

Identifizierung und Charakterisierung von metastasierungs- assoziierten Genen in Kolon-Modellsystemen

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

vorgelegt von
Robert de Lange
aus Köln

Institut für Anthropologie und Humangenetik der LMU München

2005

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

Eingereicht am: 10. Dezember 2004

Erstgutachter: Prof. Dr. Elisabeth H. Weiß

Zweitgutachter: Prof. Dr. John Parsch

Tag der mündlichen Prüfung: 27. April 2005

in *Gedenken* an Josef Preiherr

* 5. April 1966 † 29. März 2001

Eigene Veröffentlichungen

de Lange R, Burtscher H, Jarsch M and Weidle UH (2001). Identification of metastasis-associated genes by transcriptional profiling of metastatic versus non-metastatic Colon cancer cell lines. *Anticancer Res* 21, 2329-2339.

de Lange R, Dimoudis N and Weidle UH (2003). Identification of genes associated with enhanced metastasis of a large cell lung carcinoma cell line. *Anticancer Res* 23, 187-194.

de Lange R, Weidle UH, Piantelli M and Alberti S. Trop-2 expression marks metastatic cells in human colon cancer. Submitted.

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms	1
1.2	Auftreten und Therapie der kolorektalen Tumormetastasierung	1
1.3	Die Pathogenese der kolorektalen Tumormetastasierung	2
1.3.1	Überblick über die metastatische Kaskade	2
1.3.2	Faktoren der organspezifischen Metastasierung	4
1.3.2.1	Adhäsionsmoleküle und die organspezifische Metastasierung	6
1.3.2.2	Migration und Invasion	8
1.3.2.3	Die organspezifische Modulation der Proliferation von Tumorzellen	9
1.3.2.4	Regulation der Angiogenese durch das Milieu eines befallenen Organs	11
1.4	Methoden zur Analyse differentieller Genexpression	12
1.4.1	Qualitätskriterien und Anwendungsfelder für Oligonukleotid-Mikroarrays	14
1.5	Zielsetzung der Arbeit	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Chemikalien und biochemische Reagenzien	17
2.1.2	Bakterienstämme	19
2.1.3	Kits und Reaktionssysteme	19
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	20
2.1.5	Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen	21
2.1.6	Plasmide	21
2.1.7	Arrays	21
2.1.7.1	Oligonukleotid-Mikroarrays (GeneChip®).....	21
2.1.7.2	RNA- bzw. cDNA-Arrays	22
2.1.7.3	Gewebearrays	22
2.1.8	Geräte.....	22
2.1.9	Gewebe	24
2.1.10	cDNA-Klone für „Northernblot“-Analysen	24
2.1.11	Oligonukleotide.....	25
2.1.12	Antikörper	26
2.1.12.1	Primäre Antikörper	26
2.1.12.2	Sekundäre Antikörper	26
2.1.13	Zelllinien	27
2.1.13.1	Das KM12-Zellsystem	27
2.1.13.2	Das HCT116-Zellsystem	27

