5'-Primer: out 5'-tcc gtg agg agg caa ggt tc 3'-Primer: 5'-atc gga ttg act cca gag agt a
Matrilysin	Matrix metalloproteinase 7	MMP7	5'-Primer: 5'-ggc atg agt gag cta cag tg 3'-Primer: 5'-cca gcg ttc atc ctc atc ga
Medullasin	Elastase 2, neutrophilic	ELA2	5'-Primer: 5'-tca tgg tgt ccc tgc agc t 3'-Primer: 5'-gat gat aga gtc gat cca gt
MMP 1	Matrix metalloproteinase 1	MMP1	5'-Primer: 5'-agg gtc aag cag aca tca tg 3'-Primer: 5'-agc atc gat atg ctt cac agt
MMP 13	Matrix metalloproteinase 13	MMP13	5'-Primer: 5'-gtc tgg aga tat gat gat ac 3'-Primer: 5'-cat cta cta ttc tta cca ctg
MT 1-MMP	Matrix metalloproteinase 14	MMP14	5'-Primer: 5'-gca gaa gtt tta cgg ctt gca 3'-Primer: 5'-gca gag tca aag tgg gtg tc
MT 2-MMP	Matrix metalloproteinase 15	MMP15	5'-Primer: 5'-agt cac cgg tgt gct cga c 3'-Primer: 5'-atg cag gtc agt gct gga ga
MT 3-MMP	Matrix metalloproteinase 16	MMP16	5'-Primer: 5'-agc tcg tcc atc cat tga ag 3'-Primer: 5'-tca atg cat atc gct ttc gac
MT 4-MMP	Matrix metalloproteinase 17	MMP17	5'-Primer: 5'-agc tgt cta agg cca tca c 3'-Primer: 5'-cgc atg atg gag tgt gca g
MT 5-MMP	Matrix metalloproteinase 24	MMP24	5'-Primer: 5'-tga aga ggt gcc ata cca tg 3'-Primer: 5'-cca gaa ctg ctc gat ctg ca
Myeloblastin	Proteinase 3	PRTN3	5'-Primer: 5'-ctg cgg agg cac ctt gat c 3'-Primer: 5'-agt cta ttc ctt gga tga tgc

PAI-1	Serine proteinase inhibitor, clade E, member 1	SERPINE1	5'-Primer: 5'-gat cga ggt gaa cga gag t 3'-Primer: 5'-cac agt gga ctc tga gat g
PAI-2	Serine proteinase inhibitor, clade E, member 2	SERPINE2	5'-Primer: 5'-atc ctg atg cga ttt tgc ag 3'-Primer: 5'-atg ctt ctc aga atg gat ctg
PRSS 12	Protease, serine, 12	PRSS12	5'-Primer: 5'-caa cag att gtg att cat cg 3'-Primer: 5'-gca taa ata tgc cac tca tg
PSTI	Seine protease inhibitor, Kazal type 1	SPINK1	5'-Primer: 5'-acg cag aac ttc agc cat g 3'-Primer: 5'-tca aca ata agg cca gtc ag
rS9	Mitochondrial ribosomal protein S9	MRPS9	5'-Primer: 5'-cgc agg cgc aga cgg tgg aag cg 3'-Primer: 5'-tgg cag gaa aac gag aca atc
R13a	Ribosomal protein L13a	RPL13a	5'-Primer: 5'-agc ggc tgc cga aga tgg 3'-Primer: 5'-tgg gct cag acc agg agt c
Str 1	Matrix metalloproteinase 3	MMP3	5'-Primer: 5'-ctc agt act ggg tgt acg acg g 3'-Primer: 5'-aca gtc gct ggc agg tga c
Str 3	Matrix metalloproteinase 11	MMP11	5'-Primer: 5'-ttg cag tta gtg aac atg ga 3'-Primer: 5'-atc cag ctc gta cct ca
TF	Coagulation factor III	F3	5'-Primer: 5'-ctt cag gca cta caa ata ctg 3'-Primer: 5'-aag tcc gtt cat ctt cta cg
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1	TIMP1	5'-Primer: 5'-aga cca cct tat acc agc g 3'-Primer: II 5'-gac act gtg cag gct tca gt
TIMP-2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	TIMP2	5'-Primer: 5'-II gat cca gta tga gat caa gc 3'-Primer: 5'-tgt cag agc tgg acc agt c
TIMP-3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	TIMP3	5'-Primer: 5'-ctt ctg caa ctc cga cat cg 3'-Primer: 5'-gta gtg ttt gga ctg gta gc
TIMP-4	Tissue inhibitor of metalloproteinase 4	TIMP4	5'-Primer: 5'-agt ctt cat cca tct gtg ca 3'-Primer: II 5'-cag taa cag cta caa ggc tag
Ubiquitin	Ubiquitin B	UBB	5'-Primer: 5'-atg cag atc ttc gtg aag acc 3'-Primer: 5'-tta aca ccg acc cct cag
uPA	Plasminogen activator, urokinase	PLAU	5'-Primer: 5'-cat caa gtt cca tcg aac tg 3'-Primer: 5'-cca ggt aga cga tgt agt c
uPAR	Plasminogen activator, urokinase receptor	PLAUR	5'-Primer: 5'-cat gca gtg taa gac caa cg 3'-Primer: 5'-aca gtc tgg cag tca tta gc

2.1.8.2 Weitere Primer

CFL5c8 200 µM	(CCC) ₅ GTC TAG ANN NNN NNN
CFL5cT 100 µM	(CCC) ₅ GTC TAG ATT TTT TTT TTT TTT TVN
CP ₂ 24 µM	TCA GAA TTC ATG CCC CCC CCC CCC CCC

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von pBS/E.coli-Blockierungs-DNA

In 100 ml LB-Medium + 100 µl Ampicillin (100 mg/ml) wurde über Nacht eine Kultur von E.coli angelegt, die mit dem Plasmid pBS (pBluescript) transformiert waren. Nach Abzentrifugation wurden die Bakterien in 10 ml Puffer R resuspendiert und mit 200 µl RNase-Lösung (10 mg/ml), 200 µl Lysozym-Lösung (100 mg/ml) und 450 µl Proteinkinase K versetzt und kurz gevortext. Über Nacht wurden die Bakterien bei 37° C lysiert, worauf die DNA mit Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol extrahiert werden konnte. Nach Ultraschallscherung zur Zerkleinerung der DNA und Fällung mit 1/10 Volumen 3 M NaAc (Natriumacetat) pH 5.2 und 1 Volumen Isopropanol konnte die DNA in H₂O aufgenommen und anschließend photometrisch die Konzentration bestimmt werden.

2.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien sind in der Lage, Fremd-DNA aufzunehmen. Um sie zu erzeugen, wurden 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37° C mit E. coli XL 1 blue inokuliert und am nächsten Tag damit 100 ml LB-Medium + 1 ml 1 M MgCl₂ für eine erneute Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur ließ man bis zu einer OD₅₅₀ (optische Dichte bei einer Wellenlänge von 550 nm) von 0,6 - 0,8 wachsen, anschließend wurde bei 3000 rpm für 8 min bei 4° C in der Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert. Die folgenden Schritte wurden zügig auf Eis durchgeführt: Überstand dekantieren, Bakterienpellet resuspendieren, Zugabe von 40 ml Tfb I (eisgekühlt) pro 100 ml Starterkultur, Inkubation für 10 min auf Eis, Zentrifugation (3000 rpm, 8 min, 4° C), Überstand dekantieren, resuspendieren, Zugabe von 4 ml Tfb II (eisgekühlt) pro 100 ml Starterkultur, kompetente Bakterien zu 100 µl in 1,5 ml - Gefäße aliquotieren, auf Trockeneis schockgefrieren und bei -80° C aufbewahren.

2.2.3 Isolation und Amplifikation neuer Sonden

Um den Vorgängerarray auf insgesamt 108 cDNA-Sonden, von denen 68 für Proteasen und ihre Inhibitoren kodieren, zu erweitern, wurden aus der Literatur weitere Moleküle ausgewählt:

Tabelle 3 Übersicht über die neuen Sonden

Molekül	Funktion
alpha ₂ -Integrin	Bildet zusammen mit β ₁ einen konstitutiv exprimierten Kollagenrezeptor (Watt 2002)
Bikunin	Supprimiert TNF-alpha induzierte uPA-Expression in verschiedenen Zelltypen. Darüberhinaus kann es die Expression des uPA-Rezeptors inhibieren. (Kobayashi, Suzuki et al. 2002)
c-ets-1	Dieser Transkriptionsfaktor aktiviert die Genpromotoren von Stromelysin 1, Kollagenase 1 und uPA. In normalen Epithelien ist er so gut wie nicht exprimiert, in Lungentumorgewebe hauptsächlich in Stromazellen (Bolon, Brambilla et al. 1996) (Bolon, Gouyer et al. 1995), während es beim Ovarialkarzinom auch in den Karzinomzellen nachgewiesen werden konnte (Takai, Miyazaki et al. 2000).
Chymotrypsin	(Tomita, Izumoto et al. 1989), Pankreasenzym, Rolle im Tumorgeschehen unbekannt
Cathepsin B	Eine Cystein-Protease, die Laminin, Kollagen IV und Fibronectin degradieren kann und uPA aktiviert. Sie befindet sich unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, in den Lysosomen. In Tumoren kann man eine vermehrte Expression und abweichende Verteilung, d.h. peripherwärts oder gar extrazellulär, beobachten. Besonders ausgeprägt ist die Überexpression in den invasiven Arealen eines Tumors, wie <i>in situ</i> -Studien gezeigt haben. Erhöhte Expression ist beim NSCLC mit einem verkürzten Überleben (Yan, Sameni et al. 1998) und vermehrtem Auftreten von intrapulmonalen und hämatogenen Metastasen assoziiert.
Granzym H	Wird von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen exprimiert. Induziert Apoptose der Zielzellen, Degradierung der EZM; chymotrypsinähnliche Aktivität (Edwards, Kam et al. 1999)
Heparanase	Keine Protease, ist die Heparanase dennoch in der Lage, extrazelluläre Matrix zu degradieren. Sie spaltet Heparansulfat-Proteoglykane und wird vor allem von metastatischen Zellen exprimiert. Transfizierte Zellen erlangen ein höheres metastatisches Potential im Mausexperiment (Vlodavsky, Friedmann et al. 1999).
Kallikreine 2, 5, 6, 7, 8	Hierbei handelt es sich um Mitglieder einer Serinproteasenfamilie, deren bekanntester Vertreter das Kallikrein 3 oder PSA ist. Kallikrein 2-Expression ist normalerweise wie Kallikrein 3 auf die Prostata beschränkt. Kallikrein 5, 6, 7 und 8 scheinen eine Rolle im Ovarialkarzinom zu spielen. Kallikrein 5 und 6 sind mit einer schlechteren Prognose beim Mammakarzinom verbunden, Kallikrein 5 beim Hodenkrebs. Den genannten Tumorentitäten ist ihre

	Hormonabhängigkeit gemeinsam. Kallikrein 2 kann uPA aktivieren. (Yousef und Diamandis 2002)
MT 5-MMP	Der fünfte Vertreter der membrangebundenen Metalloproteasen ist in der Lage, Gelatinase A zu aktivieren und wird in Glioblastomen überexprimiert gefunden. (Llano, Pendas et al. 1999)
PRSS 12	Beteiligt an Angiogenese und Entwicklung des Nervensystems (Aimes, Zijlstra et al. 2003)
PSTI/ TATI	Beim Bronchialkarzinom in 25-50% erhöhte Serumwerte, besonders bedeutsam bei gastrointestinalen Tumoren und beim Nierenzellkarzinom (Stenman 2002)
Tissue Factor	Der Proteasenrezeptor TF ist ein transmembranäres Glykoprotein, der durch Bindung und Aktivierung von Faktor VII die Gerinnungskaskade initiiert. Die zytoplasmatische Domäne scheint über VEGF und ABP (=Aktin bindendes Protein)-280 an Angiogenese bzw. Adhäsion und Migration durch Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt zu sein. (Ott, Fischer et al. 1998)
TIMP-3	Hemmt Tumorzellinvasion <i>in vitro</i> und induziert Apoptose (Baker, George et al. 1999)

Um die cDNA zu gewinnen, gibt es mehrere Möglichkeiten:

a) Amplifikation aus Klonen, die über das RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin) von der Lawrence Livermore National Library bezogen werden können (IMAGE-Klone). Dazu ist es notwendig, die GenBank-Nummer über die Internetseite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/blast.cgi?Jform=0> in eine RZPD-Nummer und diese Nummer dann auf der Seite des RZPD: <http://www.rzpd.de/dist/html/clones/OrderByName/order.html> in die Bestellnummer des Klones zu konvertieren. Von dort werden Bakterienkulturen mit einem definierten Insert geliefert. Mit passenden Primern kann daraus via PCR cDNA amplifiziert werden. Diese Methode ist vor allem dann vorteilhaft, wenn es sich um selten exprimierte cDNAs handelt, die aus Zelllinien nur schwer zu amplifizieren sind. Sie hat aber auch Nachteile. Dazu gehören der relativ hohe Preis, häufig vorkommende Kontaminationen, Verwechslungen und Zeitverlust durch lange Lieferzeiten. Nach Verzögerungen und Fehlern bei der Lieferung haben wir uns entschlossen, auf die Verwendung von IMAGE-Klonen zu verzichten.

b) Amplifikation aus cDNA

Eine zweite Möglichkeit besteht darin, auf der Internetseite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> in „Nucleotide“ die jeweilige cDNA zu suchen und

möglichst nahe am 3'-Ende geeignete Primerpaare zusammenzustellen, die etwa 200-1000 bp einschließen. Diese Primer wurden in PCR eingesetzt, dabei wurde versucht, aus Zelllinien-cDNA, aus Knochenmarks-cDNA und aus Monozyten-cDNA Banden der passenden Größe zu synthetisieren. Gelingt dies, wurde die cDNA mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Elektrophoresegel knapp ausgeschnitten und aus diesem wie weiter unten beschrieben extrahiert.

c) Zudem erhielten wir von Kooperationspartnern Plasmide mit cDNA-Inserts; mit spezifischen Primern wurden daraus die gewünschten Sequenzen amplifiziert.

Prof. Wiederanders, Universität Jena:

Caspase 1	Caspase 8
Caspase 2	Caspase 9
Caspase 3	Caspase 10
Caspase 4	IAP3
Caspase 6	rS9
Caspase 7	R13a

Dr. Jenne, MPI, Martinsried:

Medullasin = Elastase 2
Myeloblastin = Proteinase 3
Granzym B in "low copy bacteria"
Granzym A
Granzym K
Granzym M

Prof. Nehrlich, LMU, München:

MMP 13

2.2.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese diente der Größenkontrolle und Auftrennung von PCR-Produkten. Die Proben wurden mit 1 µl 1:1600 verdünntem Sybr Gold und 2 µl Dye

(0,3 % Orange G, 25 % Ficoll in TBE) versetzt und in die Taschen eines 1,5 %igen Agarosegels (in TBE) geladen, daraufhin wurde für 45 min eine Spannung von 160 V angelegt. Anschließend wurde das Gel auf einen UV-Schirm gelegt und fotografiert.

2.2.5 Extraktion der DNA aus dem Agarosegel

Die Gelextraktion wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach dem beiliegenden Protokoll durchgeführt. Danach lag die cDNA in 30 µl H₂O vor.

2.2.6 Konzentrationsbestimmung

Absteigende Verdünnungen (1:20, 1:40...1:320) einer DNA-Kontrollösung (Herring Sperm) bekannter Konzentration (1 mg/ml) wurden parallel zur analog verdünnten Probe auf ethidiumbromidhaltige Agarosegele aufgetragen und durch Vergleich der Fluoreszenz unter UV-Licht die Konzentration ermittelt.

2.2.7 Ligation

Die aus dem Gel extrahierte Sonde wurde anschließend in ein pGEM-T Easy-Plasmid ligiert. Es war darauf zu achten, dass die cDNA im Überschuss vorhanden ist. Die in 30 µl H₂O gelöste Probe wurde mit 1 µl Plasmid, 3,5 µl 10x Ligationspuffer und 1,5 µl Ligase versetzt und dieser Ansatz bei 15° C über Nacht inkubiert.

2.2.8 Transformation

Ein Aliquot mit 100 µl kompetenten XL-1blue-Bakterien (E.coli), die bei -80° C lagerten, wurde auf Eis aufgetaut und mit dem gesamten Ligationsansatz versetzt. Nach 5 min Inkubationszeit auf Eis wurde der Ansatz 5 min lang bei 37° C auf dem Thermoschüttler bewegt, danach wurden 900 µl LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37° C geschaukelt.

2.2.9 Klonierung/ Kontroll-PCR mit M13-Primern

Die transformierten Bakterien wurden auf Agarplatten ausgestrichen. Der Zusatz von Ampicillin erlaubte eine selektive Anzucht von Klonen, die das Plasmid aufgenommen hatten, da das Plasmid den Bakterien eine Ampicillinresistenz verleiht.

Es mußte darauf geachtet werden, dass die Klone höchstens 12 h lang angezchtet wurden, da sonst in einem kleinen Radius um den Klon sogenannte Satellitenklone ohne Plasmid wuchsen. Diese profitieren davon, dass die plasmidtragenden Bakterien das Ampicillin abbauen, sie können den Klon verunreinigen und die spätere Plasmidausbeute verringern. Einige der gewachsenen Klone wurden mit einer Pipettenspitze in je 30 µl LB-Medium suspendiert. Mittels PCR wurde daraufhin überprüft, ob sie das Plasmid mit dem jeweiligen Insert trugen. Die verwendeten Primer (M13 forward und reverse) binden innerhalb des Plasmides; hatte der Klon ein leeres Plasmid aufgenommen, so war in der PCR eine Bande von 251 bp nachweisbar. Wenn das Plasmid das gewünschte Insert enthielt, war die Bande entsprechend größer, und der Klon konnte in 10 ml und am nächsten Tag in 100 ml LB + Ampicillin angezchtet werden.

Der Ansatz für die PCR bestand aus:

1 µl Bakteriensuspension

1 µl PCR-Puffer + dNTP (1 mM)

0,25 µl BSA

0,5 µl taq-Polymerase

0,5 µl M13 forward (8 mM), 0,5 µl M13 reverse (8 mM)

7,25 µl H₂O

Programm :

1.	94° C	6:00	
2.	50° C	0:30	
3.	72° C	2:00	
4.	94° C	0:40] 14x
5.	50° C	0:30	
6.	72° C	1:00	
7.	94° C	0:40] 9x
8.	50° C	0:30	
9.	72° C	1:30	
10.	94° C	0:40	
11.	50° C	0:30	
12.	72° C	4:00	

2.2.10 Plasmid – Präparation

Um genügend Plasmid-DNA zu erhalten, wurde aus 100 ml Kultur eine Midi Plasmid-Präparation nach dem Protokoll von Qiagen durchgeführt. Hierbei wird die negativ geladene Plasmid-DNA zunächst an positiv geladene DEAE (Diethylaminoethanol)-Gruppen an der Oberfläche von Anionenaustauschersäulen gebunden. Abhängig von pH-Wert und Salzkonzentration kann die DNA nach Waschschrinen wieder von den Säulen abgelöst werden.

2.2.11 Amplifikation des Inserts

Eine Kontamination der Sonden mit bakterieller und Plasmid-DNA konnte dadurch verringert werden, dass das Insert nicht mit einem Restriktionsverdau aus dem Plasmid ausgeschnitten, sondern das Plasmid sehr stark verdünnt und das Insert in einer PCR mit spezifischen Primern amplifiziert wurde. Dazu wurde die Konzentration der Plasmid-DNA photometrisch bestimmt, eine 0,1 ng/µl-Verdünnung hergestellt und daraus die Inserts amplifiziert. In Kombination mit der anschließenden Elektrophorese und Gelextraktion konnte erreicht werden, dass die Sonde weitgehend frei von kontaminierender Plasmid - DNA war.