2.2	Methoden	28
2.2.1	Zellbiologische Methoden.....	28
2.2.1.1	Rekultivierung von Kryokulturen	28
2.2.1.2	Kultivierung permanenter Zelllinien.....	28
2.2.1.3	Kryokonservierung von Zellen.....	28
2.2.1.4	Einfrieren von sedimentierten Zellen	28
2.2.1.5	Bestimmung der Lebendzellzahl	29
2.2.1.6	Transfektion von KM12C-Zellen.....	29
2.2.1.7	Isolierung stabil transfizierter Zellklone.....	29
2.2.1.8	FACS-Analysen.....	30
2.2.1.9	Immunfluoreszenzmarkierung von Zellen	30
2.2.1.9.1	Fixierung von Zellen auf Deckgläser.....	30
2.2.1.9.2	Immunfärbung von Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CY3	31
2.2.1.10	Adhäsionstest.....	31
2.2.1.10.1	Beschichtung von Lochplatten mit Substraten der extrazellulären Matrix.....	31
2.2.1.10.2	Test auf Zelladhäsion an Substraten der extrazellulären Matrix	32
2.2.1.11	Invasions- und Migrationstest	32
2.2.2	Histologische und immunhistochemische Analysen	33
2.2.2.1	Herstellung von „künstlichen Geweben“ aus kultivierten Einzelzellen.....	33
2.2.2.2	Fixierung der „künstlichen Gewebe“ und Herstellung von Paraffinschnitten	34
2.2.2.3	Doppelfärbung mit Hämatoxylin-Eosin.....	34
2.2.2.4	Immunhistologischer Nachweis von Trop-2	35
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	37
2.2.3.1	Methoden zur RNA-Analyse.....	37
2.2.3.1.1	Arbeiten mit RNA	37
2.2.3.1.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien.....	37
2.2.3.1.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Geweben.....	37
2.2.3.1.4	Isolierung von RNA aus Paraffinschnitten	38
2.2.3.1.5	Isolierung von Poly(A)-mRNA.....	38
2.2.3.1.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
2.2.3.1.7	Entfernung von DNA-Verunreinigungen aus RNA-Isolierungen.....	39
2.2.3.1.8	Analyse von Oligonukleotid-Mikroarrays (GeneChip®).....	40
2.2.3.1.8.1	Herstellung von Biotin-markierter cRNA	40
2.2.3.1.8.1.1	Erststrangsynthese von cDNA	40
2.2.3.1.8.1.2	Synthese des zweiten cDNA-Strangs und Aufreinigung der cDNA.....	40
2.2.3.1.8.1.3	IVT und Fragmentierung der biotinylierten cRNA	40
2.2.3.1.8.2	Hybridisierung und Waschen der Genchips	41
2.2.3.1.8.3	Bestimmung der cRNA-Qualität.....	42
2.2.3.1.8.4	Beschreibung der verwendeten Genchips.....	42
2.2.3.1.8.5	Aufbau der Genchips	43

2.2.3.1.8.6	Scannen der Genchips	43
2.2.3.1.8.7	Algorithmen zur Auswertung der Genchips	43
2.2.3.1.8.7.1	Die absolute Analyse von einzelnen Genchips.....	43
2.2.3.1.8.7.2	Vergleichende Analyse zwischen mehreren Genchip-Experimenten ..	45
2.2.3.1.9	Auftrennung von RNA mittels Agarosegelelektrophorese	46
2.2.3.1.10	„Northernblot“-Analyse.....	47
2.2.3.1.10.1	Transfer von RNA auf eine Nylonmembran („Northernblot“).....	47
2.2.3.1.10.2	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten.....	47
2.2.3.1.10.3	Hybridisierung von „Northernblots“ mit radioaktiv-markierter DNA.....	47
2.2.3.1.10.4	„Strippen“ von „Northernblots“	48
2.2.3.1.11	Hybridisierung von kommerziellen Blots mit radioaktiv-markierter DNA	48
2.2.3.2	Methoden zur DNA-Analyse.....	48
2.2.3.2.1	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	48
2.2.3.2.1.1	Erststrang-cDNA-Synthese am Thermozykler (RT-PCR).....	48
2.2.3.2.1.2	DNA-Amplifikation mit der PCR-Reaktion.....	49
2.2.3.2.1.3	Synthese von flankierenden Schnittstellen an eine DNA-Sequenz.....	49
2.2.3.2.1.4	PCR mit dem LightCycler System.....	50
2.2.3.2.1.4.1	Aufbau und Vorteile des LightCycler Systems.....	50
2.2.3.2.1.4.2	Die verschiedenen Detektionsarten mit dem LightCycler System	50
2.2.3.2.1.4.3	Semiquantitative-Analyse von PCR-Produkten	51
2.2.3.2.1.4.3.1	Versuchsdurchführung	52
2.2.3.2.1.4.3.2	Definition der Standardkurve.....	53
2.2.3.2.1.4.4	Analyse der GAPD-Expression mit dem LightCycler System.....	53
2.2.3.2.2	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	53
2.2.3.2.3	Restriktionsspaltung von DNA	54
2.2.3.2.4	Ligierung von DNA in Vektoren.....	54
2.2.3.2.5	Transformation von <i>E. coli</i>	54
2.2.3.2.6	Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterienkulturen	54
2.2.3.2.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen.....	55
2.2.3.2.8	Isolierung von Endotoxin-freier Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	55
2.2.3.3	Proteinchemische Methoden.....	55
2.2.3.3.1	Gesamtproteinextraktion aus Zellen	55
2.2.3.3.2	Quantifizierung von Proteinen.....	56
2.2.3.3.3	Auftrennung von Proteinen mit SDS-PAGE.....	56
2.2.3.3.4	„Westernblot“-Analyse	56
2.2.3.3.4.1	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen („Westernblot“).....	56
2.2.3.3.4.2	Immundetektion von immobilisierten Proteinen	57
2.2.3.3.4.3	„Strippen“ von Immunblots.....	57

3	Ergebnisse	58
3.1	Genexpressionsanalyse mit dem KM12-Zellmodell.....	58
3.1.1	Deregulierte Gene im KM12-Zellmodell	58
3.1.2	Bestätigung der Genchip-Ergebnisse mit „Northernblot“-Analysen	65
3.1.2.1	Bestätigung von deregulierten Genen	65
3.1.2.2	Bestätigung von deregulierten EST-Sequenzen.....	67
3.2	Expressionsstudien mit ausgewählten EST	70
3.2.1	„Multiple Tissue Expression“-Array	70
3.2.2	„Cancer Gene Screening Total RNA Dot“-Blot.....	73
3.3	Genexpressionsanalyse mit dem HCT116-Zellmodell	75
3.3.1	Deregulierte Gene im HCT116-Zellmodell	75
3.4	Vergleich der Expressionsprofile beider Zellmodelle.....	79
3.4.1	Schnittmengenanalyse der erstellten Expressionsprofile	79
3.4.1.1	Bestätigung der Trop-2- und Vimentinexpression in den Zelllinien	80
3.5	Expressionsanalysen von Trop-2 in kolorektalem Gewebe	82
3.5.1	Genchip-Analysen von Trop-2 und Vimentin	82
3.5.2	Bestätigung der Trop-2-Expression in kolorektalem Gewebe mit RT-PCR	84
3.5.2.1	Etablierung der semiquantitativen RT-PCR-Analyse für Trop-2	84
3.5.2.2	Identifizierung von Calnexin zur Normalisierung der RT-PCR.....	86
3.5.2.3	Expression von Trop-2 in nicht-korrespondierenden kolorektalen Geweben	87
3.5.2.4	Expression von Trop-2 in korrespondierenden kolorektalen Geweben	90
3.6	Proteinexpression von Trop-2 in kolorektalen Zelllinien und Geweben	92
3.6.1	Proteinexpression von Trop-2 in kolorektalen Zelllinien	92
3.6.1.1	„Westernblot“-Analyse.....	92
3.6.1.2	Immunfluoreszenz-Analyse.....	93
3.6.1.3	Immunhistochemische-Analyse mit „künstlichem Gewebe“ aus Einzelzellen	95
3.6.2	Proteinexpression von Trop-2 in kolorektalem Gewebe	96
3.6.2.1	Immunhistochemische-Analyse	96
3.7	Erweiterte Expressionsanalyse von Trop-2 und Trop-1 (Ep-CAM).....	99
3.7.1	Expression von Ep-CAM in kolorektalen Zelllinien und Geweben	99
3.7.2	Expressionsanalyse von Trop-2 und Ep-CAM mit einem MTE-Array	100
3.7.3	Expressionsanalyse von Trop-2 und Ep-CAM mit einem „Cancer Profiling“-Array	102
3.7.4	Proteinexpression von Trop-2 in Lungen- und Schilddrüsengeweben	105