Der Ansatz für die PCR bestand aus:

10 µl Plasmid-DNA (0,1 ng/µl)
10 µl Puffer 1 Roche
3,5 µl dNTP (10 mM)
1 µl taq (2,5 U)
3 µl BSA
20 µl Primer 1 (8 µM)
20 µl Primer 2 (8 µM)
34 µl H₂O

Mit dieser PCR war es meist möglich, mindestens die für 60 Filter erforderlichen 3 µg Sonde herzustellen.

Das PCR-Programm sah folgendermaßen aus:

1.	94° C	2:00	
2.	58° C	0:30	
3.	72° C	2:00	
4.	94° C	0:20] 35x
5.	58° C	0:30	
6.	72° C	0:40	
7.	94° C	0:20	
8.	58° C	0:30	
9.	72° C	2:00	
10.	4° C		

2.2.12 Restriktionsverdau

Die einzigen Hinweise auf die Richtigkeit der klonierten Sonde waren bis hierhin, dass sie sich mit spezifischen Primern amplifizieren ließen und dass sie die erwarteten Größen besaßen. Eine weitere Kontrolle erfolgte dadurch, dass ein Restriktionsenzym, das eine bestimmte Abfolge von Basen spezifisch schneidet, dies genau an der vorhergesagten Stelle tat, was in einer Gelelektrophorese überprüft wurde. Das Restriktionsenzym wurde dabei so gewählt, dass es die Sequenz in zwei Bruchstücke trennte, wovon eines im Idealfall wesentlich größer war als das andere. Das kleinere war mindestens 200 Basenpaare groß, so dass es in der Elektrophorese gut sichtbar war.

Hierfür wurden 100 ng der Sonde, 0,25 µl BSA, 1,5 µl des Restriktionsenzym, 2,5 µl 10x-Puffer mit H₂O auf 25 µl aufgefüllt und 1 h lang bei 37° C verdaut. Eine Ausnahme war der Ansatz mit dem Enzym Taq 1, das bei 65° C optimal verdaut.

2.2.13 Auftragen der Sonden auf die Nylonmembranen

Die Sonden wurden nach Konzentrationsbestimmung mit H₂O auf die einheitliche Konzentration von 20 ng/µl gebracht und 150 µl in 0,5 ml-Reaktiongefäße gefüllt. Darauf folgte ein Denaturierungsschritt, um DNA–Einzelstränge auf die Membranen aufbringen zu können. Dazu wurde die cDNA 5 min bei 94° C denaturiert und anschließend sofort für 5 min auf Eis gestellt. Danach wurden 10 µl 1M NaOH

zugeben und 20 min bei RT inkubiert. Nun wurden 10 µl 20x SSC mit etwas Tinte (Pelikantinte 4001) versetzt und 5 µl 2,5 M Tris-HCl pH 7.1 zugegeben. Nach Zugabe dieses Ansatzes wurden die Proben auf 96 well-Flachbodenplatten aus Polypropylen aufgetragen und in diesen eingefroren. Unmittelbar nach dem Auftauen wurden die Platten in den BioGrid Roboter eingelegt, der dreimal hintereinander Stempel von 1 mm Durchmesser in die Sondenlösungen eintauchte und diese auf die positiv geladene Nylonmembranen aufbrachte, was einer DNA-Menge von 15 ng pro Punkt entspricht. Von jeder Sonde wurden zwei Punkte aufgetragen, um später Hybridisierungsartefakte besser ausschließen zu können. Um die DNA dauerhaft an die Membranen zu binden, wurde sie mit der Nylonmembran in einem UV-Belichter quervernetzt. Die Arrays konnten nun im Kühlschrank bis zum Gebrauch aufbewahrt werden.

2.2.14 Patientenproben

Alle Proben kamen aus der chirurgischen Abteilung der Lungenfachklinik Asklepios/Gauting. Von den operierten Patienten wurde uns ein kleiner Teil des Primärtumors, makroskopisch nicht befallene regionäre Lymphknoten und ein intraoperativ entnommenes Knochenmarkspunktat überlassen. Die Proben wurden für den Transport in steriles PBS gelegt. Um ein Absterben der Zellen zu vermeiden und mögliche externe Einflüsse auf die Transkription in den Zellen gering zu halten, war es wichtig, die Zeit bis zur Aufarbeitung kurz zu halten. Aus diesem Grund wurden die Proben mit einem Kurierdienst gebracht. Auf dem Weg vom Operationssaal bis in unser Labor verstrichen zwischen einer und sechs Stunden. Der Primärtumor wurde bei Ankunft sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C eingelagert. Der Lymphknoten wurde mit einer Schere in möglichst kleine Stücke geschnitten und diese in der Medimaschine mit etwas Nährmedium suspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend parallel zum Knochenmark im Sinne der unten beschriebenen Tumorzellanreicherung weiterverarbeitet.

2.2.15 Anreicherung

Lymphknoten aus der Lunge sind reich an Rußpartikeln. Um diese aus der Lymphknotensuspension und aus dem Knochenmark das Fett zu entfernen, erfolgte

ein erster Waschschrift in Hank's Solution. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 850 rpm (170 g) und Aufnahme in PBS wurden die Zellsuspensionen vorsichtig auf Percoll 50 geschichtet. Durch erneutes zehnminütiges Zentrifugieren bei 2050 rpm entstand eine Interphase, in der sich die meisten Tumorzellen befanden. Diese wurde abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Ein Waschschrift in PBS mit Zentrifugation bei 1500 rpm (500 g) diente dazu, Reste von Serum und Percoll zu entfernen, danach konnten die Zellen in einer Neubauerkammer gezählt werden.

Herstellung von Percoll 50: zu 100 ml Percoll werden 19 ml Hank's Salzlösung gegeben und der pH-Wert auf 7.4 eingestellt. Die Dichte der so gewonnenen Stammlösung (Percoll 100) beträgt 1,124 g/ml, was densitometrisch kontrolliert wird. Danach wird die Lösung über eine Spritze steril filtriert. Für Percoll 50 wird die Stammlösung 1:1 mit sterilem NaCl 0,9% verdünnt, die Dichte (1,065 g/ml) wird wiederum kontrolliert.

2.2.16 Färbung

Nun schloß sich eine Fluoreszenzfärbung gegen das Oberflächenmolekül EpCAM an, die eine Tumorzelldetektion unter dem Fluoreszenzmikroskop ermöglichte. In einem ersten Schritt wurden die Suspensionen in einem Ansatz aus 180 µl PBS, 19 µl AB-Serum und 1 µl (0,5 µg) 3B10-Antikörper für 10 min bei 4° C rollend inkubiert. Einem Waschschrift folgte die Zugabe von 179 µl PBS, 20 µl AB-Serum und 4 µl (5,6 µg) des Cy3-gekoppelten Sekundäntikörpers (anti-Maus-IgG) für 10 min unter Lichtschutz rollend bei 4° C. Nach erneutem Waschen konnten die Zellen in PBS aufgenommen und untersucht werden. Dazu wurde die Oberfläche eines Achtfeldobjektträgers mit BSA benetzt, um positive Bindungen abzudecken, und anschließend die Zellen auf Achtfeldobjektträger aufgetragen. Auf diese Weise wurden von den Lymphknoten je 1 Mio Zellen und vom Knochenmark je 500 000 Zellen ausgewertet. Blieben noch Zellen übrig, so wurden je 500 000 Zellen auf ein Feld eines Haftobjektträgers aufgebracht, um später davon Tumorzellen für die genomische Analyse gewinnen zu können. Nach einer Stunde waren die Zellen auf die positiv geladene Oberfläche dieser Objektträger sedimentiert und konnten ohne Zentrifugation lufttrocknen, nachdem der Überstand vorsichtig abgeklopft worden war.

2.2.17 Isolierung EpCAM-positiver Zellen

Da es sich bei EpCAM um ein Oberflächenmolekül handelt, erscheint eine gute Färbung als feiner zirkulärer Saum. Fiel eine solche Zelle auf, wurde im Durchlicht geprüft, ob es sich um eine intakte, dreidimensionale Zelle handelte. War das der Fall, wurde die Zielzelle unter dem Mikroskop mit einer feinen, elektronisch gesteuerten Pipette, dem sog. Micromanipulator, aspiriert. Diese Pipette bestand aus einer Steuereinheit und einem austauschbaren Endstück, das aus gezogenen Hämatokritkapillaren gefertigt war und nach jedem Einsatz gewechselt wurde. Um eine Adhäsion der Zellen an die Kapillare zu verhindern, wurde die Spitze vorher in FCS getaucht. Die Öffnung der Pipette war gerade so groß, dass einzelne Zellen und kleine Aggregate die Öffnung passieren konnten. Unter dem Mikroskop konnte man sich davon überzeugen, dass sich nur die gewünschte Zelle in der Kapillare befand, bevor sie dann in ein vorbereitetes, nur mit PBS präpariertes Feld abgelegt wurde. Von diesem Feld wurde die Zelle nun, auch hier unter Sichtkontrolle, in 1 µl mit einer Gilsonpipette aufgenommen und in ein vorbereitetes (s.u.) PCR-Reagenzgefäß überführt. Mithilfe des beschriebenen Verfahrens wurde eine Kontamination durch ungefärbte Zellen ausgeschlossen. Gelegentlich kommt es zu einer Bildung von Färbeartefakten. Davon betroffen sind vor allem Trümmer und Aggregate von toten Zellen. In der Fluoreszenz zeigen diese nicht das typische Färbemuster, sondern eher eine granuläre bis flächige Färbung, im Durchlicht sind sie meist flach und blass. Auch lassen sie sich nur sehr schwer isolieren, da sie sehr adhäsiv sind und entweder am Untergrund oder an der Kapillare haften bleiben.

2.2.18 cDNA-Synthese

Die isolierten Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben, in dem eine Suspension aus 10 µl Lysispuffer und Dyna-Beads (Fe₂O₃/ Fe₂O₄-Partikeln) vorlag. Diese Beads mit einem Durchmesser von 280 nm tragen an ihrer Oberfläche Oligo-dT(25)-Ketten. Um die Suspension aus Dyna-Beads und Lysispuffer vorzubereiten, wurden pro Ansatz 10 µl der Beads-Lösung aus der Originalpackung 1:1 mit LIDS-Waschpuffer gemischt und an einem Magneten der Überstand abgenommen. Ein weiteres Mal wurde mit 10 µl LIDS-Waschpuffer gewaschen und am Magneten der Überstand abgenommen. Nun wurden die Beads in 10 µl Lysispuffer aufgenommen und auf Eis sofort verwendet oder bei -20° C aufbewahrt. Wurde eine Zelle in den Lysispuffer

gegeben, so konnte die mRNA nach Lysieren der Zellmembran an die Beads binden, während die Reaktionsgefäße für 30 min bei Raumtemperatur rotierten. Ein Ansatz ohne Zelle diente als Negativkontrolle. Zu jedem Ansatz wurden nun 10 µl cDNA-Waschpuffer + Igepal gegeben. Die Proben wurden in den Magnetständer auf Eis gestellt und der Überstand, der u.a. das Genom der Zelle enthielt, sehr vorsichtig abgenommen, um keine mRNA zu verlieren. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß pipettiert, die DNA mit 80 µl 100% Ethanol gefällt und bei -20°C aufbewahrt. Unmittelbar nach dem Abnehmen des Überstandes mußten 20 µl cDNA-Waschpuffer + TWEEN zugegeben werden, damit die mRNA nicht austrocknen konnte. Die Beads wurden in diesem Puffer in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um den Lysispuffer möglichst restlos zu entfernen. Dann wurde der Überstand abgenommen und die Beads erneut in cDNA-Waschpuffer + Igepal gewaschen. Nach Abnehmen des Waschpuffers wurden in einem nächsten Schritt die Anlagerung (Annealing) der Primer für die reverse Transkription, CFL5c8 (200 µM) und CFL5cT (100 µM), ermöglicht. In der Annealinglösung befanden sich je 3 µl der Primer, 2 µl 5XRT-Puffer, 1 µl 0,1 M DTT, 0,5 µl Igepal 10% und 0,5 µl HPLC-gereinigtes Wasser. Damit wurden die Beads 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden nochmal 2 µl 5XRT-Puffer, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP, 5 µl Wasser und 1 µl der Reversen Transkriptase Superscript II zugegeben. Bei 44°C erfolgte dann während 45 min in einem Hybridisierungssofen rotierend die Synthese der cDNA.

2.2.19 Amplifikation

Mit einer Terminalen Desoxynucleotidyl Transferase (TdT) und dGTP als alleinigem Nukleotid lassen sich dGTP-Ketten an das 3'-Ende der Einzelstrang-cDNA synthetisieren („Tailing“). Vor dem Tailing wurden die Beads einmal in 20 µl Tailing-Waschpuffer gewaschen. Daraufhin wurde ein Mix aus 1 µl 40 mM MgCl_2 , 1 µl 1 mM DTT, 1 µl 2 mM dGTP, 0,5 µl 200 mM KH_2PO_4 und 6,5 µl Wasser zugegeben und die Proben 4 min bei 94°C denaturiert. Von dort wurden sie direkt auf Eis gestellt und mit 0,5 µl Enzym versetzt. Die Tailingreaktion fand bei 37°C statt und dauerte eine Stunde. Vor weiteren Reaktionsschritten mußte die TdT 5 min bei 70°C inaktiviert werden. Für die globale Amplifikation mit CP_2 -Primern wurde ein Mix aus 4 µl Puffer 1 von Roche, 7,5 µl 20 % Formamid und 24 µl H_2O zur Probe gegeben, der Ansatz

mit Öl überschichtet, da ein Heißstart folgte, und die Probe in einer PCR-Maschine auf eine Temperatur von 78° C gebracht. Bei 78° C folgte das Zugeben eines weiteren Mixes aus 24 µl CP₂, 10 mM dNTP und 1,5 µl der Taq Expand Long Template-Polymerase. Die hohe Anlagerungstemperatur des unten skizzierten Programmes und die Verwendung von Formamid berücksichtigen den hohen Schmelzpunkt der C-G-Bindungen und erhöhen die Stringenz der PCR.

Folgendes PCR - Programm wurde für die Amplifikation verwendet:

- | | | | | |
|-----|--------------|--------|-----------------|--------|
| 1. | 78° C | 0:30 | | |
| 2. | 94° C | 0:15 | | |
| 3. | 65° C | 0:30 | | |
| 4. | 68° C | 2:00 , | zurück zu 2. | 19 mal |
| 6. | 94° C | 0:15 | | |
| 7. | 65° C | 0:30 | | |
| 8. | 68° C | 2:30 | +10 sec/ Zyklus | |
| | zurück zu 6. | 20 mal | | |
| 10. | 68° C | 7:00 | | |
| 11. | 4° C | | | |

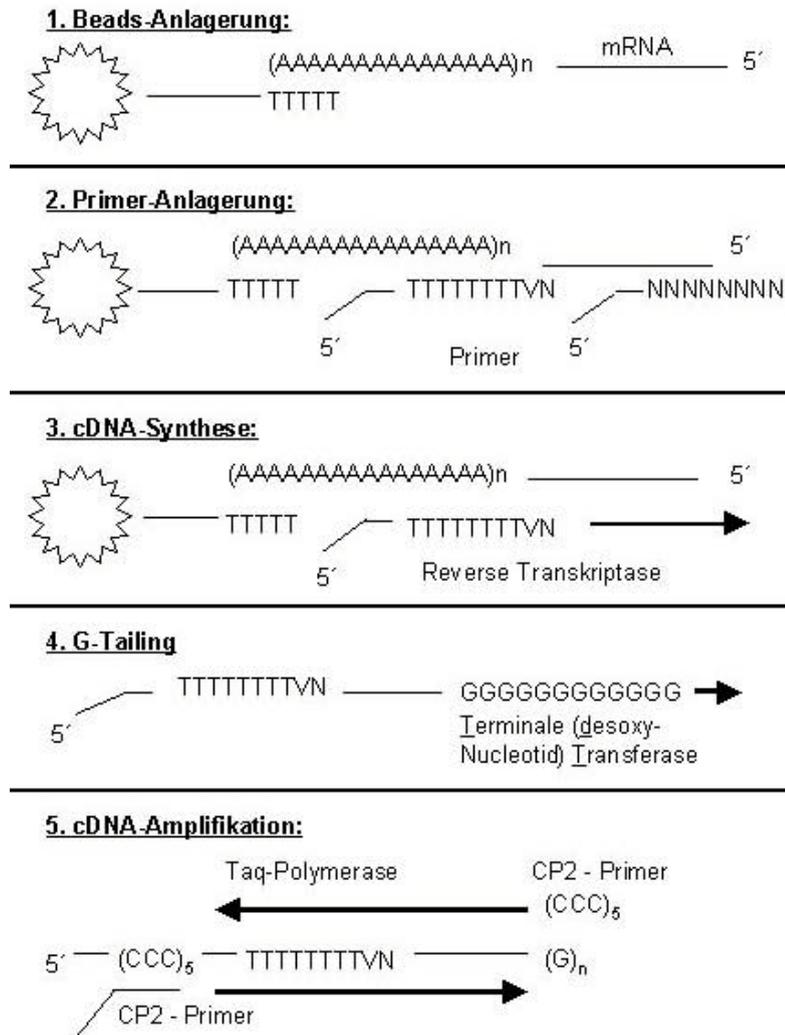


Abbildung 2 Schematische Darstellung von cDNA-Synthese und globaler Amplifikation

1) Magnetische Partikel (Beads), an deren Oberfläche Poly-T-Moleküle gekoppelt sind, binden an komplementäre Poly-A-Enden der mRNA 2) Zwei Primer, ein Oligo-T-Primer, der an das 3'-Ende der mRNA bindet, und ein Zufallsprimer lagern sich an die mRNA an und erlauben 3) die reverse Transkription in cDNA. 4) Das Enzym Terminale Deoxynucleotidtransferase (TdT) heftet ein Poly-G-Ende an die cDNA an. 5) Dieses dient als Ausgangspunkt für die nun folgende globale Amplifikation mit einem Oligo-C-Primer.

2.2.20 Kontroll-PCR

Vom Amplifikationsprodukt wurden in einer 1:10-Verdünnung 1 μ l als Ausgangsmaterial für eine spezifische PCR auf β -Aktin, EpCAM, EF-1alpha, Zytokeratin 8 und 18 eingesetzt. Der Ansatz dieser PCR bestand aus:

1 µl 1:10-verdünnter cDNA
1 µl PCR-Puffer + dNTP (1 mM)
0,25 µl BSA
0,5 µl taq-Polymerase (2,5 U)
je 0,5 µl der spezifischen Primer (8 mM)
7,25 µl H₂O

und wurde in einer PCR-Maschine in 60 Zyklen bei einer Anlagerungstemperatur von 58° C amplifiziert.

2.2.21 Digoxigenin-Markierung

In der Markierungs-PCR wurden Digoxigenin-11-dUTP–Nukleotide in die Sonden eingebaut. Als Primer dienten wieder CP₂ - Oligonukleotide. Der Ansatz bestand aus:

2,5 µl Thermo Sequenase Reaction Buffer
1,75 µl 1/7-Mix (10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dATP, 8,4 mM dTTP)
7,5 µl Formamid 20%
5,0 µl µl CP₂-Primer 24 µM
2,5 µl Digoxigenin-11-dUTP 1mM
0,5 µl Thermo Sequenase (16 U)
30,5 µl H₂O.

Die cDNA wurde nun exponentiell amplifiziert. Das Programm dafür war:

- | | | |
|-----|--------------|-----------------------|
| 1. | 94° C | 02:00 |
| 2. | 68° C | 04:00 |
| 3. | 94° C | 00:15 |
| 4. | 68° C | 04:00 |
| 5. | zurück zu 3. | 10 mal |
| 6. | 94° C | 00:15 |
| 7. | 68° C | 04:00 + 10 sec/Zyklus |
| 8. | zurück zu 6. | 2 mal |
| 9. | 68° C | 07:00 |
| 10. | 4° C | |

Um 1,5 µg markierte DNA auf einen Array hybridisieren zu können, war noch eine Konzentrationsbestimmung des markierten PCR-Produktes wie weiter oben beschrieben notwendig.