3.8	Etablierung eines zellulären Systems zur funktionellen Analyse von Trop-2	107
3.8.1	Stabile Transfektion von KM12C-Zellen mit Trop-2	107
3.8.1.1	Konstruktion eines Expressionsvektors für Trop-2	107
3.8.1.2	Herstellung und Selektion stabiler Trop-2-Transfektanten	109
3.8.2	Nachweis von Trop-2 in den Transfektanten durch Immunfluoreszenz- und FACS-Analysen.....	111
3.9	Zellbiologische Untersuchungen mit den Trop-2-Transfektanten	113
3.9.1	Untersuchungen zur Motilität der KM12-Zellen und Transfektanten.....	113
3.9.1.1	Invasionstest	113
3.9.1.2	Migrationstest.....	114
3.9.2	Bestimmung der Zelladhäsion an Substrate der extrazellulären Matrix	116
3.10	Identifizierung von Trop-2-regulierten Genen	117
3.10.1	Analyse der Proteinexpression von Cyclin D1 in Trop-2-Transfektanten	117
3.10.2	Analyse der Proteinexpression von β -Catenin in Trop-2-Transfektanten.....	119
4	Diskussion	121
4.1	Die Genchip-Analyse von Zellmodellen	121
4.1.1	Das KM12-Zellmodell	121
4.1.1.1	Im KM12-Zellmodell wurden 182 Gene und EST als dereguliert bestimmt.....	122
4.1.1.2	Die Genchip-Analyse von bekannten Genen lieferte verlässliche und reproduzierbare Daten	124
4.1.1.3	Der Tumorassoziierte Vermittler von Kalziumsignalen - Trop-2	130
4.1.1.4	Die Genchip-Analyse eignete sich zur Identifizierung von differentiell exprimierten EST im KM12-Zellmodell	132
4.1.2	Das HCT116-Zellmodell	134
4.1.2.1	Im HCT116-Zellmodell wurden 72 Gene und EST als dereguliert bestimmt.....	134
4.1.3	Die Schnittmengen-Analyse der KM12- und HCT116-Genexpressionsprofile führte zur Identifizierung von differentiell exprimiertem Trop-2 und Vimentin	134
4.2	Expression von Trop-2 in kolorektalen Krebsgeweben	136
4.2.1	Trop-2-mRNA-Spiegel sind in Lebermetastasen erhöht	136
4.2.2	Trop-2-Proteinspiegel sind in metastasierenden Zelllinien und in Biopsien von Lebermetastasen erhöht	137
4.3	Expression von Trop-2 und Trop-1 in Normal- und Tumorgeweben	138
4.3.1	Die Expression von Trop-2 ist in Lungen- und Schilddrüsenkarzinomen erhöht	139

4.4	<i>In vitro</i>-Analysen zum Einfluß der Trop-2-Expression in Tumorzellen	140
4.4.1	Die Proteinspiegel von Cyclin D1 und β -Catenin sind nach Induktion von Trop-2 in Kolon-Tumorzellen erhöht	140
4.4.2	Trop-2-vermittelte Effekte auf die Migrationsfähigkeit von Kolon-Tumorzellen	142
4.4.3	Die erhöhte Fähigkeit zur Zelladhäsion an Komponenten der EZM in stark metastasierenden Zelllinien ist nicht mit der Trop-2-Expression assoziiert	143
4.5	Fazit und Ausblick.....	143
5	Zusammenfassung.....	146
6	Literaturverzeichnis	148
7	Abkürzungen	165
8	Anhang	167
	Vektorkarte des Expressionsvektors für Trop-2.....	167
	Sequenz der Expressionskassette von Trop-2.....	168

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Spricht man von Darmkrebs, so ist damit fast immer eine Krebserkrankung des Dickdarms (Kolon) oder des Rektums (Mastdarm) gemeint, Krebserkrankungen des Dünndarms sind sehr selten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird nur vom Dickdarm- und Mastdarmkrebs, als kolorektales Karzinom (CRC, „Colorectal Carcinoma“) bezeichnet, die Rede sein. Er gehört in Deutschland und in der gesamten westlichen Welt zu den häufigsten bösartigen Tumoren. In der Statistik der durch Krebs verursachten Todesfälle steht der kolorektale Krebs an zweiter Stelle nach dem Lungenkrebs beim Mann und dem Brustkrebs bei der Frau.

In der Diagnose von CRC, in operativen Techniken und in adjuvanten Therapien wurden in den letzten Jahren deutliche Fortschritte gemacht (Schoen, 2002). Trotzdem haben sich die Überlebensraten von erkrankten Patienten nur geringfügig verbessert. So verstarben allein im Jahr 2000 in den Vereinigten Staaten 56000 Menschen an den Folgen eines CRC, gleichzeitig wurde von circa 130000 diagnostizierten Neuerkrankungen berichtet (Greenlee *et al.*, 2000; Weir *et al.*, 2003). Häufig haben sich bereits vor der Erstdiagnose einer CRC-Erkrankung Fernmetastasen in Leber oder Lunge gebildet (Ries *et al.*, 2000). Dieser Umstand ist äußerst schwerwiegend, da ausgebildete Fernmetastasen gegen derzeitige Therapiemöglichkeiten weitestgehend resistent sind. Somit kann für Patienten mit ausgebildeten Fernmetastasen nur noch eine Wahrscheinlichkeit von weniger als 5% prognostiziert werden, die nächsten fünf Jahre zu überleben. Wohingegen Patienten, bei denen die Läsionen auf die Darmwand beschränkt sind, eine deutlich bessere 5 Jahres-Überlebensrate von 75% aufweisen (Schwartzberg, 2001). Modifikationen der derzeitigen Behandlungsmethoden haben nur wenig Aussicht, signifikant effektiver auf die Entwicklung von Metastasen einwirken zu können. Deshalb ist ein besseres Verständnis der molekularen Ereignisse, die zu einem metastatischen Phänotyp des CRC führen, dringend notwendig. Mit diesen zusätzlichen Kenntnissen könnten neue und innovative therapeutische Ansätze zur Behandlung von kolorektalen Krebsleiden entwickelt werden.

1.2 Auftreten und Therapie der kolorektalen Tumormetastasierung

Das kolorektale Karzinom kann lymphogen oder hämatogen metastasieren. Tumorzellen, die in lymphatische oder hämatogene Kreisläufe eindringen, können allerdings über zahlreiche Verbindungen von einem System in das andere wechseln (Carr, 1983). Während der lymphatischen Invasion werden Tumorzellen passiv in der Lymphe transportiert und

befallen den ersten Lymphknoten, in den sie einfließen, oder sie umgehen die regionalen Lymphknoten und bilden entfernte nodale Metastasen, sogenannte „skip Metastasen“ (Weiss *et al.*, 1986).

Hämatogene Metastasen eines CRC folgen den venösen Abflüssen und lassen sich in Metastasen vom Portae-Typ oder Cava-Typ unterscheiden. In der Leber entstehen Metastasen vom Portae-Typ durch den venösen Abfluss über das Pfortadersystem, während Lungenmetastasen des Cava-Typs durch den venösen Abfluss über die Vv. rectales inferiores zur V. cava gebildet werden können. Neben Fernmetastasen in Leber und Lunge wurden Metastasen eines CRC an Knochen, in den Nebennieren und im Gehirn diagnostiziert (Willett *et al.*, 1984). Den seltenen Fall einer Metastasierung eines Kolon-Adenokarzinoms in die Skelettmuskeln wurde von Hasegawa *et al.* (2000) beschrieben.

Nachdem ein kolorektaler Primärtumor vollständig operativ entfernt wurde, werden die gleichzeitig entnommenen Lymphknoten auf den Befall von Tumorzellen untersucht. Bei einem positiven Befund erfolgt eine adjuvante Therapie zumeist mit dem Zytostatikum 5-Fluorouracil (5-FU) in Kombination mit Folinsäure. Bis zum Jahr 2000 war für diese Krankheitssituation ebenfalls ein monoklonaler Antikörper (17-1A, Ep-CAM) zugelassen. Der Antikörper markiert Krebszellen für die immunologische Abwehr und führt dadurch nach der Operation zur Abtötung von Resttumorzellen. Diese Art der Therapie erwies sich aber im Vergleich zu 5-Fluorouracil als weniger effektiv (Punt *et al.*, 2002).

Werden bei einem Patienten Fernmetastasen des CRC festgestellt, so richten sich die therapeutischen Maßnahmen nach deren Zahl und Sitz. Sind nur eine oder wenige Tochtergeschwülste in Leber oder Lunge vorhanden, so versucht man diese chirurgisch vollständig zu entfernen. Ist dies nicht möglich, erfolgt eine Behandlung mit 5-Fluorouracil in Kombination mit Folinsäure oder Levamisol. Eine Chemotherapie wirkt besonders gut gegen rasch wachsende Tumore und wird in mehreren Zyklen intravenös verabreicht. Neuere Chemotherapeutika wie Capecitabin können oral verabreicht werden und wirken vorwiegend innerhalb von Tumoren (Scheithauer *et al.*, 2003). Capecitabin wird beispielsweise erst im letzten Schritt durch das Enzym Thymidinphosphorylase, dessen Aktivität in Tumoren deutlich höher ist als in normalen Geweben, in 5-Fluorouracil umgewandelt.