2.2.22 Prähybridisierung der Arrays

Durch Prähybridisierung der Arrays mit einer Lösung, die E.coli- und Plasmid-DNA (pBS) enthielt, sollte verhindert werden, dass kontaminierende (markierte) bakterielle DNA in der Probe an komplementäre Sequenzen auf dem Array bindet. Die Blockierungs-DNA wurde durch eine DNase in Fragmente geschnitten, die eine Länge zwischen 100 und 2000 Basenpaaren besaßen. Der Verdau von 600 µg DNA in 540 µl Wasser, 60 µl 10x NT-Puffer und 1 µl DNase bei 15° C dauerte 15 min, der Erfolg wurde in einer Gelelektrophorese kontrolliert. Gleichzeitig wurden 6 ml Dig Easy-Hybridisierungslösung auf 45° C erwärmt und 5 ml davon zum Array in die Hybridisierungsröhre gefüllt. Das verdaute pBS-E.coli-DNA-Gemisch (100 µg/µl) wurde in 1 ml Dig Easy Hyb bei 95° C für 5 min denaturiert und ebenfalls in die Hybridisierungsröhre gegeben. Die Arrays rotierten nun über Nacht bei 45° C im Hybridisierungsöfen.

2.2.23 Hybridisierung der Arrays

Am folgenden Tag wurden von der Prähybridisierungslösung 1 ml abgenommen, mit 9 µg der Probe versetzt, 5 min bei 95° C denaturiert und wieder zurück in die Hybridisierungsröhre gefüllt, um weitere zwei Tage bei 45° C zu hybridisieren.

2.2.24 Waschen der Arrays

Die einzelnen Waschschritte erfolgten mit ansteigender Stringenz bei 68° C im Hybridisierungsöfen. Nach Abgießen der Hybridisierungslösung wurden die Arrays kurz mit vorgewärmtem 2x SSC + 0,1% SDS und 1x SSC + 0,1% SDS gespült, dann wurde 0,5x SSC + 0,1% SDS zugegeben und 15 min im Ofen rotierend gewaschen. Abschließend wurde zweimal für 30 min in 0,1x SSC + 0,1% SDS im Ofen rotierend gewaschen.

2.2.25 Blockieren unspezifischer Antikörperbindungsstellen

Nach dem Waschen schaukelten die Arrays bei Raumtemperatur 30 min lang in kleinen Schalen in einer Blockierungslösung, um den Hintergrund zu reduzieren. Zur Herstellung der Blockierungslösung wurden 10 g des Blockierungsreagenz in 100 ml Puffer 1 unter Erhitzen aufgelöst und diese Stocklösung dann vor Gebrauch 1:10 mit Puffer 1 verdünnt.

2.2.26 Entwicklung mit dem „Dig Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids“

Dabei handelt es sich um ein nicht radioaktives Verfahren zum Nachweis der vorher mit Digoxigenin-11-dUTP markierten cDNA. In die Blockierungslösung wurden 2,5 µl des Alkalische Phosphatase-gekoppelten Antikörpers gegeben und 30 min inkubiert. Anschließend wurde in einer neuen Schale zweimal 15 min lang in Puffer 1 + Tween und einmal kurz in Puffer 3 gewaschen. 10 µl CSPD (5'-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat), verdünnt mit 990 µl Puffer 3, wurden auf den Array gegeben und dieser damit 5 min lang bei 37° C inkubiert. Danach wurde mit einem Papiertuch die Flüssigkeit leicht abgetupft und der Array in eine Klarsichthülle gelegt. Die Alkalische Phosphatase setzte nun das Substrat CSPD um, dabei entstand Licht, das innerhalb von etwa 20-40 min einen Röntgenfilm schwärzte.

2.2.27 Ablösen der gebundenen cDNA

Meistens war es möglich, die Arrays zweimal wiederzuverwenden. Dazu entfernte man die gebundene cDNA durch Denaturierung und Waschen mit 0,2 M NaOH + 0,1% SDS, außerdem trennte dieser Schritt auch das alkalilabile Hapten Digoxigenin von den dUTP ab. Die Aufbewahrung bei -20° C schützt die Arrays vor Schimmelbefall, welcher bei 4° C gelegentlich auftrat und die Filter unbrauchbar machte.

2.2.28 Auswertung der Arrays

Über den Röntgenfilm wurde die in Tabelle 1 abgebildete Matrix gelegt, und die Signale wurden unter Berücksichtigung des Intensitätsniveaus der Haushaltsgene semiquantitativ zwischen 0 (kein Signal) bis 3 (starkes Signal) eingestuft. Auf dem

Array wurde jede Sonde zweimal aufgetragen. Die blau markierten Sonden waren absteigend angeordnet, die schwarz markierten aufsteigend.

Tabelle 4 Arraymatrix

CK7	Mage1F	β 3	Chymotrypsin	MMP1	ADAM15	Cystatin A	PAI-1	R13a	β -Aktin
CK8	Mage2F	β 4	PRSS12	MMP 13	ADAM20	Cystatin B	PAI-2	IAP3	EF-1a
CK10	Mage3F	β 5	"Tigger1"	Cathepsin B	ADAM21	Cystatin C	Str 1	rS9	GAPDH
CK13	Mage4F	β 7	Bikunin	Cathepsin D	TACE	Tissue Factor	Str 3	1323	
CK18	Mage12F	KLK2	Gel A	Cathepsin F	Caspase7	GFP	c-ets-1	Medullasin	
CK19	alpha2	KLK5	Gel B	Cathepsin H	Caspase8			Myeloblastin	
CK20	alpha4	KLK6	ADAM8	MT-1	Caspase9	Heparanase	uPa	Cathepsin K	
Mage1	alpha5	Caspase1	ADAM9	MT-2	Caspase10	CEA	uPAR	Cathepsin L	
Mage3	alpha6	Caspase2	ADAM10	MT-3	PSTI	TIMP-1	Gzm K	Cathepsin S	
Mage4	alphav	Casp3	ADAM11	Matrilysin	Gzm A	TIMP-2	Gzm M	Cathepsin V	
Mage6	β 1	Caspase4	EMMPRIN I	KLK7	Gzm B	TIMP-3	MT-4	Cathepsin W	● ●
Mage12	β 2	Caspase6	EMMPRIN II	KLK8	Gzm H	TIMP-4	MT-5	Ubiquitin	● ●

2.2.29 Statistik

Sämtliche statistische Auswertungen wurden mithilfe von SPSS für Windows, Version 11.5.1 (November 2002), SPSS Inc., durchgeführt.

2.2.29.1 Fisher's Exact Test

Der Fisher's Exact Test für Vierfeldertafeln wird verwendet, wenn die Fallzahl einer Gruppe klein ist. Damit wurde berechnet, ob sich die Detektionsrate von disseminierten Zellen in Lymphknoten von Adenokarzinom- und Plattenepithelkarzinompatienten signifikant unterscheidet.

2.2.29.2 T-Test bei unabhängigen Stichproben

Im T-Test bei unabhängigen Stichproben werden die Mittelwerte zweier Fallgruppen verglichen. Damit wurde getestet, ob Einzelzellen sich in der Höhe ihrer Proteasenexpression von Aggregaten unterscheiden.

3 Ergebnisse

3.1 Detektion und Isolierung einzelner disseminierter Tumorzellen aus Knochenmark und Lymphknoten

3.1.1 Vergleich der Detektionsraten in der Lebendfärbung und auf Haftobjektträgern (HOT)

Knochenmark und Lymphknoten sind geeignete Gewebe, um nach einzelnen disseminierten Tumorzellen zu suchen, da die Proben einerseits perioperativ leicht gewonnen werden können, andererseits hämatogene und lymphogene Metastasierungswege widerspiegeln. Die Zellen liegen jedoch nur in geringer Konzentration vor, deshalb wurden mit Hilfe einer Percolldichtegradienten-Zentrifugation die Tumorzellen gemeinsam mit Monozyten in einer Interphase angereichert und so die Detektionsrate erhöht. Von insgesamt 86 Knochenmarkproben wurden je 500.000 dieser angereicherten Zellen mit dem EpCAM-Antikörper immunzytochemisch gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop auf das Vorhandensein von Tumorzellen untersucht. Von den 84 Lymphknotenproben wurden so jeweils eine Million Zellen untersucht. Überschüssige Zellen wurden auf Haftobjektträgern konserviert. Auf diese Weise konnten in 75 Knochenmarkproben eine gegen die Zytokeratine 8, 18 und 19 gerichtete Färbung mit dem Antikörper A45-F_{ab} und in 58 Lymphknotenproben eine gegen EpCAM gerichtete Färbung mit dem 3B10-Antikörper durchgeführt werden. Bei elf Proben aus dem Knochenmark und 26 Proben aus Lymphknoten waren nach der Lebendfärbung nicht mehr genügend Zellen vorhanden, um Haftobjektträger herzustellen.

Tabelle 5 Vergleich der Detektionsraten einzelner disseminierter Zellen und kleiner Aggregate in lebenden und permeabilisierten (HOT) Zellen aus dem Knochenmark

	KM-Proben	KM-Proben mit gefärbten Zellen	KM-Proben mit 1 gefärbten Zelle	KM-Proben mit 1 gefärbten Aggregat	KM-Proben mit >1 gefärbten Zelle/ >1 gefärbten Aggregat
Lebendfärbung (EpCAM-Antikörper)	n=86	16 (19%)	6 (7%)	0	10 (12%)
HOT (Panzytokeratin-Antikörper)	n=75	11 (15%)	6 (8%)	0	5 (7%)

Tabelle 6 Vergleich der Detektionsraten einzelner disseminierter Zellen und kleiner Aggregate in lebenden und permeabilisierten (HOT) Zellen aus Lymphknoten

	LK-Proben	LK-Proben mit gefärbten Zellen	LK-Proben mit 1 gefärbten Zelle	LK-Proben mit 1 gefärbten Aggregat	LK-Proben mit >1 gefärbten Zelle/ >1 gefärbten Aggregat
Lebendfärbung (EpCAM-Antikörper)	n=84	16 (19%)	6 (7%)	4 (5%)	6 (7%)
HOT (EpCAM-Antikörper)	n=58	7 (12%)	2 (3%)	0	5 (9%)

Es fand sich kein wesentlicher Unterschied in der Detektionsrate zwischen den beiden Methoden. Nun wurde bei den Patienten, von denen sowohl Ergebnisse aus der Lebendfärbung als auch von den Haftobjektträgern vorlagen, überprüft, wie häufig bei den gleichen Patienten mit beiden Methoden Zellen detektiert werden konnten:

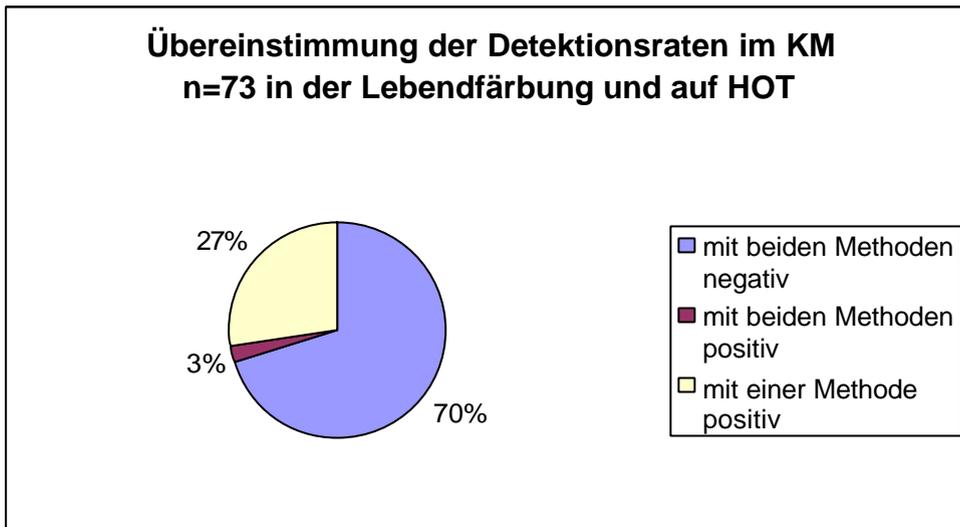


Abbildung 3 Vergleich der Lebendfärbung mit der Färbung permeabilisierter Zellen im KM

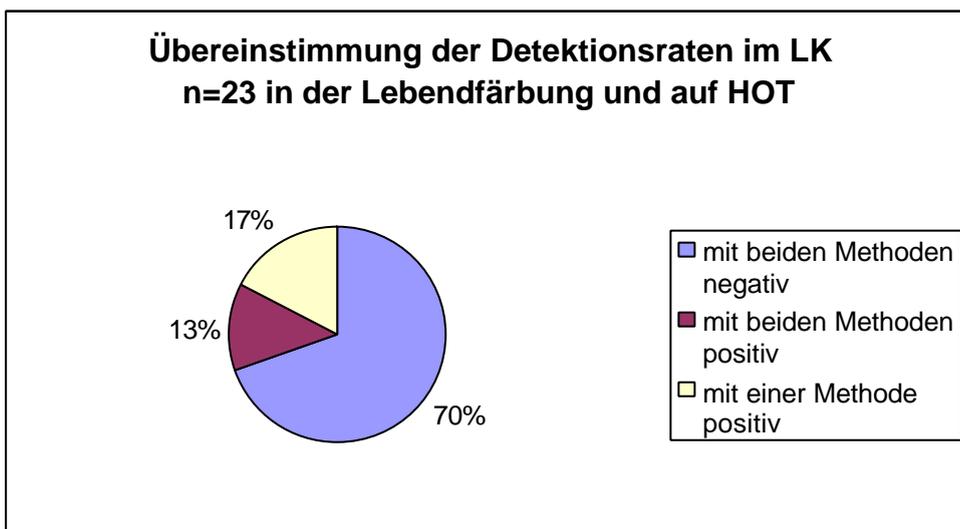


Abbildung 4 Vergleich der Lebendfärbung mit der Färbung permeabilisierter Zellen im LK

Abbildung 3 und 4 veranschaulichen, dass nur selten mit beiden Methoden positive Zellen gefunden werden konnten. Besonders ausgeprägt ist dies im Knochenmark, wo im Gegensatz zum Lymphknoten auf den HOT ein anderer Primärantikörper (A45 F_{ab}) verwendet wurde.

3.1.2 Detektionsrate EpCAM-positiver Zellen in Abhängigkeit von Histologie sowie pTNM-Status im Knochenmark bzw. in Lymphknoten

Der Begriff NSCLC umfaßt eine Gruppe von Histologien, die im folgenden weiter in Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome, Großzellige Karzinome und Sonstige unterteilt werden. In der folgenden Übersicht sind die Detektionsraten von EpCAM-positiven Zellen in Lymphknoten und Knochenmark innerhalb der verschiedenen Histologien und pTNM-Stadien dargestellt.

Tabelle 7 Detektionsrate EpCAM-positiver Zellen in Abhängigkeit von Histologie sowie pTNM-Status in Knochenmark bzw. Lymphknoten

	Patienten n=91	LK n=84	mit EpCAM+ Zellen	KM n=86	mit EpCAM+ Zellen
Histologie					
Adenokarzinom	37 (41%)	34	9 (26%)	38	9 (24%)
Plattenepithelkarzinom	36 (40%)	35	5 (14%)	31	5 (16%)
Großzelliges Karzinom	9 (10%)	9	2 (22%)	8	2 (25%)
Sonstige	9 (10%)	6	0	8	0
Primärtumor					
T1, T2	58 (64%)	57	11 (19%)	56	10 (18%)
T3, T4	26 (29%)	24	5 (21%)	23	6 (26%)
unbekannt	7 (8%)	3	0	7	0
LK-Status					
N0	39 (38%)	38	5 (13%)	37	9 (24%)
N1, N>1	46 (40%)	45	11 (24%)	44	6 (14%)
unbekannt	6 (11%)	1	0	5	1 (20%)
M-Status					
M0	82 (91%)	80	15 (19%)	79	16 (20%)
M1	2 (1%)	1	1 (100%)	0	0
unbekannt	7 (8%)	3	0	7	0

Vergleicht man die Detektionsraten in Lymphknoten von Adenokarzinomen und Plattenepithelkarzinomen, so fällt eine höhere Rate in den Adenokarzinomen auf. Dieser Unterschied ist jedoch mit $p=0,244$ (Fisher's Exact Test) nicht signifikant.

3.1.3 Beispiel für die Isolierung einer Tumorzelle

Nachdem die Zellen unter dem Mikroskop anhand positiver EpCAM-Färbung und Morphologie als mutmaßliche Tumorzellen identifiziert waren, wurden sie mit dem Eppendorf Mikromanipulator aspiriert. Die folgende Abbildung zeigt ein Beispiel für eine erfolgreiche Isolierung.

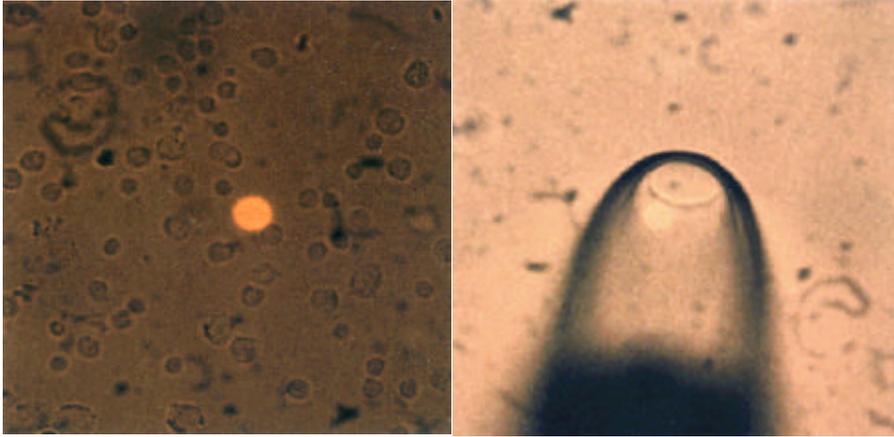


Abbildung 5 Isolierung der EpCAM⁺ Zellen

Auf der linken Seite kann man eine gelb leuchtende EpCAM⁺ Zelle unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennen, rechts wird sie mit dem Eppendorf Mikromanipulator aspiriert.

3.1.4 Häufigkeit von Aggregaten in Lymphknoten und Knochenmark

Im Knochenmark konnten ausschließlich Einzelzellen detektiert und isoliert werden. In den Lymphknoten sind insgesamt 27 Einzelzellen und 23 Aggregate isoliert worden. Beim Vorliegen mehrerer Aggregate kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Miniaggregate Bruchstücke einer größeren Mikrometastase sind. Von den Aggregaten konnten 17 erfolgreich hybridisiert werden (74 %), von den Einzelzellen nur sieben (26 %).

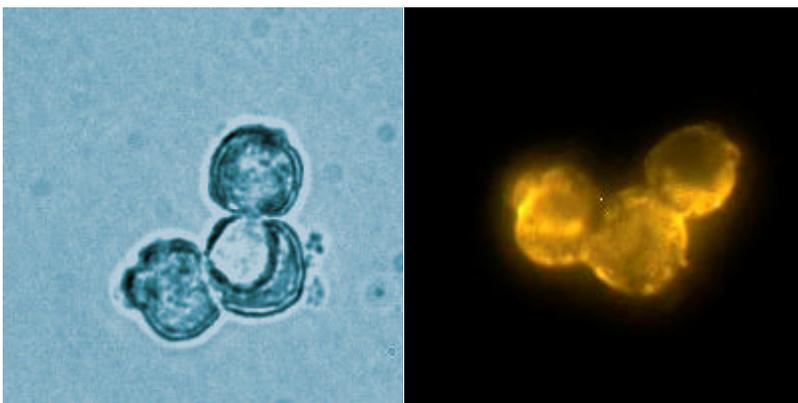


Abbildung 6 Beispiel für ein Mikroaggregat (Fi4)

Die Abbildung zeigt ein kleines Aggregat, bestehend aus drei Zellen, links im Durchlicht und rechts unter Fluoreszenzlicht.