1.3 Die Pathogenese der kolorektalen Tumormetastasierung

1.3.1 Überblick über die metastatische Kaskade

Der Ausdruck „Metastasierung“ wurde zuerst vom französischen Chirurgen Joseph de Récamier (1829) benutzt, um das Wachstum von sekundären Tumoren zu beschreiben, die sich nicht in der direkten Nachbarschaft eines Primärtumors befinden. Heute versteht

man unter Metastasierung eine Ausbreitung von Tumorzellen eines Primärtumors durch den Körper, die nachfolgende Besiedlung von sekundären Schauplätzen und das Wachstum an diesen (Liotta, 1992). Die metastatische Verbreitung von kolorektalem Krebs ist ein hochselektiver Prozess, der aus einer Serie von aufeinanderfolgenden und miteinander verknüpften Schritten besteht. Es wird angenommen, dass spezifische Tumorzellen oder klonale Subpopulationen innerhalb eines heterogenen Primärtumors die Vorläufer von entfernt auftretenden Metastasen repräsentieren, deren Überleben im Laufe einer metastatischen Kaskade begünstigt wird (Kerbel, 1990).

Nachdem eine maligne **Transformation** einer Epithelzelle zur Bildung eines primären Karzinoms geführt hat, erfolgt in der Tumormasse eine Neovaskularisierung (**Angiogenese**, Abb. 1.1). Anschließend wandern entweder einzelne Tumorzellen mit erhöhter Motilität oder ganze Zellgruppen des Primärtumors in das umgebende gesunde Stroma ein (**Migration, Invasion**). Ein Tumor des Kolons wird als invasiv definiert, wenn er die Lamina propria mucosae bereits durchquert hat und die Submukosa infiltriert. Sobald invasive Zellen die dünnwandigen Gefäße (oder die lymphatischen Kanäle) durchdringen, können sich einzelne Zellen oder Zellklumpen von der Tumormasse ablösen (**Dissoziation**) und in das Kreislaufsystem gelangen (**Intravasation**). Die Tumorembolien werden vom Blutstrom abtransportiert (**Dissemination**) und müssen in der Lage sein, die Immunverteidigung des erkrankten Individuums sowie die Turbulenzen im Kreislaufsystem zu überleben (Fidler, 2002). Einzelne Tumorzellen oder Embolien setzen sich in dem Kapillarbett eines entfernt liegenden Organs fest (**Arretierung**) und haften sich an das Gefäßendothel (**Adhäsion**). Anschließend wandern sie in das Organparenchym ein (**Extravasation**) und etablieren dort durch **Proliferation** eine Mikrometastase. Damit diese mikroskopisch kleinen Tumorknoten in dem Wirtsorgan größere Knoten ausbilden können, benötigen sie wiederum die Versorgung durch neu zu entwickelnde Gefäße (**Angiogenese**). Ferner müssen sie einen Weg finden, sich permanent den Verteidigungssystemen des neuen Wirts zu entziehen. Wird nur einer dieser beschriebenen Schritte nicht komplett vollzogen, führt dies zur Elimination der Tumorzelle(n). Somit muss die erfolgreich metastasierende Zelle einen äußerst komplexen Phänotyp aufweisen, um eine klinisch relevante Metastase ausbilden zu können. Dieser Phänotyp ist durch kurzzeitige oder permanente Veränderungen von unterschiedlichen Genen auf der DNA- oder mRNA-Ebene gekennzeichnet (Radinsky und Fidler, 1992). Eine wichtige Rolle in der Modulation der Genexpression spielen Interaktionen zwischen den abgelösten Tumorzellen und verschiedenen Faktoren der neubesiedelten Organe. Diese Wechselwirkungen können zu einer organspezifischen Metastasierung führen, einem Phänomen, das im nächsten Kapitel ausführlicher behandelt wird.

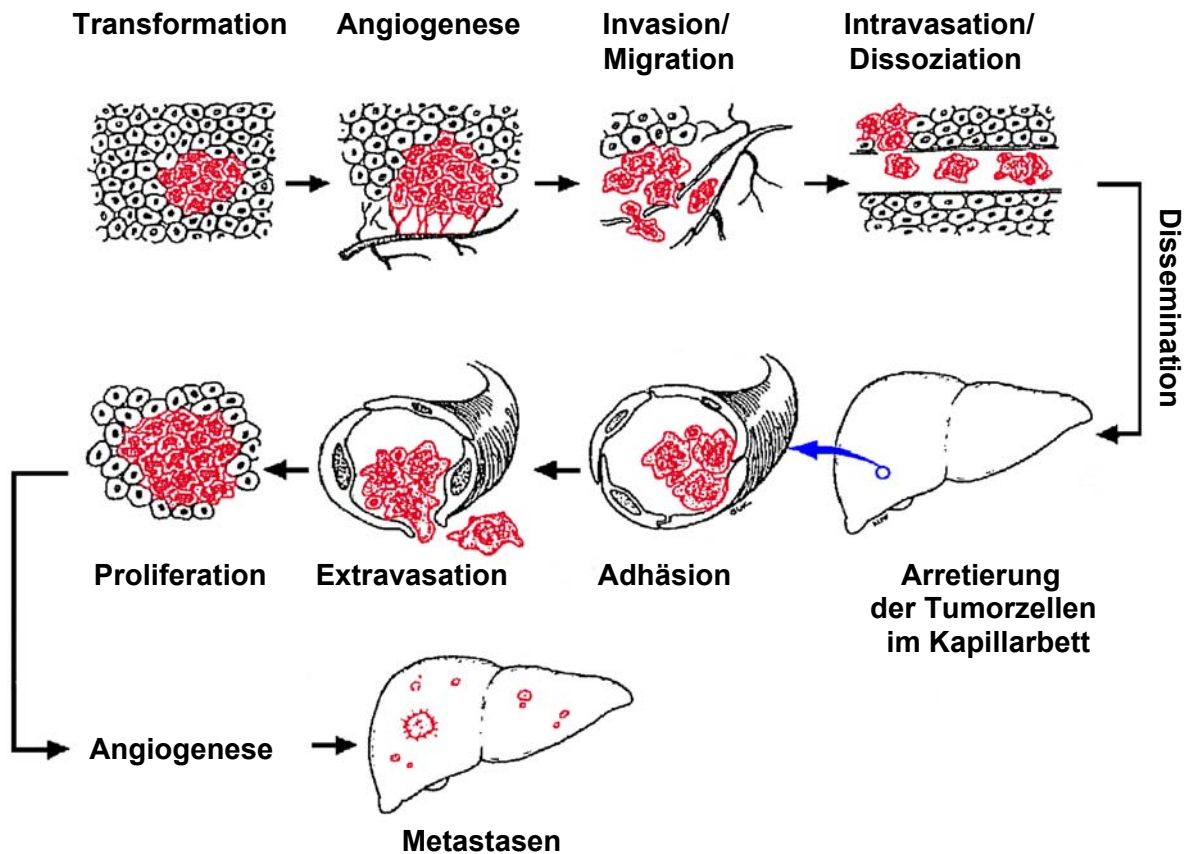


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Einzelschritte, die zur Entwicklung von klinisch relevanten Metastasen führen (Abb. entnommen aus Berman *et al.*, 2001). Zur Verdeutlichung sind Tumorzellen rot dargestellt.

1.3.2 Faktoren der organspezifischen Metastasierung

Die Leber ist, gefolgt von der Lunge, aufgrund von anatomischen und biologischen Determinanten das von Fernmetastasen des Kolons am häufigsten befallene Organ. In 40% aller Autopsien ist nur die Leber von einer Metastasierung betroffen. Eine Metastasierung in andere Organe erfolgt nur sehr selten, ohne dass gleichzeitig Leber oder Lunge besiedelt werden (Weiss *et al.*, 1986). Von der Leber wird die venöse Drainage der intra-abdominalen Eingeweide filtriert, wodurch sie leicht für disseminierende Tumorzellen eines CRC zu erreichen ist. Nur sehr wenige der disseminierenden Tumorzellen führen zur Ausbildung von Metastasen, da die meisten der zirkulierenden Zellen schnell absterben (Fidler, 1973). Ein Versuch mit Maus-B16-Melanomzellen zeigte, dass 24 Stunden nach Eintritt in die Blutzirkulation nur noch weniger als 1% der Zellen am Leben war. Nicht einmal 0,1% dieser überlebenden Tumorzellen konnten letztendlich Metastasen ausbilden (Fidler, 1970). Wahrscheinlich sind einfache mechanische Faktoren wie Blutbublen die Ursache für den schnellen Tod der meisten zirkulierenden Zellen. Zusätzlich werden Verteidigungsmechanismen des Wirts durch Immunzellen oder Nicht-Immunzellen (z.B. Endothelzellen) und die Bildung von Stickoxiden als Gründe für das

rasche Absterben der Tumorzellen diskutiert (Fidler, 1970 und 1973). „Schicksals“-Studien mit radioaktiv-markierten Krebszellen, die in den Kreislauf von isogenen Mäusen injiziert wurden, demonstrierten, dass die Tumorzellen das Gefäßbett vieler Organe erreichen konnten. Dennoch wurden Metastasen nur in wenigen der betroffenen Organe gebildet. Isaiah Fidler (1973) folgerte aus diesen Studien, dass lebende Tumorzellen, die ein Organ erreicht haben, dort nicht zwangsläufig proliferieren und Metastasen ausbilden können.