3.2 Kontrolle der globalen Amplifikation des Einzelzelltranskriptoms und Austestung von zwei verschiedenen Terminalen Desoxynukleotidtransferasen

3.2.1 Expressionsnachweis von Haushaltsgenen und epithelialen Markern (Kontroll-PCR)

Um den Erfolg der globalen Amplifikation zu überprüfen, wurden spezifische PCR auf sogenannte Haushaltsgene durchgeführt. Dabei handelt es sich um Transkripte, die in jeder Zelle konstitutiv vorhanden sein sollten. Ausgewählt wurden β -Aktin und der Elongationfaktor EF-1alpha, außerdem EpCAM, das Oberflächenadhäsionsmolekül, gegen das schon die Färbung zur Detektion der Zellen gerichtet war, und CK 8 bzw. CK 18.

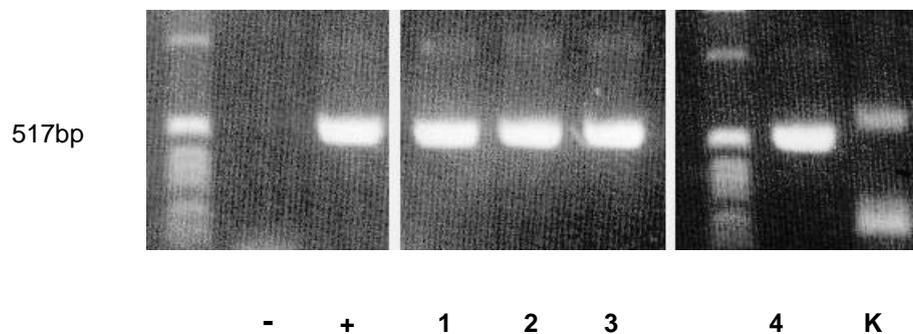


Abbildung 7 β -Aktin-Expression in Fi1, Fi2, Fi3, Fi4 und in der Kontrolle K

Die Abbildung zeigt eine Kontroll-PCR der β -Aktin-Expression in den Tumorzellen Fi1, 2, 3 und 4 auf einem Agarosegel. K ist eine Negativkontrolle, die bei der reversen Transkription und bei der globalen Amplifikation der cDNA mitgeführt wurde. Bei 1,2,3 und 4 entsteht wie in der Positivkontrolle + eine Bande der richtigen Größe, bei K eine unspezifische Bande.

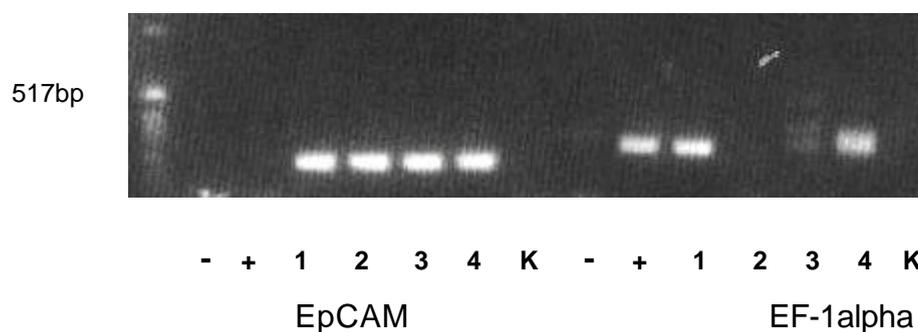
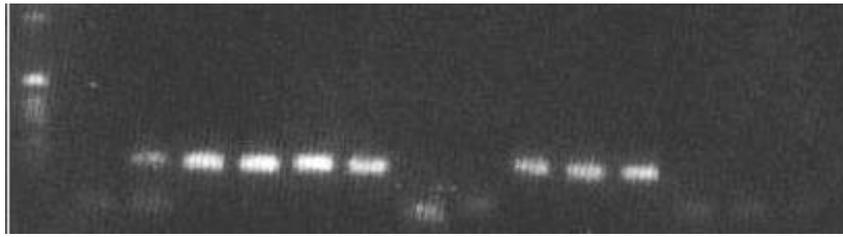


Abbildung 8 EpCAM - und EF-1alpha - Expression in denselben Proben wie oben

Dieses Agarosegel zeigt die Ergebnisse für EpCAM und EF-1alpha in den Tumorzellen Fi1-4. EpCAM wird in den Zellen 1-4 exprimiert, EF-1alpha nur in den Zellen 1 und 4. K ist in beiden Fällen, wie gefordert, negativ.

517bp



- + 1 2 3 4 K - + 1 2 3 4 K

CK8

CK18

Abbildung 9 Zytokeratin 8 - und 18 – Expression in denselben Proben wie oben

Die Expression von Zytokeratin 8 lässt sich in allen vier Zellen dieses Beispiels nachweisen. Zytokeratin 18 kann nur in den Zellen 1 und 2 gefunden werden. K ist auch hier negativ.

Folgende Resultate ergaben sich in der Kontroll-PCR für die isolierten Zellen:

Tabelle 8 Ergebnisse der Kontroll-PCR

	Aktin	EpCAM	EF1a	CK8	CK18	hybridisiert		Aktin	EpCAM	EF1a	CK8	CK18	hybridisiert
A1	0	0	0	n.d.	n.d.		La5	0	0	0	1	1	1
A2	0	0	0	n.d.	n.d.		La6	0	1	1	n.d.	n.d.	
A3	0	0	0	n.d.	n.d.		La7	0	0	0	0	0	
B1	1	0	1	0	1	1	M1	0	0	1	0	0	
B2	n.d.	0	1	0	0		M2	0	0	1	0	0	
B3	n.d.	0	1	0	0		M3	1	0	1	0	0	1
D1	1	1	0	1	1	1	M4	0	0	n.d.	0	0	
D2	1	0	0	0	0		Ms1	0	0	0	n.d.	n.d.	
D3	0	0	0	0	0		Ms2	0	0	0	n.d.	n.d.	
D4	1	0	0	0	0		Ms3	0	0	0	n.d.	n.d.	
D5	0	0	0	0	0		Mt11	0	0	0	n.d.	n.d.	
E1	0	0	0	n.d.	n.d.		Mt12	0	0	0	n.d.	n.d.	
E2	0	0	0	n.d.	n.d.		Mt13	0	0	0	n.d.	n.d.	
Fi1	1	1	1	1	1	1	Mt20	0	0	0	n.d.	n.d.	
Fi2	1	1	0	1	1	1	Mt21	0	0	0	n.d.	n.d.	
Fi3	1	1	0	1	0	1	Mt22	0	0	0	n.d.	n.d.	
Fi4	1	1	1	1	0	1	N1	0	0	1	0	0	
Hc	0	0	0	0	0		N2	1	0	1	0	0	
Ha1	0	0	0	n.d.	n.d.		N4	1	0	0	0	1	1
Ha2	0	0	1	0	0		N5	0	0	0	n.d.	n.d.	
Hy	n.d.	n.d.	1	0	0		P	0	0	0	n.d.	n.d.	
Hb	0	0	0	0	0		R1	0	0	1	1	1	
Ke1	0	0	0	1	1	1	R2	0	0	0	0	0	
Ke2	0	0	1	1	1		S2	0	0	n.d.	0	1	
Ke3	1	0	1	1	1	1	S3	0	1	n.d.	n.d.	1	
Ki1	1	0	0	1	0	1	S4	0	1	n.d.	n.d.	1	
Ki2	0	1	1	0	1	1	S5	1	0	1	1	1	1
Ki3	0	0	1	0	0	1	Sch1	1	1	1	0	0	
Ki4	1	1	0	1	1	1	Sch2	n.d.	n.d.	0	0	0	
Ko1	1	0	0	0	0		Sch3	n.d.	n.d.	0	0	0	
Ko2	0	1	1	0	1	1	Sch4	0	1	0	0	0	
Ko3	1	1	1	0	1	1	SK	0	0	0	1	0	
Ko4	1	1	1	0	1	1	SR1	1	0	1	n.d.	n.d.	1
Ko5	0	0	0	0	0		SR2	1	0	1	0	0	1
Ku1	1	1	1	1	1	1	Se1	1	0	1	1	1	1
Ku2	1	0	1	0	0	1	Se2	1	1	1	1	1	1
Ku3	1	1	1	0	1	1	Se3	1	1	1	1	1	1
Ku4	1	0	1	1	1	1	U1	0	0	0	n.d.	n.d.	
Ku5	0	0	0	0	0	1	U2	0	0	0	n.d.	n.d.	
Ku6	1	0	0	0	0	1	U3	0	0	0	n.d.	n.d.	
Ku7	1	0	0	1	0	1	W	1	1	1	1	1	1
La1	0	0	0	0	0		Zh1	1	0	0	0	0	
La2	0	0	0	0	0		Zh2	1	0	1	0	0	
La3	0	1	0	n.d.	n.d.		Ze1	0	0	1	n.d.	n.d.	1
La4	1	0	1	1	1	1	Ze2	0	0	0	n.d.	n.d.	

1: positiv, 0: negativ, n.d.: nicht durchgeführt

3.2.2 Vergleich der Ergebnisse der Kontroll-PCR mit den Arrayergebnissen

Grundsätzlich sollte für alle Zellen zumindest ein Zytokeratin oder EpCAM als Hinweis auf die epitheliale Differenzierung und damit indirekt auf das Vorliegen einer Tumorzelle positiv sein. Dies war mit Ausnahme von Ku 5 und Ku 6 der Fall. Ku 5 hybridisierte auf dem Array mit Mage, einem Malignitätsmarker, und den Haushaltsgenen GAPDH und Ubiquitin, so dass die Arrayergebnisse trotzdem gewertet wurden.

Aktin, EF-1alpha, CK 8 und 18 wurden auch auf dem Array untersucht. Die Nachweisraten mit beiden Methoden sind in folgender Graphik verglichen worden:

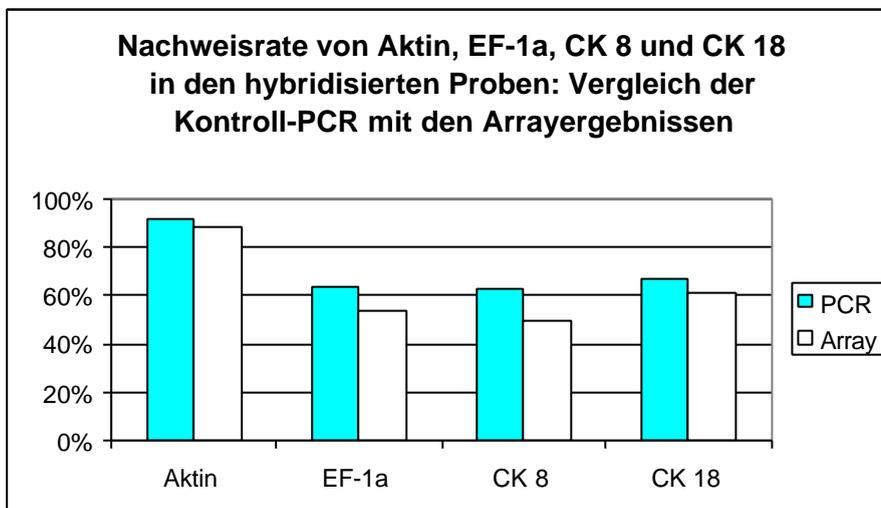


Abbildung 10 Vergleich der Nachweisrate von Aktin, EF-1alpha, CK 8 und CK 18 in der Kontroll-PCR und auf den Arrays

In dieser Abbildung wurden die Nachweisraten von Aktin, EF-1a, CK 8 und CK 18 in den hybridisierten Proben (n=26) verglichen. Die Probenzahl in der PCR betrug bei Aktin n=25, bei EF-1alpha n=25, bei CK 8 n=24 und bei CK 18 n=24.

3.2.3 Vergleich von zwei Terminalen Desoxynukleotidtransferasen verschiedener Hersteller

Da die globale Amplifikation des Einzelzelltranskripts im Sommer 2000 besonders häufig nicht gelang, wurde untersucht, ob durch den Austausch der zu diesem Zeitpunkt verwendeten TdT von MBI gegen ein Enzym von Pharmacia eine Verbesserung erzielt werden konnte. Dazu wurde ein Ansatz von MCF-7 – cDNA halbiert und je fünf Units MBI- bzw Pharmacia-TdT zugegeben. Die TdT von

Pharmacia erwies sich als überlegen und wurde daher für die weiteren Experimente mit Patientenproben verwendet.

Tabelle 9 Ergebnisse der Tailing-Reaktion mit den Enzymen der Hersteller Pharmacia und MBI

		β-Aktin	EpCAM	EF-1alpha	Zytokeratin 18
MBI	Ko	neg	neg	neg	neg
	1	neg	pos	pos	neg
	2	neg	pos	pos	neg
	3	neg	neg	pos	neg
Pharmacia	Ko	neg	neg	neg	neg
	1	neg	pos	pos	pos
	2	neg	pos	pos	pos
	3	pos	neg	pos	pos

Dieses Experiment fand am 8. Juni 2000 statt. In folgender Abbildung sind die Ergebnisse der Kontroll-PCR in Abhängigkeit vom Datum der globalen Amplifikation dargestellt:

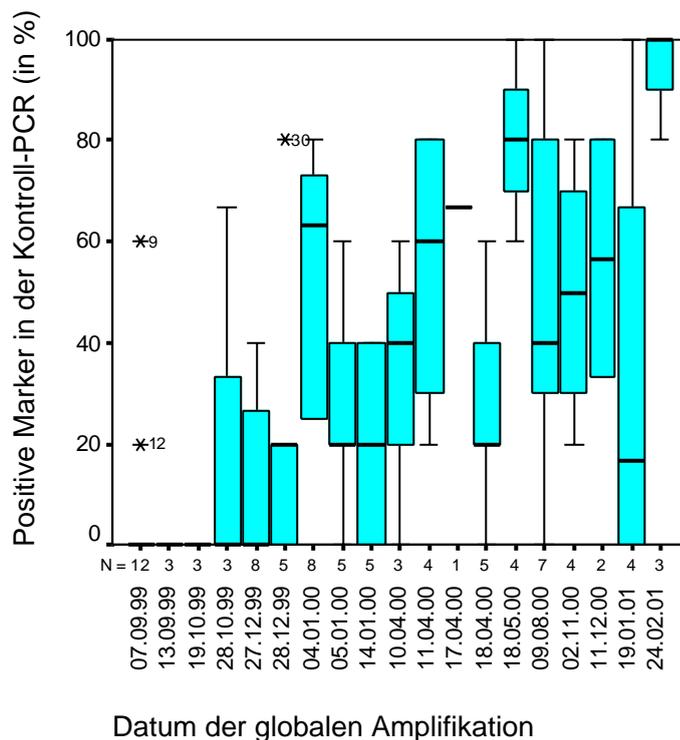


Abbildung 11 Boxplot-Darstellung der Kontroll-PCR-Ergebnisse

100% bedeutet, dass in einer Probe alle fünf Marker (β-Aktin, EGP, EF-1alpha, CK8 und CK18) exprimiert waren.

Vergleicht man die Ergebnisse vor und nach dem 8. Juni 2000, so ergibt sich eine häufigere Expression der Kontrollmarker nach dem Austausch der TdT (Mittelwert 54,3% vs. 40,9%), dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p=0,16$, Zweistichproben T-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen).

3.3 Herstellung der Proteasenarrays

Wörtlich übersetzt bedeutet Array „Anordnung“. Durch die Anordnung verschiedener Sonden auf einer Nylonmembran kann man die Expression vieler Gene in einem einzigen Experiment untersuchen. Da alle kommerziell erhältlichen Verfahren sehr kostenintensiv sind, haben wir einen eigenen für die Untersuchung der Proteasenexpression geeigneten Array entworfen und 60 Exemplare davon hergestellt.

In der Arbeitsgruppe von Dr. C. Klein existierte bereits eine Sammlung krebsrelevanter cDNA, die auf einem Vorgängerarray getestet wurden. Von diesen wurden Proteasen, Zytokeratine, Mage sowie Haushaltsgene übernommen und amplifiziert. Um die Aussagekraft des Arrays zu erhöhen, wurden weitere Sonden kloniert, für die in der Literatur ein Zusammenhang mit Metastasierung beschrieben war.

Darüberhinaus haben wir von unseren Partnern aus dem Institut für Biochemie, Jena (Prof. Wiederanders), aus dem Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried (Dr. Jenne) und aus dem Institut für Pathologie, München (Prof. Nehrlich) freundlicherweise Plasmid-DNA erhalten.

Neu kloniert wurden:

Tabelle 10 Liste der neu klonierten Sonden

Name	Genbank- Access-Nr	Position (nt)	Größe (bp)	Restriktions- enzym	Puffer	Größen der Fragmente (bp)
alpha ₂ -Integrin	X17033	1973-2697	722	HpH I	NEB4	278/444
Bikunin	U78095	466-1051	606	Nco I	NEB4	104/482
c-ets-1	J04101	486-1121	636	Taq I	NEBU	145/491
Chymotrypsin	M24400	279-578	300	Taq I	NEBU	92/208
Granzym H	M36118	228-700	473	Bgl I	NEB3	207/366
Heparanase	AF144325	534-1004	471	BamH I	NEBU	229/429
Kallikrein 2	M25629	237-787	551	Mse I	NEB2	133/538
Kallikrein 5	AF168768	530-939	410	Pst I	NEB3	281/129
Kallikrein 6	D78203	847-1242	396	Mse I	NEB2	157/238
Kallikrein 7	L33404	275-733	459	Mse I	NEB2	71/388
Kallikrein 8	AB008927	477-962	486	Msp I	NEB2	240/246
MT 5-MMP	AF131284	609-1266	658	BamH I	NEBU	229/429
PRSS 12	AJ001531	2169-3096	919	Bgl II	NEB3	335/594
PSTI	M11949	101-415	315	Mse I	NEB2	191/124
TIMP-3	S78453	378-822	445	Hinf I	NEB2	163/282
Tissue Factor	M16553	170-568	399	Msp I	NEB2	167/243

Stellvertretend für die Erzeugung der Sonden-cDNA soll nachfolgend die Klonierung von Kallikrein 2, 5 und 6 dargestellt werden.

3.3.1 Isolierung der Sonden-cDNA aus Zelllinien-cDNA an einem Beispiel

Um aus Zelllinien-cDNA die gewünschte Sequenz zu gewinnen, wurde eine PCR mit spezifischen Primern durchgeführt und der Ansatz auf ein Elektrophoresegel aufgetragen. War eine Bande der richtigen Größe vorhanden, wurde sie ausgeschnitten und in ein pGEMT-easy-Plasmid ligiert.

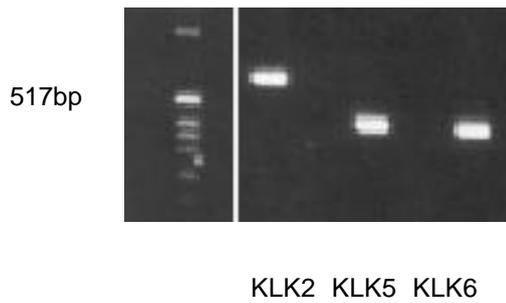


Abbildung 12 Amplifikation mit spezifischen Primern

Mit spezifischen Primern wurde die gesuchte Sequenz aus Zelllinien-cDNA amplifiziert, hier gezeigt für KLK 2, 5 und 6.

3.3.2 Ligation, Klonierung und Auswahl der Klone sowie Plasmidpräparation an einem Beispiel

Nach der Ligation wurde das Plasmid in kompetente Bakterien transfiziert und diese auf einer Agarplatte ausgestrichen. Mit Hilfe einer PCR wurden Klone gesucht, die das richtige Plasmid aufgenommen hatten.

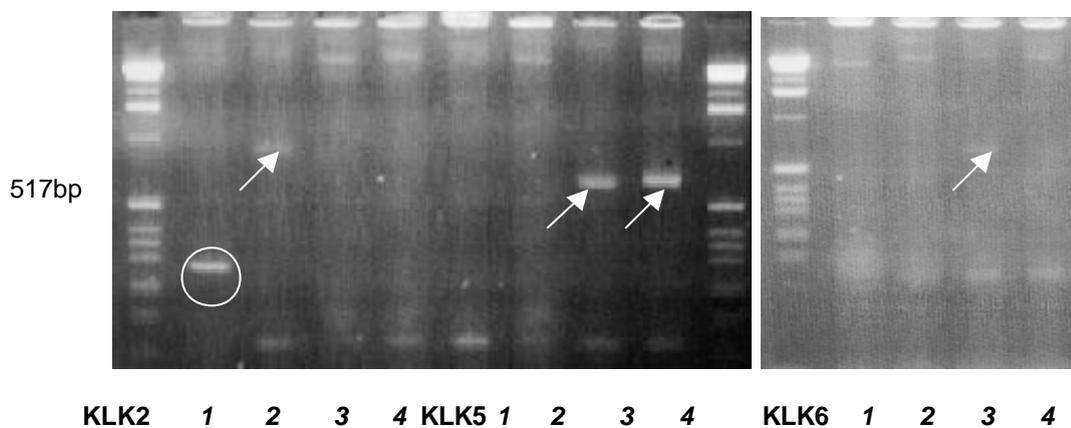


Abbildung 13 Klon-PCR für KLK 2 / KLK 5

Mithilfe einer PCR wurden Klone gesucht, die das richtige Plasmid aufgenommen hatten. Die Primer für die PCR lagen im Plasmid, dadurch wurden 250 bp des Plasmids mitamplifiziert. Erwartet wurde eine Bande, die die Größe des gesuchten Inserts plus 250 bp hatte. Bei Kallikrein 2 war das in Klon 2 der Fall, bei Kallikrein 5 waren die Klone 3 und 4, bei Kallikrein 6 der Klon 3 positiv (Pfeile). Klon 1 von Kallikrein 2 hatte ein leeres Plasmid aufgenommen (Kreis).

Bei der Plasmidpräparation mit der Midi-Kit von Qiagen waren entstanden:

24 µg KLK2	42 µg KLK5	16 µg KLK6
------------	------------	------------

3.3.3 Abschließende Amplifikation an einem Beispiel

Um möglichst reine Sonden zu erhalten, wurde das Plasmid sehr stark verdünnt (0,1 ng/μl) und das Insert in einer PCR amplifiziert. Durch eine Gelelektrophorese konnten Plasmidreste weitgehend abgetrennt werden. Die amplifizierten Sequenzen konnten anschließend aus dem Gel isoliert und aufbewahrt werden.

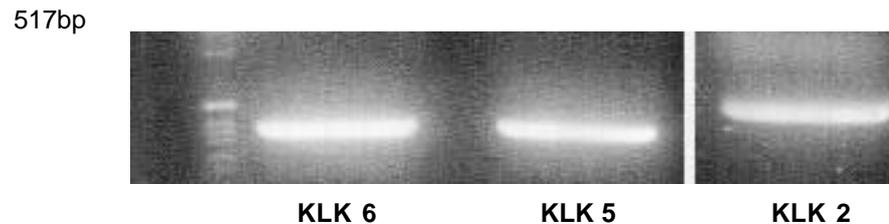


Abbildung 14 Sonden-PCR

Aus hochverdünntem Plasmid war mit einer PCR das Insert amplifiziert und dieses dann auf ein Elektrophoresegel aufgetragen worden. Die Bande konnte ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel extrahiert werden.

3.3.4 Restriktionsverdau der neuen Sonden

Um die Richtigkeit der klonierten Sonde zu bestätigen, wurden die Sonden mit einem Restriktionsenzym in zwei Bruchstücke genau definierter Größe geschnitten. Dies wurde in einer Gelelektrophorese kontrolliert. Eine Tabelle dazu findet sich weiter oben. (Tab. 10)

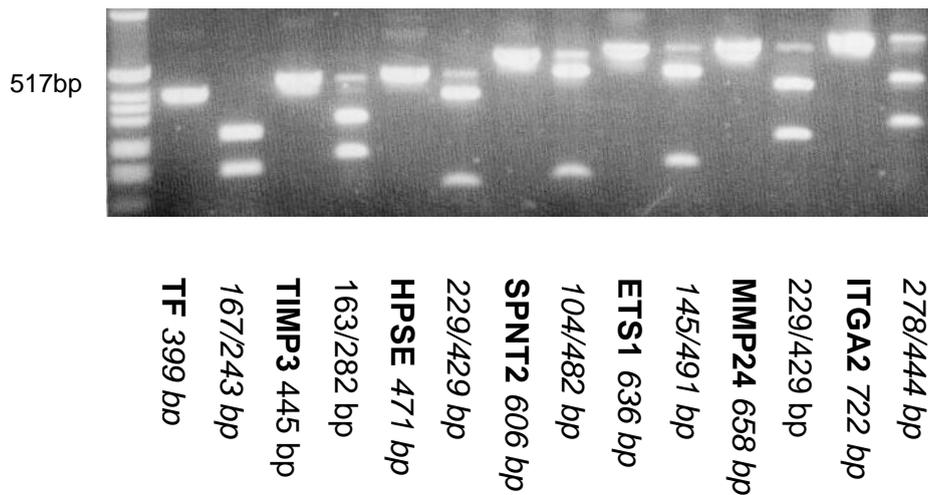


Abbildung 15 Restriktionsverdau von Tissue Factor (TF), TIMP-3, Heparanase (HPSE), Bikunin (SPNT2), c-ets-1 (ETS1), MT5 (MMP24) und alpha2-Integrin (ITGA2)

Die Abbildungen zeigen die Gelelektrophoresen der genannten Restriktionsverdaureaktionen mit Angabe der jeweiligen Restriktionsenzyme und Größe der entstandenen Fragmente sowie der Sonden

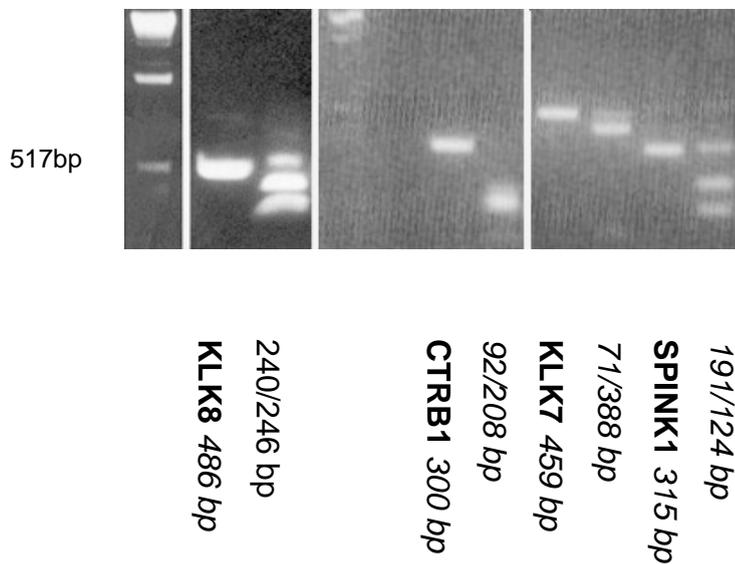


Abbildung 4 Restriktionsverdau von Kallikrein 8 (KLK8), Chymotrypsin (CTRB1), Kallikrein 7 (KLK7) und PSTI (SPINK1)

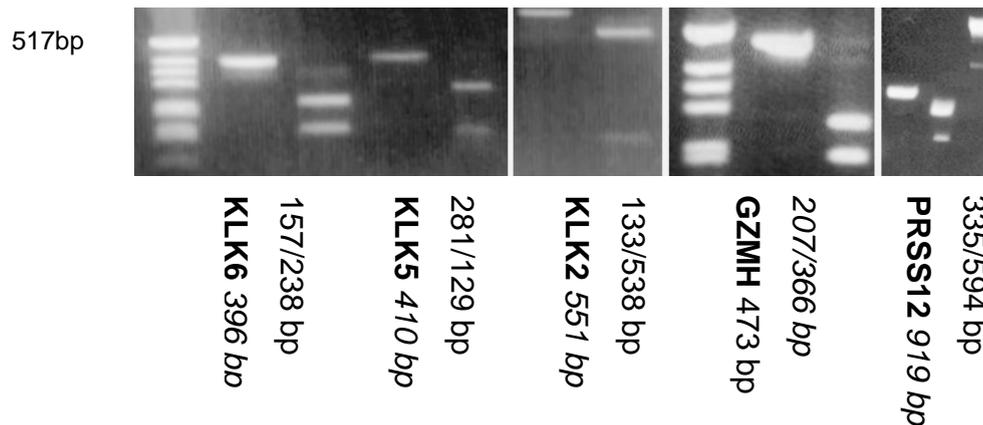


Abbildung 5 Restriktionsverdau von Kallikrein (KLK) 6, 5, 2, Granzym H (GZMH) und PRSS12

3.3.5 Klonierung der nicht kodierenden cDNA-Sonde „x“

Mit „x“ wurde eine Sequenz bezeichnet, die als Komplementfaktor D kloniert wurde und auch im Kontrollverdau nicht auffiel. Als es regelmäßig bei jeder Hybridisierung zu einem starken Signal kam, wurde die Sonde sequenziert. Es stellte sich heraus, dass es sich um ein genomisches, repetitives, nicht kodierendes Fragment handelt.

Unter <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks> fand sich eine 98%ige Homologie zu:

Name: Tigger1

Familie: MER2_type

Klasse: DNA

Lokalisation: 17q23.2

Größe: 1681bp

3.4 Hybridisierungsergebnisse

Die Hybridisierung von nicht-radioaktiv markierten Proben auf selbst zusammen- und hergestellte Custom-Arrays bietet die Möglichkeit, gleichzeitig die Expression von mehreren Proteasen in einer einzelnen Zelle oder in einem Mikroaggregat zu untersuchen.

Gewertet wurden Arrays, bei denen wenigstens Zytokeratin oder Mage und Haushaltsgene exprimiert waren. Anhand des Expressionsniveaus der Haushaltsgene wurden die Signale semiquantitativ mit 0, 1, 2 oder 3 bewertet.

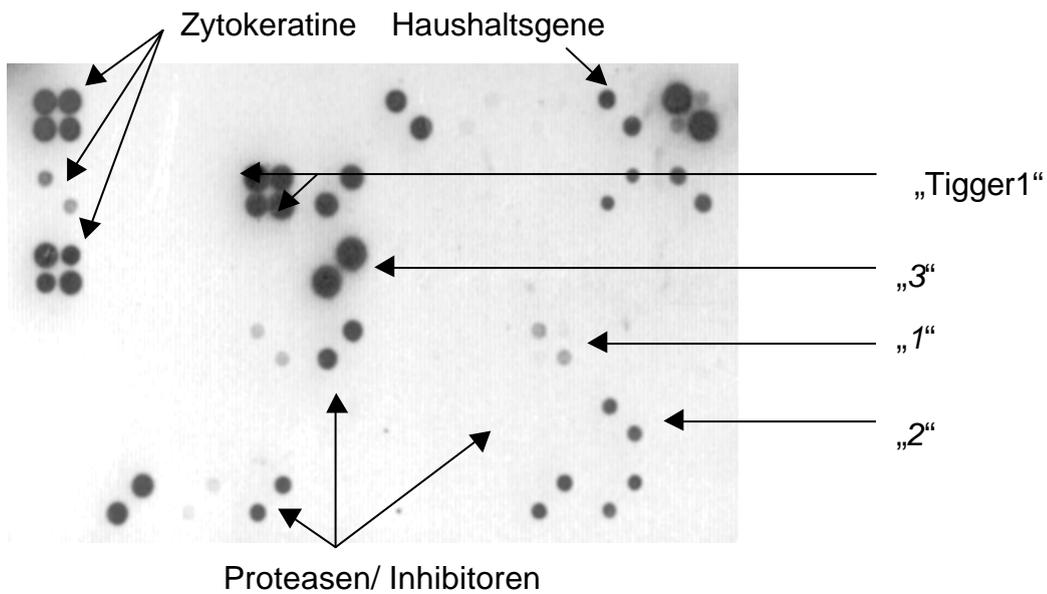


Abbildung 18 Hybridisierungsergebnis einer KM-Zelle (L3)

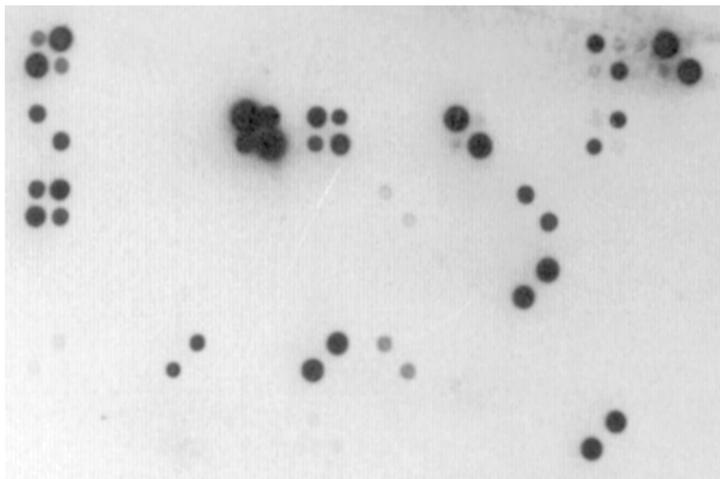


Abbildung 19 Hybridisierungsergebnis einer LK-Zelle (Fi1)

Die Abbildungen 18 und 19 zeigen für jeweils eine Probe aus dem Lymphknoten und Knochenmark, wie die Expression der Transkripte auf einem Röntgenfilm sichtbar wird. Die schwarzen Punkte entstehen dort, wo die Lichtreaktion bei der Hybridisierung den Röntgenfilm schwärzt. Auf der linken Seite des Arrays sind die Haushaltsgene angeordnet, auf der rechten die Zytokeratine. Dazwischen sieht man verschiedene Proteasen und Inhibitoren, die exprimiert werden. Die Signalstärken 1-3 sind exemplarisch in Abb. 18 dargestellt.

3.4.1 Expression der untersuchten Moleküle

Zunächst soll im einzelnen gezeigt werden, welche Proteasen und funktionell verwandte Moleküle exprimiert wurden. Dazu sind in eine Tabelle die Ergebnisse eingetragen und zusätzlich farbig markiert worden, um die Anschaulichkeit zu erhöhen. Anschließend erfolgte die graphische Darstellung der Expression von Proteasen und verwandter Moleküle (Gruppe 1). Analog dazu erfolgte die Darstellung aller übrigen Transkripte (Gruppe 2)

Tab. 11: Übersicht über die Expression von Proteasen und funktionell erwarteten Molekülen in den untersuchten Zellen (Gruppe 1).

Spalte	Lo3 KM	EL1 6er	F12 EZ	F13 Agg	EL4 4er	Ku1 Agg	Ku2 Agg	Ku3 Agg	Ku4	Ku5 Agg	Ku6 Agg	Ku7 EZ	Ku8 3er	Ku9 Agg	Ko4 3er	Bu1 KM	Su5 4er	EL6 3er	EL7 2er	Du1 Agg	M3 EZ	N4 KM	Se1 EZ	Se2 EZ	Se3 EZ	Wa3 3er	
ADAM 8	1			2	3																						
ADAM 9		1																									
ADAM 11		2																									
ADAM 15	3																										
ADAM 21																											
Bikunin	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	1	1			2	2	1	2	3	3	3	2	2	2	2	
Cath B	3	3	3	2	2	2	3	2	3	3						2	1	2	1	1	1		1	1	1	3	
Cath D	3	2	2	2	2	3	3	3	3	3						2	2	3	2	2	2	1	1	1	1	3	
Cath F																											
Cath H	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3						1	3	2	2	2	2	1	1	1	1	2	
Cath K																											
Cath L																											
Cath S	2																										
Cath V	2																										
e-ef-1																											
Chymotrypsin																											
Oxytalia B	1																										
Oxytalia C																											
Ennupin																											
Ennupin II																											
Gal B																											
Heparinase																											
KLK 7																											
KLK 8																											
Matrypsin																											
MT 1-MMP																											
MT 2-MMP																											
MT 3-MMP	3																										
MT 5-MMP	3																										
PAI-1																											
PAI-2																											
PS1																											
PS2																											
TF																											
TIMP-1																											
TIMP-2																											
TIMP-3																											
uPA																											
vPA	1																										
vPAR	1	3																									

In die Spalten sind die Ergebnisse aller hybridisierten Zellen eingetragen. Der Wert 1 entspricht hierbei einem schwachen, 2 einem mittelstarken und 3 einem starken Signal. Aggregate sind mit „Agg“ abgekürzt; wenn die Anzahl x der Zellen bekannt war, aus denen das Aggregat bestand, so ist dies mit z.B. „xer“ bezeichnet worden. Einzelzellen sind mit „EZ“ abgekürzt

Tab. 12: Übersicht über die Expression sonstiger Moleküle in den untersuchten Zellen (Gruppe 2).

Sonde	Lo3 KM	Fl1 6er	F2 EZ	F3 Agg	Fl4 4er	Ku1 Agg	Ku2 Agg	Ku3 Agg	Ku4	Ku5 Agg	Ku6 Agg	Ku7 EZ	Kl1 3er	Ko3 Agg	Ko4 3er	Bul KM	Sa5 4er	Ko3 3er	Lo4 2er	Dul Agg	M3 EZ	N4 KM	Se1 EZ	Se2 EZ	Se3 EZ	Wa 3er
1323	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
β-Aktin	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CK 7	3	1	3	2	2	2	2	2	3	3	3	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
CK 8	3	3	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
CK 10	1	2	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
CK 13	3	2	3	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
CK 18	3	2	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
CK 20	3	2	3	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
Caspase 1																										
Caspase 2																										
Caspase 3																										
Caspase 4																										
Caspase 6																										
Caspase 7																										
Caspase 8																										
Caspase 9																										
Caspase 10																										
CEA																										
EF-1.alpha																										
GAPDH																										
GFP																										
IAP3																										
a 2																										
a 4																										
a 5																										
a 6																										
a v																										
β 1																										
β 2																										
β 3																										
β 4																										
β 5																										
β 7																										
Mage 1																										
Mage 3																										
Mage 4																										
Mage 6																										
Mage 12																										
Mage 1F																										
Mage 2F																										
Mage 3F																										
Mage 4F																										
Mage 12F																										
z59																										
U13a																										
Ubiquitin																										

In die Spalten sind die Ergebnisse aller hybridisierten Zellen eingetragen. Der Wert 1 entspricht hierbei einem schwachen, 2 einem mittelstarken und 3 einem starken Signal. Aggregate sind mit „Agg“ abgekürzt; wenn die Anzahl x der Zellen bekannt war, aus denen das Aggregat bestand, so ist dies mit z.B. „xer“ bezeichnet worden. Einzelzellen sind mit „EZ“ abgekürzt

Fehler! Keine gültige Verknüpfung.Fehler! Keine gültige Verknüpfung.

Abbildung 20 Expressionhäufigkeit von Proteasen und Inhibitoren (Gruppe 1)

Die Stärke der Expression eines Moleküls in einer Probe wurde mit Werten von 1 bis 3 angegeben. Für die linke Darstellung wurden die Zahlenwerte addiert. Der höchste erreichbare Wert wäre hier theoretisch bei 26 Proben und einer maximal erreichbaren Expressionsstärke von $3 \times 26 = 78$. In der rechten Grafik ist angegeben, in welchem Prozentsatz der Proben ein Signal vorhanden war, unabhängig von der Expressionsstärke

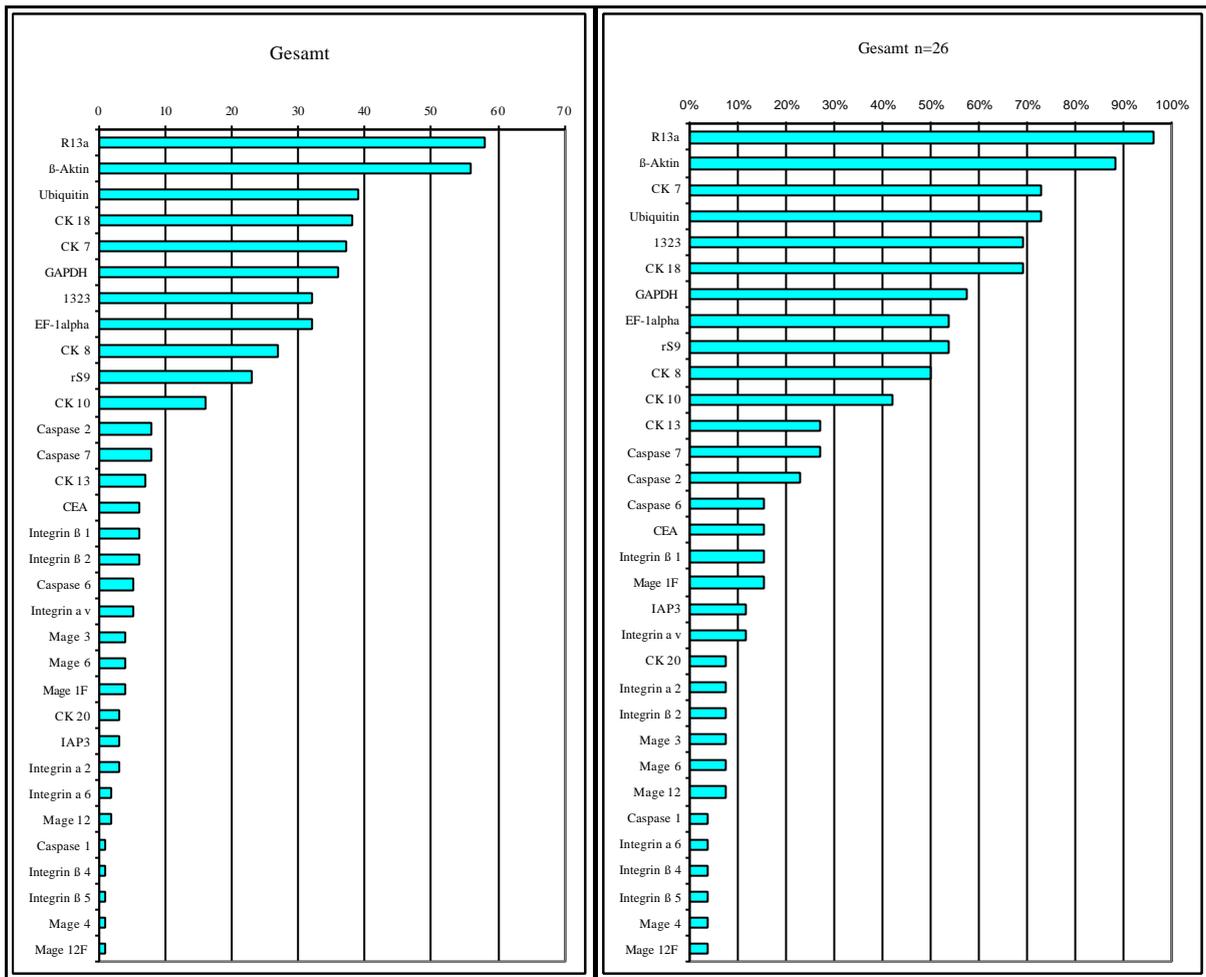


Abbildung 21 Expressionhäufigkeit aller übrigen Transkripte (Gruppe 2)

Wie in der vorhergehenden Abbildung wurde hier die Stärke der Expression eines Moleküls in einer Probe mit Werten von 1 bis 3 angegeben. Für die linke Darstellung wurden die Zahlenwerte addiert. Der höchste erreichbare Wert wäre hier theoretisch bei 26 Proben und einer maximal erreichbaren Expressionsstärke von $3 \cdot 26 \cdot 3 = 78$.

In der rechten Grafik ist angegeben, in welchem Prozentsatz der Proben ein Signal vorhanden war, unabhängig von der Expressionsstärke

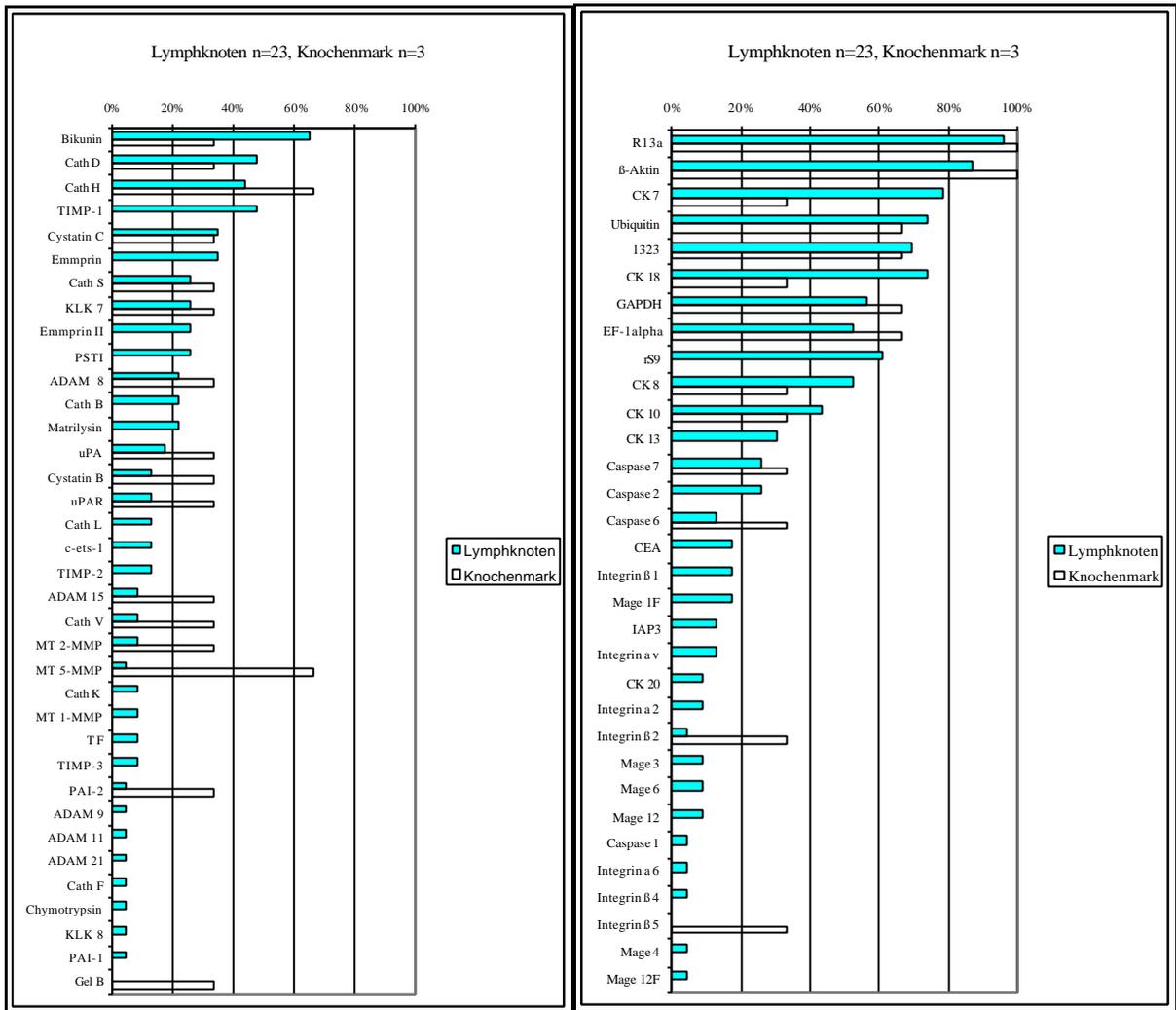


Abbildung 22 Expressionhäufigkeit in Lymphknoten und Knochenmark

Diese Abbildung zeigt, in welchem Prozentsatz der Lymphknoten- im Vergleich zu Knochenmarksproben Proteasen und verwandte Moleküle (Gruppe 1, links) bzw. alle übrigen Transkripte (Gruppe 2, rechts) exprimiert waren.

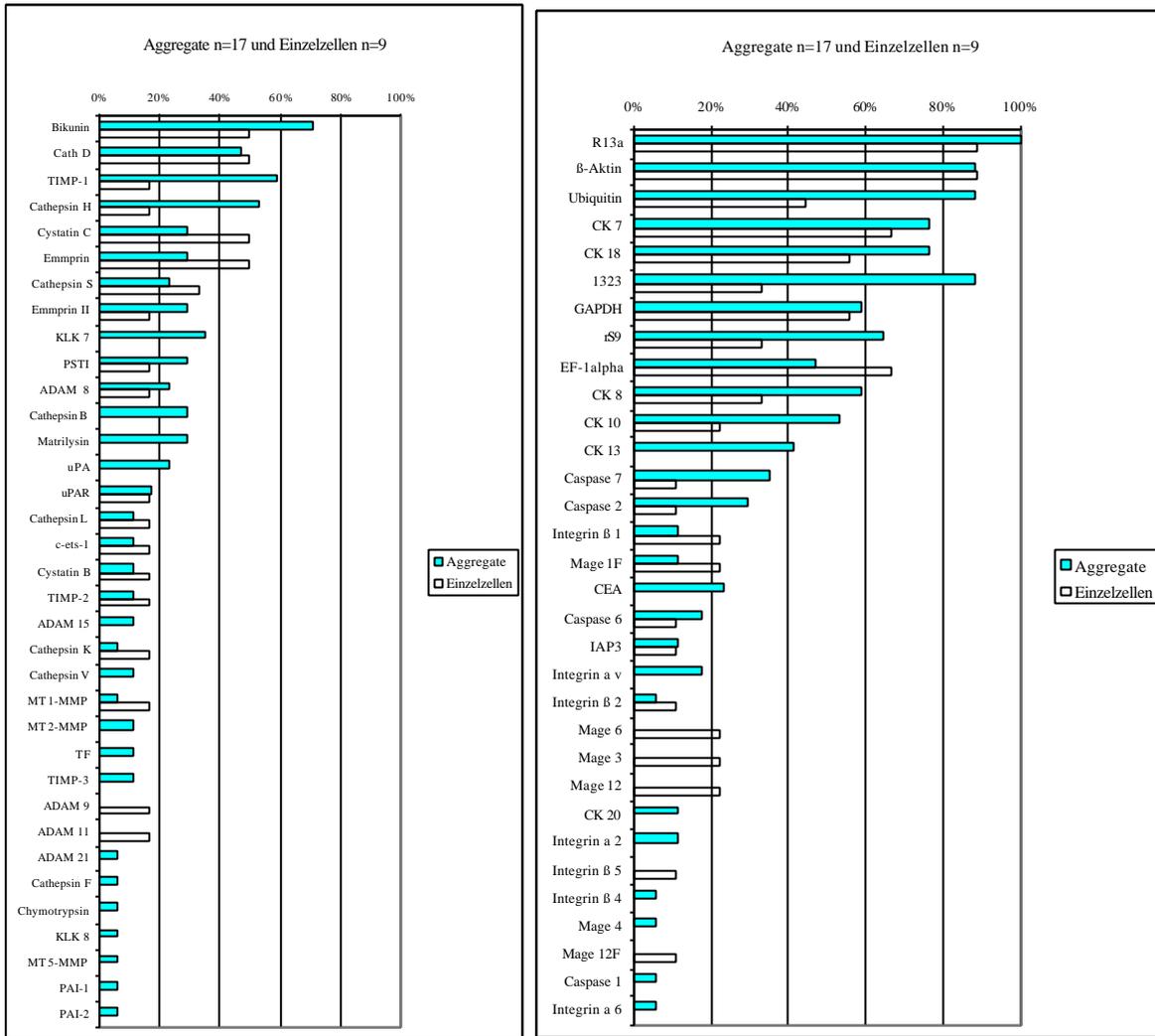


Abbildung 23 Expressionhäufigkeit in Einzelzellen und Mikroaggregaten

Diese Abbildung zeigt, in welchem Prozentsatz der Einzelzellen im Vergleich zu Mikroaggregaten Proteasen und verwandte Moleküle (Gruppe 1, links) bzw. alle übrigen Transkripte (Gruppe 2, rechts) exprimiert waren.

3.4.2 Höhe der Proteasen- und Inhibitorenexpression in Einzelzellen und Aggregaten

Um die Expression der Moleküle aus Gruppe 1 (s.o.) vergleichen zu können, wurden die Summen aller Proteasen und verwandter Moleküle für jede Zelle berechnet, sie wird im folgenden „Expressionsniveau“ genannt. Da es sich bei Aggregaten entweder um Bruchstücke von Mikrometastasen oder um Zellen handelt, die gerade begonnen haben, zu proliferieren, stellt sich die Frage, ob, und wenn ja, wie sie sich bezüglich des Expressionsniveaus von Proteasen und Inhibitoren (Gruppe 1) von Einzelzellen unterscheiden. In Abb. 26 ist dies bereits graphisch dargestellt, nun sollten noch einmal in einer Tabelle Median und Mittelwert in Einzelzellen und Aggregaten verglichen werden.

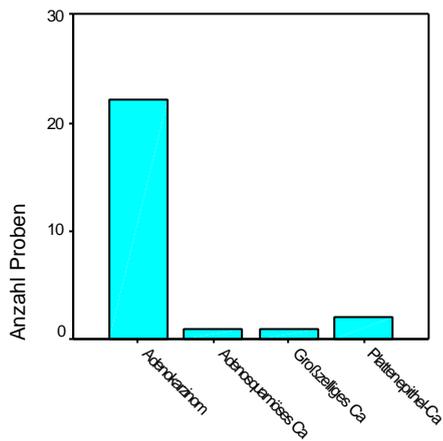
Tabelle 13

	Mittelwert des Expressionsniveaus	Median des Expressionsniveaus
Einzelzellen n=9	8,67	4,00
Aggregate n=17	14,06	16,00

In den Aggregaten findet sich tendenziell eine durchschnittlich höhere Expression von Proteasen und Inhibitoren, der Unterschied ist jedoch mit $p=0,156$ (Zweistichproben-t-Test unter der Annahme gleicher Varianzen) nicht signifikant.

3.4.3 Proteasenexpression in Abhängigkeit von der Tumorhistologie

Da sich schon bei der Detektion mutmaßlicher Tumorzellen eine nicht signifikante Tendenz zugunsten des Adenokarzinoms zeigte, wäre es interessant, die Proteasenexpression in Abhängigkeit von der Histologie zu untersuchen. Leider sind die Fallzahlen bei den Nicht-Adenokarzinomen klein, so dass ein derartiger Vergleich nicht sinnvoll erscheint.



Histologie

Abbildung 24 Histologien der isolierten und amplifizierten Zellen

Diese Abbildung veranschaulicht, dass von 22 Adenokarzinomzellen und von einer Zelle eines Patienten mit einem Adenosquaräres Karzinom Arraydaten gewonnen werden konnten, jedoch nur von einem Großzelligen Karzinom und von zwei Plattenepithelkarzinomen.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression von Proteasen und funktionell verwandten Proteinen in einzelnen disseminierten Tumorzellen aus Knochenmark und Lymphknoten von Patienten mit NSCLC zu charakterisieren.

Während die Proteasenexpression in Primärtumoren und ihre mögliche Bedeutung für die Tumorprogression schon eingehend untersucht wurde (Hanahan und Weinberg 2000), liegen zu einzelnen disseminierten Tumorzellen bisher kaum Daten vor.

Da einzelne disseminierte Tumorzellen nur begrenzt verfügbar sind, ihre Häufigkeit beträgt in Percoll-angereicherten Proben etwa 10^{-6} bis 10^{-5} bei etwa einem Drittel der Patienten (Pantel, Cote et al. 1999), wurde eine Technik gewählt, bei der cDNA aus den isolierten Zellen mit immobilisierten komplementären Sonden auf Arrays hybridisiert wurde. Um eine ausreichende Menge an cDNA für die Hybridisierung zu erhalten, war eine globale Amplifikation des Einzelzelltranskriptoms notwendig, wie sie in (Klein, Seidl et al. 2002) beschrieben wurde.

Auf diese Weise gelang es, die Expression von Proteasen und Inhibitoren im Kontext mit anderen für die Tumorprogression relevanten Transkripten, insgesamt 108 Genprodukten, in 26 Einzelzellen bzw. Mikroaggregaten (23 aus Lymphknoten, 3 aus Knochenmark) zu untersuchen.

4.1 Methodische Gesichtspunkte

4.1.1 Tumorzellisolierung

Durch Immunfluoreszenzfärbung mit dem 3B10-Antikörper, der gegen EpCAM gerichtet ist, konnten aus 16 (19%) von 84 Lymphknotenproben und aus 16 (19%) von 86 Knochenmarkproben einzelne lebende Tumorzellen detektiert und isoliert werden, dies war die Voraussetzung für eine spätere mRNA-Isolation. EpCAM ist beim NSCLC unabhängig vom histologischen Typ, Differenzierungsgrad und anderen klinischen Parametern nur in etwa 80% der disseminierten Tumorzellen exprimiert (Passlick, SieneI et al. 2000). Der besondere Vorteil einer Färbung von EpCAM ist dessen Oberflächenlokalisation, was die Isolation lebender Zellen und damit intakter mRNA ermöglicht (Klein 1998).

Die mit der Lebendfärbung erzielten Detektionsraten wurden mit der immunzytochemischen Färbung permeabilisierter Zellen zum Nachweis disseminierter Tumorzellen verglichen (Pantel, Cote et al. 1999) (Pantel, Izbicki et al. 1996) (Passlick, Izbicki et al. 1994) (Passlick, Kubuschok et al. 1999) (Kubuschok, Passlick et al. 1999). Die Knochenmarkproben wurden auf Haftobjektträgern mit dem A45-Antikörper angefärbt, der gegen die Zytokeratine 8, 18 und 19 gerichtet ist. In den Lymphknoten mußte auf den 3B10-Antikörper zurückgegriffen werden, da hier eine Zytokeratinexpression durch Retikulumzellen vorkommt (Domagala, Bedner et al.) und dadurch falsch positive Ergebnisse entstehen können. Im Knochenmark waren mit dieser Methode 11 (15%) von 75 Proben positiv, in den Lymphknoten waren es 7 (12%) von 58. Der Vergleich beider Färbungen ergab keine signifikanten Unterschiede beim Nachweis disseminierter Tumorzellen.

In einer Untersuchung an 351 japanischen Patienten der klinischen Stadien I-III konnten im Knochenmark bei 112 (31,9%) Patienten mit dem Antikörper CK2, der gegen Zytokeratin 18 gerichtet ist, positive Zellen detektiert werden. Bei 216 der Patienten im klinischen Stadium I wurden zusätzlich hiläre Lymphknoten entnommen, hier fanden sich in 34 Lymphknoten (15,7%) Zytokeratin 18-positive Zellen (Yasumoto, Osaki et al. 2003). Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit ist die Detektionsrate dort im Knochenmark etwas höher, was an der Verwendung eines unterschiedlichen Antikörpers liegen könnte. Die Verteilung der klinischen Stadien innerhalb der Population sollte keine wesentliche Rolle spielen, da in der Untersuchung von (Yasumoto, Osaki et al. 2003) keine Abhängigkeit der Detektionsrate vom klinischen Stadium festgestellt werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei 73 Patienten zugleich in frischen Zellsuspensionen und bei getrockneten Zellpräparaten nach epithelialen Zellen gesucht. Bei 27% wurde in einem der beiden Ansätze positive Zellen gefunden, aber nur in insgesamt 3% aller Proben wurden in beiden Ansätzen positive Zellen detektiert, was etwa einem Zehntel der positiven Proben entspricht. Eine größere Übereinstimmung fand sich bei den Lymphknoten, hier waren innerhalb der 23 Proben, die mit beiden Methoden untersucht wurden, bei 17% in einem Ansatz positive Zellen vorhanden, bei weiteren 13% waren in beiden Ansätzen positive Zellen detektierbar. Mehrere Gründe sind für die Diskrepanzen der Immunfluoreszenz- und immunzytochemischen Färbung denkbar. Zum einen wurden in den Knochenmarkproben in der Lebendfärbung weniger Zellen durchgesehen als

im Lymphknoten ($5 \cdot 10^5$ vs. $1 \cdot 10^6$). Dann wurden verschiedene Antikörper zur Detektion von Tumorzellen in Lymphknoten und Knochenmark eingesetzt. Zur Lebendfärbung in Knochenmark und Lymphknoten wurde immer der EpCAM Antikörper verwendet wie auch zur Immunzytochemie der Lymphknotenproben, während im Knochenmark hierfür ein Zytokeratinantikörper verwendet wurde. Dieser Befund deutet darauf hin, dass EpCAM und Zytokeratin unabhängig voneinander regulierte Marker von Tumorzellen sein können.

4.1.2 Globale Amplifikation des Einzelzelltranskriptoms

Die unabhängige prognostische Relevanz einzelner disseminierter Tumorzellen ist wiederholt belegt worden (Passlick, Kubuschok et al. 1999) (Pantel, Izbicki et al. 1996) (Osaki, Oyama et al. 2002) (Kubuschok, Passlick et al. 1999), jedoch ist über die Biologie dieser Zellen noch wenig bekannt. Eine Möglichkeit, mehr über ihre spezifischen Eigenschaften zu erfahren, ist die Untersuchung ihrer Genexpression. Mithilfe der reversen Transkription der mRNA dieser Zellen in cDNA und deren globaler Amplifikation nach (Klein, Seidl et al. 2002) konnte ihre Genexpression zu dem Zeitpunkt, an dem sie sich aus dem Verband gelöst haben und in fremder Umgebung überleben, konserviert werden. Eine Kontamination durch Stromazelltranskripte konnte durch das Isolationsverfahren ausgeschlossen werden. Die Hybridisierung der so gewonnenen cDNA auf Arrays gelang auf diese Weise bei insgesamt 26/90 Proben, die aus den Geweben von 14 Patienten isoliert wurden. Dem Verlust vieler Proben können mehrere Faktoren zugrunde liegen: an erster Stelle der Abbau der Ribonukleinsäuren durch ubiquitäre Ribonukleasen, dem durch steriles Arbeiten an einem eigens dafür bestimmten Arbeitsplatz bestmöglich entgegengewirkt wurde, aber auch methodische Probleme bei der reversen Transkription/ Amplifikation. Eine signifikante Verbesserung wurde durch den Einsatz einer neuen TdT erreicht. Die höheren Erfolgsraten bei den isolierten Mikroaggregaten im Vergleich zu Einzelzellen (Abb. 23) legt nahe, dass es eine kritische Nachweisgrenze der in der Zelle vorhandenen mRNA gibt. Andererseits ist es möglich, dass zahlreiche Einzelzellen in einem Zustand der so genannten „tumor dormancy“ waren, in dem bekannterweise wenig RNA transkribiert wird

4.1.3 Kontroll-PCR

Als Kriterium für die Durchführung der Arrayhybridisierung galt die Expression der Haushaltsgene β -Aktin und EF-1alpha sowie der epithelialen Marker Zytokeratin und EpCAM, welche in einer PCR vorab getestet wurde. Ein Vergleich der Nachweisrate von β -Aktin, EF-1-alpha sowie Zytokeratin 8 und 18 aus PCR und auf den Arrays der 90 isolierten Zellen ergibt eine exzellente Übereinstimmung der beiden Methoden, bei einer etwas höheren Sensitivität der PCR, siehe Abb. 10, so dass die PCR sich im allgemeinen gut für eine Vorauswahl eignet. Lediglich bei einer Probe fiel die Kontroll-PCR negativ aus, wohingegen bei der Arrayanalyse Hybridisierungssignale nachgewiesen werden konnten.

4.1.4 Vor- und Nachteile der selbst hergestellten Nylonarrays

Die Hybridisierung der Einzelzell-cDNA erfolgte auf Nylonmembranen, auf denen komplementäre cDNA immobilisiert war, sogenannten „cDNA-Arrays“ (Klein, Seidl et al. 2002). Im Vorfeld wurden 50 Arrays wie unter 2.2 beschrieben hergestellt, insgesamt konnten mit den Arrays bis zu 108 verschiedene Transkripte hybridisiert werden. Zu den vom Vorgängerarray übernommenen cDNAs kamen 36 neue hinzu, von denen 31 für Proteine kodierten, die direkt in die Proteolyse involviert sind. Siebzehn neue Sonden wurden aus Tumorzelllinien kloniert, die übrigen 19 wurden von Kooperationspartnern übernommen. Bei den zusätzlich klonierten Sonden handelte es sich zum Teil um Transkripte, für die ein Zusammenhang mit der Tumorprogression vermutet oder schon weitreichend untersucht ist. Allerdings gibt es bisher keine Daten über ihre Expression in einzelnen disseminierten Zellen. Andererseits sollten auch ausgewählte Proteasen untersucht werden, für die eine Assoziation mit Neoplasien denkbar ist, aber noch nicht gezeigt wurde. Eine ausführliche Tabelle hierzu findet sich unter 2.2.3. Mit 68 Sonden konnte ein weites Spektrum an Proteasen und direkt assoziierten Proteinen im Kontext von 40 weiteren Genprodukten auf cDNA-Ebene untersucht werden. Da viele davon auch posttranskriptionell reguliert werden, sollten die Ergebnisse in Zukunft noch auf Proteinebene validiert werden.

4.2 Validierung des epithelialen und neoplastischen Ursprung der isolierten Zellen

Der grundlegende Nachweis, dass es sich bei den hybridisierten Zellen um Tumorzellen handelte, war das Vorhandensein charakteristischer CGH-Veränderungen in allen Proben. Alle Proben wiesen für Tumorzellen typische Veränderungen auf (mündliche Mitteilung Dr. Nicole Wendler, nicht gezeigt). Darüberhinaus konnte das Vorliegen von Tumorzellen durch das Vorhandensein bestimmter Transkripte nahegelegt werden:

4.2.1 Zytokeratine

Zytokeratine gehören zu den Intermediärfilamenten von Epithelien und bilden hier den Hauptbestandteil des Zytoskeletts. Sie werden in saure (Typ I, CK 9-20) und basische (Typ II, CK 1-8) eingeteilt, je ein saures und ein basisches Zytokeratin lagern sich zu Heterodimeren zusammen (Lodish 2001). In dieser Arbeit war in 96% der Proben Zytokeratin nachweisbar. CK 7, welches Pathologen dazu dient, autochthone Adenokarzinome der Lunge von Adenokarzinometastasen zu unterscheiden, war mit 73% das am häufigsten exprimierte Zytokeratin. Interessanterweise fand sich lediglich in 69% der Zellen eine Expression von Zytokeratin 18 und in noch weniger Fällen eine Expression von Zytokeratin 8 und Zytokeratin 19. Da alle Zellen mit dem EpCAM Antikörper isoliert wurden, legt dieser Befund nahe, dass es EpCAM+/Zytokeratin- Tumorzellen gibt. Dies könnte die fehlende Übereinstimmung der Zytokeratinfärbung und der EpCAM Färbung in den Knochenmarkproben der Patienten zumindest teilweise erklären. Zweiundzwanzig der 26 hybridisierten Proben stammten von Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge. In der einzigen Probe (aus Adenokarzinom), bei der kein Zytokeratin hybridisierte, war dafür MAGE nachweisbar.

4.2.2 MAGE (Melanomantigen E)

Die MAGE-Familie schließt mehr als 25 bekannte Gene ein, ihre Mitglieder gehören zu den tumorassoziierten Antigenen (TAA). Ihre fast ausschließliche Expression in Tumoren wird durch Hypomethylierung erklärt (Barker und Salehi 2002). In einer Arbeit von (Kavalarić, Sarcević et al. 2001) wurde eine signifikant höhere Expression in

undifferenzierten duktaalen Mammakarzinomen im Vergleich zu gut differenzierten Tumoren gefunden. MAG-E-Expression fand sich in dieser Arbeit in 23% der Proben.

4.2.3 Karzinoemryonales Antigen (CEA)

Die insgesamt 29 Gene (davon 18 exprimiert) der CEA-Familie gehören zur Immunglobulin-Superfamilie. CEA wird nur von Epithelzellen sezerniert und gelangt so normalerweise nicht in den Blutkreislauf. In Tumoren jedoch ist diese Topographie gestört, so dass es zu erhöhten Serumwerten kommt. Dies erklärt die Eignung zum Tumormarker, besonders für das kolorektale Karzinom (Hammarstrom 1999). In einer immunhistochemischen Untersuchung an 158 Tumoren von (Johansson, Andersson et al. 1992) war CEA in 60% der SCLC und Großzelligen Karzinome, in den meisten Adenokarzinomen und in 84% der Plattenepithelkarzinome positiv, wobei die Expression bei letzterem oft fokal war und mit der Entdifferenzierung abnahm. Möglicherweise reflektiert die Expression von CEA in nur 15% der untersuchten einzelnen disseminierten Tumorzellen ihre Entdifferenzierung.

4.3 Proteasenexpression in den untersuchten Einzelzellen und Mikroaggregaten

Von 37 der 68 auf den Arrays vorhandenen proteolyseassoziierten Sonden konnten Signale in den Proben einzelner disseminierten Tumorzellen nachgewiesen werden. Damit sind Aussagen möglich über Expressionsmuster im Stadium der Minimalen Residualen Erkrankung, welches einer metastatischen Tumorerkrankung vorausgeht und leider bei vielen Patienten eine operative Heilung zunichte macht und auch einer Radiochemotherapie nicht ausreichend zugänglich ist.

4.3.1 UPA/ uPAR

UPA kann die Protease Plasmin und MMP aktivieren und wird durch seinen Rezeptor uPAR an die Zelloberfläche gebunden, vor allem an der invasiven Front eines Tumors. Der uPAR bindet außerdem auch Vitronectin, welches ein Ligand für verschiedene Integrinrezeptoren ist. Die Bindung von uPA an uPAR induziert einen sogenannten „shape change“, eine Änderung des Phänotyps hin zu dem von motilen Zellen. Dies geschieht über die Induktion von intrazellulären Signalwegen und eine

Umstrukturierung des Zytoskeletts (Degryse, Orlando et al. 2001). Im Extremfall kommt es zu einer Umwandlung der epithelialen Zellen zu einem fibroblastenähnlichen Zelltyp, dieser Vorgang wird epithelial-mesenchymale Transition (EMT) genannt und scheint eine wichtige Rolle in der Metastasierung zu spielen (Jechlinger, Grunert et al. 2003). Dabei werden weitere Proteasen vermehrt exprimiert, unter anderem MMP wie MMP-2 und Str 1, sowie der Transkriptionsfaktor c-ets-1 (Hulboy, Matrisian et al. 2001), (Yokoyama, Kamata et al. 2003), (Gilles, Polette et al. 1997).

Die Expression von uPA mit 19 % und uPAR mit 15 % fällt in den untersuchten Proben eher gering aus, für Primärtumoren beim Adenokarzinom der Lunge werden in histologischen Untersuchungen 55 % uPA-positive Tumoren angegeben (Takanami, Takeuchi et al. 2001). Allerdings wird nichts darüber ausgesagt, wie viele Zellen innerhalb des Tumors uPA exprimieren. In Einzelzellen aus Knochenmarksaspiraten von Magenkarzinompatienten wurde die Expression von uPAR untersucht (Allgayer, Heiss et al. 1997), hier waren 47,9 % der Zellen positiv. Die genannten Expressionsdaten beziehen sich auf immunhistochemische und immunzytochemische Untersuchungen, während in der vorliegenden Arbeit die Expression auf mRNA-Ebene charakterisiert wurde. Die vergleichsweise geringe Menge an uPA/ uPAR mRNA in den einzelnen disseminierten Zellen könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Zellen ihre Wanderung durch die EZM abgeschlossen haben und sich in einem inaktiven Ruhezustand befinden. Dass die uPAR-Expression in einzelnen disseminierten Zellen von Magenkarzinompatienten weitaus höher ist als beim NSCLC könnte eine Heterogenität innerhalb verschiedener Karzinome widerspiegeln.

4.3.2 Bikunin

Auffallend war die in 62% der Proben nachweisbare Expression des Proteaseninhibitors Bikunin. Eine unabhängige, ungünstige prognostische Relevanz einer reduzierten Genexpression von Bikunin wurde für das Ovarialkarzinom gezeigt (Tanaka, Kobayashi et al. 2003). Normalerweise wird Bikunin in Mastzellen und im Bindegewebe verschiedener Organe exprimiert. In einer Untersuchung von (Bourguignon, Borghi et al. 1999) wurde in normalem Lungengewebe Bikuninexpression im Bindegewebe und in wenigen Becherzellen gefunden. Im gut

differenzierten Adenokarzinom und Plattenepithelkarzinom hingegen konnte eine starke Bikuninfärbung beobachtet werden. Die Ergebnisse konnten durch RT-PCR bestätigt und damit eine bloße Reabsorption ausgeschlossen werden. Bikunin inhibiert Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, die Leukozytenelastase und uPA. Zusätzlich zur Inhibition der enzymatischen Aktivität von Serinproteasen ist Bikunin in der Lage, die Expression von uPA und uPAR zu reduzieren (Kobayashi, Suzuki et al. 2002). In (Tanaka, Kobayashi et al. 2004) konnte gezeigt werden, dass Zellkulturen, die mit Bikunin behandelt wurden, weniger TGF-beta1 enthielten, welches die Expression von uPA erhöht. Die verminderte Expression von TGF-beta1 scheint durch eine Inhibition eines spannungsunabhängigen Kalziumkanals vermittelt zu sein. Welchen Einfluß eine Reduktion von TGF-beta1 durch Bikunin *in vivo* möglicherweise auf umgebende Immunzellen (z.B. regulatorische T-Zellen) hat, ist unbekannt. Die geringe Anzahl uPA/ uPA-positiver disseminierter Zellen könnte eine Folge einer erhöhten Bikuninexpression in einzelnen disseminierten Tumorzellen sein. Eine Validierung der Ergebnisse auf Proteinebene, zum Beispiel durch Immunzytochemie, könnte hier weitere Klärung bringen.

4.3.3 MMP

In den untersuchten Zellen wurden nur wenige MMP exprimiert. Matrilysin fand sich in 19%, des weiteren waren mRNA der membrangebundenen MMP MT2-MMP (12%), MT5-MMP (12%) und MT1-MMP (8%) nachweisbar.

MMP spielen bei den verschiedenen Schritten der Metastasierung eine wichtige Rolle (Chambers und Matrisian 1997). Zwei Erkenntnisse scheinen von besonderer Bedeutung für das Verständnis ihrer Funktion zu sein: erstens ist die MMP-Aktivierung ein frühes Ereignis, zweitens findet die Expression vor allem in den tumorumgebenden Stromazellen statt, von Matrilysin einmal abgesehen (Egeblad und Werb 2002). Ist die Krebserkrankung durch Befall von Organen wie Lymphknoten und Knochenmark systemisch geworden, sind die kritischen Schritte, die durch die MMP vermittelt werden, zum größten Teil schon abgelaufen. Dies hat eine bedeutende therapeutische Implikation: hoffnungsvolle Therapieansätze mit synthetischen MMP-Inhibitoren, die klinisch bisher noch nicht überzeugen konnten (siehe 1.5), stoßen auf eine primäre Resistenz einzelner disseminierter Tumorzellen, von denen bekannt ist, dass sie schon sehr früh in der Tumorprogression auftreten

(Riethmüller und Klein 2001). Umso bemerkenswerter war die relativ häufige Expression von EMMPRIN, zwischen 23 und 31%. Die verschiedenen Werte für EMMPRIN kamen zustande, da sich zwei Sonden (EMMPRIN I und II) auf dem Array befanden. Bei EMMPRIN handelt es sich um ein an der Zellmembran lokalisiertes Glykoprotein, das in umliegenden Fibroblasten die Produktion von MMP induziert und dadurch die Tumorprogression fördert (Zucker, Hymowitz et al. 2001). Offenbar benutzt die Tumorzelle diesen MMP-Induktionsfaktor nicht, um ihre eigene MMP-Produktion zu erhöhen, da kaum MMP-Expression nachgewiesen werden konnte. Im Knochenmark und Lymphknoten fehlen auch die gewohnten Stromazellen, die sonst diese Aufgabe übernehmen würden. Ein möglicher Nutzen für die Zelle könnte darin liegen, dass EMMPRIN MMP1 an die Zelloberfläche bindet. Auf den ersten Blick überraschend war auch die Expression von TIMP-1 in 42% der Proben, ausschließlich in Lymphknoten. Es kann sich hier kaum um eine gegenregulatorische Antwort auf eine hohe MMP-Expression handeln. Eher wahrscheinlich ist, dass TIMP-1 das Überleben in Lymphknoten begünstigt, möglicherweise nicht durch eine Inhibition von MMP. (Oelmann, Herbst et al. 2002) haben herausgefunden, dass die Inkubation von Zellkulturen mit TIMP-1 eine strahlungsinduzierte Apoptose verhindern kann. Weiterhin wurde eine variable Inhibition zytotoxischer T-Zellen beobachtet. Interessanterweise kann TIMP-1 gerade die in den einzelnen disseminierten Tumorzellen exprimierten membrangebundenen MMP aufgrund ihrer Struktur nur schwer binden (Lang, Braun et al. 2004).

4.3.4 Cathepsine

Cathepsine sind lysosomale Proteasen, die unter physiologischen Bedingungen für den Abbau von intrazellulären Proteinen sorgen und zu den Haushaltsgenen zählen (Turk, Turk et al. 2000). Am häufigsten wurden in den einzelnen disseminierten Zellen Cathepsin D und H gefunden (46%), gefolgt von Cathepsin S (27%), Cathepsin B (19%, nur Lymphknoten) und seltener Cathepsin L V, K oder F (zusammen 23%). Der Nachweis von Cathepsin D entspricht am ehesten der konstitutiven Expression eines Haushaltsgenes, da Cathepsin D in NSCLC nicht aktiver zu sein scheint als im normalen Lungengewebe derselben Patienten (Ledakis, Tester et al. 1996). Auch Cathepsin H ist in Lungentumoren nicht überexprimiert (Schweiger, Staib et al. 2000). Für Cathepsin S ist in malignen

Lungentumoren eine geringere Aktivität beobachtet worden als in Lymphknoten und in gesundem Lungengewebe (Kos, Sekirnik et al. 2001). Cathepsin B ist in Primärtumoren und befallenen Lymphknoten von NSCLC bekanntermaßen vermehrt exprimiert und mit einer schlechten Prognose assoziiert (Werle, Kraft et al. 2000). Diese Protease entfaltet ihre Aktivität nicht nur intrazellulär, sondern soll, besonders in malignen Zellen, auch extrazellulär gebunden oder sezerniert werden (Hulkower, Butler et al. 2000). Eine erhöhte Expression in Verbindung mit einer vermehrten Oberflächenlokalisation und Sekretion wird dafür verantwortlich gemacht, dass Cathepsin B Invasion und Metastasierung fördert (Werle, Lotterle et al. 1999).

4.3.5 Kallikreine

Die 15 bekannten Kallikreine sind sezernierte Serinproteasen, ihr bekanntester Vertreter, Kallikrein 3, ist das prostataspezifische Antigen (PSA). Sie werden in steroidhormonabhängigen Geweben wie in der Prostata, Brustdrüsen, Ovarien und Testes, in geringem Maße auch in anderen Geweben exprimiert (Diamandis and Yousef 2002). Die in dieser Arbeit gefundene Expression von Kallikrein 7 in 27% ist überraschend, da nach (Yousef, Scorilas et al. 2000) Kallikrein 7 fast ausschließlich in der Haut sowie in Nerven-, Nieren- und Brustgewebe (hochreguliert in Mammakarzinomen) nachgewiesen werden kann. Da Kallikreine in vielen Spleißvarianten auftreten und zusätzlich unter dem Einfluß mehrerer Promotoren stehen, wäre es interessant zu wissen, wie homogen Kallikrein 7 in den einzelnen disseminierten Tumorzellen ist. Typisch für die Kallikreine ist unter physiologischen Bedingungen außerdem eine Koexpression mit mehreren anderen Kallikreinen, die verschiedenen Kallikreine wirken dabei in einer Kaskade zusammen (Borgono, Michael et al. 2004). Die mögliche Bedeutung einer singuläre Expression von Kallikrein 7 bedarf demnach weiterer Aufklärung.

4.4 Zusammenfassung

Auch nach kurativer Resektion des Primärtumors entwickeln viele Patienten mit einem Bronchialkarzinom Metastasen. Dies bedeutet, dass die Tumorerkrankung bei diesen Patienten bereits vor dem Operationstermin systemisch geworden ist und somit Tumorzellen im Körper verblieben sind, die nach einiger Zeit neue Kolonien

gründen konnten. Mit den bildgebenden Standardmethoden, die beim Staging zum Einsatz kommen, werden sie nicht erfaßt. Sie lassen sich aber mit Immunfärbungen in Knochenmarkspunktaten und in Lymphknoten nachweisen, und ihre ungünstige prognostische Bedeutung ist mehrfach belegt worden.

In dieser Arbeit konnten mit dem monoklonalen Antikörper 3B10 aus 16 von 86 Knochenmarksaspiraten und aus 16 von 84 Lymphknoten disseminierte Tumorzellen isoliert und durch cDNA-Arrayanalysen Informationen über ihre Genexpression gewonnen werden. Da bekannt ist, dass Proteasen eine wichtige Rolle in der Tumorprogression spielen, wurde in dieser Arbeit die Expression von 108 Transkripten, davon 68 Proteasen bzw. ihren Inhibitoren in einzelnen disseminierten Tumorzellen untersucht. Die Sonden des Arrays wurde teilweise selbst kloniert und durch weitere Transkripte ergänzt, die Auskunft über die histogenetische Abstammung der isolierten Zellen geben können. Durch den Nachweis von Zytokeratin oder MAGE konnte belegt werden, dass es sich bei den hybridisierten Zellen um epitheliale Tumorzellen handelte.

In dieser Arbeit wurden erstmals Proteasenexpressionsprofile von einzelnen disseminierten Tumorzellen entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen selten und in geringem Ausmaß Matrix-Metalloproteasen (MMP) exprimieren, was eine Erklärung für die bereits klinisch beobachtete primäre Resistenz gegenüber Therapieansätzen mit MMP-Inhibitoren sein könnte. Die Therapien zur MMP Inhibition sind bisher nur auf der Grundlage von Daten aus Primärtumoren und Zelllinien entwickelt wurden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass Zielstrukturen für systemische Therapien auch an den Zielzellen validiert werden sollten. Im Gegensatz zu den MMP exprimieren die einzelnen disseminierten Tumorzellen in unerwartet hohem Maße Bikunin, verschiedene Cathepsine und TIMP-1. Die Bedeutung dieser Moleküle bei der frühen Disseminierung, dem ektopen Überleben, dem Auswachsen der Tumorzellen zu manifesten Metastasen und für zukünftige Therapieansätze ist noch weitgehend unbekannt und bietet interessante Fragestellungen für weitergehende Untersuchungen.

5 Literatur

- Aguirre Ghiso, J. A., D. F. Alonso, et al. (1999). "Deregulation of the signaling pathways controlling urokinase production. Its relationship with the invasive phenotype." Eur J Biochem **263**(2): 295-304.
- Aimes, R. T., A. Zijlstra, et al. (2003). "Endothelial cell serine proteases expressed during vascular morphogenesis and angiogenesis." Thromb Haemost **89**(3): 561-72.
- Allgayer, H., M. M. Heiss, et al. (1997). "Urokinase plasminogen activator receptor (uPA-R): one potential characteristic of metastatic phenotypes in minimal residual tumor disease." Cancer Res **57**(7): 1394-9.
- Andreasen, P. A., L. Kjoller, et al. (1997). "The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review." Int J Cancer **72**(1): 1-22.
- Baker, A. H., S. J. George, et al. (1999). "Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3." Br J Cancer **79**(9-10): 1347-55.
- Barker, P. A. and A. Salehi (2002). "The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease." J Neurosci Res **67**(6): 705-12.
- Bolon, I., E. Brambilla, et al. (1996). "Changes in the expression of matrix proteases and of the transcription factor c-Ets-1 during progression of precancerous bronchial lesions." Lab Invest **75**(1): 1-13.
- Bolon, I., V. Gouyer, et al. (1995). "Expression of c-ets-1, collagenase 1, and urokinase-type plasminogen activator genes in lung carcinomas." Am J Pathol **147**(5): 1298-310.
- Borgono, C., I. Michael, et al. (2004). "Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer." Mol Cancer Res **2**(5): 257-80.
- Bourguignon, J., H. Borghi, et al. (1999). "Immunohistochemical distribution of inter-alpha-trypsin inhibitor chains in normal and malignant human lung tissue." J Histochem Cytochem **47**(12): 1625-32.
- Chambers, A. F. and L. M. Matrisian (1997). "Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis." J Natl Cancer Inst **89**(17): 1260-70.
- Coussens, L. M., B. Fingleton, et al. (2002). "Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations." Science **295**(5564): 2387-92.

- DeClerck, Y. A. (2000). "Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer." Eur J Cancer **36**(10): 1258-68.
- Degryse, B., S. Orlando, et al. (2001). "Urokinase/urokinase receptor and vitronectin/alpha(v)beta(3) integrin induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization through different signaling pathways." Oncogene **20**(16): 2032-43.
- Diamandis, E. P. and G. M. Yousef (2002). "Human tissue kallikreins: a family of new cancer biomarkers." Clin Chem **48**(8): 1198-205.
- Domagala, W., E. Bedner, et al. (1992). "Keratin-positive reticulum cells in fine needle aspirates and touch imprints of hyperplastic lymph nodes. A possible pitfall in the immunocytochemical diagnosis of metastatic carcinoma." Acta Cytol **36**(2): 241-5.
- Edwards, K. M., C. M. Kam, et al. (1999). "The human cytotoxic T cell granule serine protease granzyme H has chymotrypsin-like (chymase) activity and is taken up into cytoplasmic vesicles reminiscent of granzyme B-containing endosomes." J Biol Chem **274**(43): 30468-73.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." Nat Rev Cancer **2**(3): 161-74.
- Gilles, C., M. Polette, et al. (1997). "Expression of c-ets-1 mRNA is associated with an invasive, EMT-derived phenotype in breast carcinoma cell lines." Clin Exp Metastasis **15**(5): 519-26.
- Guo, H., R. Li, et al. (2000). "EMMPRIN (CD147), an inducer of matrix metalloproteinase synthesis, also binds interstitial collagenase to the tumor cell surface." Cancer Res **60**(4): 888-91.
- Hammarstrom, S. (1999). "The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues." Semin Cancer Biol **9**(2): 67-81.
- Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-64.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hauck, R. W., Behr, J. (2003). "Diagnostik des Bronchialkarzinomes." Manual Tumoren der Lunge und des Mediastinums(6): 6-27.

- Häußinger, K. E. and M. Kohlhäufel (2000). "Ätiologie und Epidemiologie des Bronchialkarzinoms." Manual Tumoren der Lunge und des Mediastinums(5): 1-4.
- Heiss, M. M., H. Allgayer, et al. (1995). "Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer." Nat Med **1**(10): 1035-9.
- Hulboy, D., L. Matrisian, et al. (2001). "Loss of JunB activity enhances stromelysin 1 expression in a model of the epithelial-to-mesenchymal transition of mouse skin tumors." Mol Cell Biol **21**(16): 5478-87.
- Hulkower, K., C. Butler, et al. (2000). "Fluorescent microplate assay for cancer cell-associated cathepsin B." Eur J Biochem **267**(13): 4165-70.
- Ito, S., H. Nakanishi, et al. (2001). "Real-time observation of micrometastasis formation in the living mouse liver using a green fluorescent protein gene-tagged rat tongue carcinoma cell line." Int J Cancer **93**(2): 212-7.
- Jechlinger, M., S. Grunert, et al. (2003). "Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression." Oncogene **22**(46): 7155-69.
- Jiang, Y., I. D. Goldberg, et al. (2002). "Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer." Oncogene **21**(14): 2245-52.
- Johansson, L., C. Andersson, et al. (1992). "Immunohistochemical study of 158 lung carcinomas." Apmis **100**(10): 914-21.
- Kavalar, R., B. Sarcevic, et al. (2001). "Expression of MAGE tumour-associated antigens is inversely correlated with tumour differentiation in invasive ductal breast cancers: an immunohistochemical study." Virchows Arch **439**(2): 127-31.
- Klein, C. A. (1998). Anreicherung und molekulare Charakterisierung einzelner disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Karzinompatienten. Institut für Immunologie", pp. 103, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Klein, C. A. (2000). "The biology and analysis of single disseminated tumour cells." Trends Cell Biol **10**(11): 489-93.
- Klein, C. A., S. Seidl, et al. (2002). "Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells." Nat Biotechnol **20**(4): 387-92.
- Kobayashi, H., M. Suzuki, et al. (2002). "Suppression of urokinase receptor expression by bikunin is associated with inhibition of upstream targets of

- extracellular signal-regulated kinase-dependent cascade." Eur J Biochem **269**(16): 3945-57.
- Koblinski, J. E., M. Ahram, et al. (2000). "Unraveling the role of proteases in cancer." Clin Chim Acta **291**(2): 113-35.
- Kos, J. and T. T. Lah (1998). "Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review)." Oncol Rep **5**(6): 1349-61.
- Kos, J., A. Sekirnik, et al. (2001). "Cathepsin S in tumours, regional lymph nodes and sera of patients with lung cancer: relation to prognosis." Br J Cancer **85**(8): 1193-200.
- Kubuschok, B., B. Passlick, et al. (1999). "Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **17**(1): 19-24.
- Lang, R., M. Braun, et al. (2004). "Crystal structure of the catalytic domain of MMP-16/MT3-MMP: characterization of MT-MMP specific features." J Mol Biol **336**(1): 213-25.
- Ledakis, P., W. Tester, et al. (1996). "Cathepsins D, B, and L in malignant human lung tissue." Clin Cancer Res **2**(3): 561-8.
- Llano, E., A. M. Pendas, et al. (1999). "Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors." Cancer Res **59**(11): 2570-6.
- Lodish, H. (2001). Molekulare Zellbiologie.
- Mitsuuchi, Y. and J. R. Testa (2002). "Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer." Am J Med Genet **115**(3): 183-8.
- Müller-Höcker, J. (2000). "Pathomorphologie und Molekulargenetik des Lungenkarzinoms." Manual Tumoren der Lunge und des Mediastinums(5): 30-41.
- Oelmann, E., H. Herbst, et al. (2002). "Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 is an autocrine and paracrine survival factor, with additional immune-regulatory functions, expressed by Hodgkin/Reed-Sternberg cells." Blood **99**(1): 258-67.
- Osaki, T., T. Oyama, et al. (2002). "Prognostic impact of micrometastatic tumor cells in the lymph nodes and bone marrow of patients with completely resected stage I non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **20**(13): 2930-6.

- Ott, I., E. G. Fischer, et al. (1998). "A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280." J Cell Biol **140**(5): 1241-53.
- Pantel, K., R. J. Cote, et al. (1999). "Detection and clinical importance of micrometastatic disease." J Natl Cancer Inst **91**(13): 1113-24.
- Pantel, K., J. Izbicki, et al. (1996). "Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases." Lancet **347**(9002): 649-53.
- Parangi, S., M. O'Reilly, et al. (1996). "Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(5): 2002-7.
- Passlick, B., J. R. Izbicki, et al. (1994). "Immunohistochemical assessment of individual tumor cells in lymph nodes of patients with non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **12**(9): 1827-32.
- Passlick, B., B. Kubuschok, et al. (1999). "Isolated tumor cells in bone marrow predict reduced survival in node- negative non-small cell lung cancer." Ann Thorac Surg **68**(6): 2053-8.
- Passlick, B., W. Sieneel, et al. (2000). "The 17-1A antigen is expressed on primary, metastatic and disseminated non-small cell lung carcinoma cells." Int J Cancer **87**(4): 548-52.
- Pepper, M. S. (2001). "Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(7): 1104-17.
- Präuer, H. W., H. Fürst, et al. (2000). "Operative Behandlung des Bronchialkarzinoms." Manual Tumoren der Lunge und des Mediastinums(5): 42-46.
- Primakoff, P. and D. G. Myles (2000). "The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity." Trends Genet **16**(2): 83-7.
- Riethmüller, G. and C. A. Klein (2001). "Early cancer cell dissemination and late metastatic relapse: clinical reflections and biological approaches to the dormancy problem in patients." Semin Cancer Biol **11**(4): 307-11.
- Schweiger, A., A. Staib, et al. (2000). "Cysteine proteinase cathepsin H in tumours and sera of lung cancer patients: relation to prognosis and cigarette smoking." Br J Cancer **82**(4): 782-8.

- Sethi, T., R. C. Rintoul, et al. (1999). "Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo." Nat Med **5**(6): 662-8.
- Stenman, U. H. (2002). "Tumor-associated trypsin inhibitor." Clin Chem **48**(8): 1206-9.
- Sternlicht, M. D., M. J. Bissell, et al. (2000). "The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter." Oncogene **19**(8): 1102-13.
- Takai, N., T. Miyazaki, et al. (2000). "Expression of c-Ets1 is associated with malignant potential in endometrial carcinoma." Cancer **89**(10): 2059-67.
- Takanami, I., K. Takeuchi, et al. (2001). "Expression of ETS-1 is correlated with urokinase-type plasminogen activator and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma." Tumour Biol **22**(4): 205-10.
- Tanaka, Y., H. Kobayashi, et al. (2003). "Reduced bikunin gene expression as a factor of poor prognosis in ovarian carcinoma." Cancer **98**(2): 424-30.
- Tanaka, Y., H. Kobayashi, et al. (2004). "Transforming growth factor-beta1-dependent urokinase up-regulation and promotion of invasion are involved in Src-MAPK-dependent signaling in human ovarian cancer cells." J Biol Chem **279**(10): 8567-76.
- Tomita, N., Y. Izumoto, et al. (1989). "Molecular cloning and nucleotide sequence of human pancreatic prechymotrypsinogen cDNA." Biochem Biophys Res Commun **158**(2): 569-75.
- Turk, B., D. Turk, et al. (2000). "Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers." Biochim Biophys Acta **1477**(1-2): 98-111.
- Vlodavsky, I., Y. Friedmann, et al. (1999). "Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis." Nat Med **5**(7): 793-802.
- Watt, F. M. (2002). "Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation." Embo J **21**(15): 3919-26.
- Werb, Z. (1997). "ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology." Cell **91**(4): 439-42.
- Werle, B., C. Kraft, et al. (2000). "Cathepsin B in infiltrated lymph nodes is of prognostic significance for patients with nonsmall cell lung carcinoma." Cancer **89**(11): 2282-91.

- Werle, B., H. Lotterle, et al. (1999). "Immunochemical analysis of cathepsin B in lung tumours: an independent prognostic factor for squamous cell carcinoma patients." Br J Cancer **81**(3): 510-9.
- Wong, C. W., C. Song, et al. (2002). "Intravascular location of breast cancer cells after spontaneous metastasis to the lung." Am J Pathol **161**(3): 749-53.
- Wu, G. S., P. Saftig, et al. (1998). "Potential role for cathepsin D in p53-dependent tumor suppression and chemosensitivity." Oncogene **16**(17): 2177-83.
- Yan, S., M. Sameni, et al. (1998). "Cathepsin B and human tumor progression." Biol Chem **379**(2): 113-23.
- Yasumoto, K., T. Osaki, et al. (2003). "Prognostic value of cytokeratin-positive cells in the bone marrow and lymph nodes of patients with resected nonsmall cell lung cancer: a multicenter prospective study." Ann Thorac Surg **76**(1): 194-201.
- Yokoyama, K., N. Kamata, et al. (2003). "Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas." Int J Oncol **22**(4): 891-8.
- Yousef, G., A. Scorilas, et al. (2000). "The KLK7 (PRSS6) gene, encoding for the stratum corneum chymotryptic enzyme is a new member of the human kallikrein gene family - genomic characterization, mapping, tissue expression and hormonal regulation." Gene **254**(1-2): 119-28.
- Yousef, G. M. and E. P. Diamandis (2002). "Expanded human tissue kallikrein family - a novel panel of cancer biomarkers." Tumour Biol **23**(3): 185-92.
- Zucker, S., M. Hymowitz, et al. (2001). "Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer." Am J Pathol **158**(6): 1921-8.

Danksagung

Mein erster Dank gilt dem ehemaligen Vorstand des Institutes, Herrn Professor Gert Riethmüller, für die Möglichkeit, die Promotion am Institut für Immunologie durchführen zu können.

Ganz besonders danke ich Herrn PD Dr. Christoph Klein für die Bereitstellung des Themas, die theoretische und methodische Einführung bzw. Begleitung, die mit unerschöpflicher Fachkenntnis und ansteckendem Enthusiasmus erfolgte, sowie für die lehrreichen Korrekturen der Arbeit .

Der praktische Einstieg in die experimentellen Arbeiten wurde ermöglicht durch die geduldige Anleitung Karina Petat-Dutters, ihr gilt mein großer Dank, ebenso Dr. Oleg Schmidt-Kittler, der für jedes Problem eine Lösung wußte.

Lieber Mani Meyer, liebe Elke Burghart, liebe Barbara Lehnert, herzlichen Dank für eure unersetzliche technische Assistenz.

Dr. Nicolas Stöcklein, Norma Grandi und Claudia Hartmann danke ich für die aufmerksame Durchsicht des Schriftstückes und ihre wertvollen Verbesserungsvorschläge.

Allen anderen Mitarbeitern, die nicht persönlich erwähnt sind, sei an dieser Stelle für ihre Hilfe gedankt.

Der guten kollegialen Stimmung in der „AG Klein“ ist es zu verdanken, dass die Stunden im Labor auch eine persönliche Bereicherung waren.

Zu tiefem Dank bin ich meiner Familie verpflichtet, die den materiellen Rahmen schuf und immer wieder den Glauben an das Gelingen in mir stärkte. Auch allen Freunden bin ich von ganzem Herzen dankbar für ihr Zuhören und für ihre Ermunterungen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sabine Schilling
Geburtsdatum: 14. Januar 1977
Geburtsort: Schechen
Eltern: Heinrich und Hedwig Schilling

Ausbildung

1987-96 Karolinen-Gymnasium Rosenheim
1996-97 Freiwilliges Soziales Jahr

1997-2003 Medizinstudium an der LMU München (vorklinische Semester) und TU München (klinische Semester)
Praktisches Jahr:
Innere Medizin: New York University, Rheumatologie und „Medical Subinternship“;
Universidad de Chile, Kardiologie und Gastroenterologie
Neurologie: Baylor College of Medicine, Texas;
TU München, Klinikum Rechts der Isar
Chirurgie: TU München, Klinikum Rechts der Isar

März 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Juli 2003-März 2004 AiP in der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg
Seit April 2004 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Multiple-Sklerose-Forschung der Universität Göttingen