Eine erfolgreiche Metastasierung hängt also neben den anatomischen Gegebenheiten ebenfalls wesentlich von Interaktionen der sich ausbreitenden Tumorzellen mit einem passenden Milieu ab. Dieses dargebotene Milieu ist für jedes von Tumorzellen befallene Organ spezifisch (Radinsky und Fidler, 1992). Die Suche nach den regulierenden Faktoren der Metastasierung hat ihren Ursprung im Jahr 1889, als Stephen Paget Daten von Frauen analysierte, die an Krebs verstorben waren. Er bemerkte eine Korrelation zwischen der Ausbildung von Knochenmetastasen und der Art des Primärtumors. Paget schloss daraus, dass der Befall von Organen durch metastasierende Tumorzellen kein zufälliges Ereignis ist. Hierauf gründete er seine Hypothese, dass Metastasen sich nur entwickeln können, wenn die „Saat“ (Tumorzellen mit bestimmten metastatischen Fähigkeiten) und der „Boden“ (Organe, die einen Wachstumsvorteil für die „Saat“ besitzen) kompatibel sind (Paget, 1889). James Ewing widersprach rund 40 Jahre später der „Saat und Boden“-Theorie. Er stellte seinerseits die Hypothese auf, dass eine metastatische Verbreitung ausschließlich auf mechanische Faktoren zurückzuführen ist, die durch anatomische Strukturen des Gefäßsystems erklärbar seien (Ewing, 1928). Schließlich führte eine detaillierte Analyse von klinischen Studien, bezüglich der Präferenz von malignen Neoplasmen, ein entfernt liegendes Organ zu besiedeln, zu zwei bis heute akzeptierten Schlussfolgerungen (Sugarbaker, 1981):

- 1) Viele regionale Metastasen können durch anatomische oder mechanische Überlegungen erklärt werden, beispielsweise durch eine lymphatische Entleerung in die regionalen Lymphknoten.

- 2) Die Besiedlung von entfernt liegenden Organen durch metastasierende Zellen zahlreicher Krebsarten folgt einem eigenen organspezifischen Muster.

Zusätzliche experimentelle Unterstützung erhielt die „Saat und Boden“-Hypothese durch Studien, die eine bevorzugte Metastasierung von Melanomzellen in spezifische Organe demonstrierten. Die Zellen wurden intramuskulär in isogene Mäuse implantiert und entwickelten Metastasen in Lungen und Ovargeweben aber niemals in den Nieren (Hart und Fidler, 1980). Zahlreiche weitere Studien bestätigten die Organspezifität der Metastasierung verschiedener Krebsarten, sowohl in experimentellen als auch in klinischen Ansätzen (Tarin *et al.*, 1984; Fidler und Radinsky, 1990; Fidler, 2002).

Auf den Einfluss von organspezifischen Faktoren auf verschiedene Einzelschritte der metastatischen Kaskade soll im nachfolgenden genauer eingegangen werden.

1.3.2.1 Adhäsionsmoleküle und die organspezifische Metastasierung

Basierend auf ihren biochemischen Strukturen können Adhäsionsmoleküle in vier Gruppen eingeteilt werden: Integrine, Cadherine, Selektine und Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie. Die Invasion der Basalmembran (BM) und der extrazellulären Matrix (EZM) wird häufig als ein einzelner Schritt der Metastasierungskaskade angesehen. Genauer betrachtet kann die Invasion aber in zahlreiche Einzelschritte unterteilt werden, in denen die Adhäsionsmoleküle unterschiedliche Rollen spielen.

Tumorzellen zirkulieren im Blutkreislauf oft als Zellklumpen, nachdem sie durch Kohäsion Komplexe mit anderen Tumorzellen gebildet haben. Auffällig ist, dass die miteinander aggregierten Tumorzellen eine deutlich erhöhte Fähigkeit zeigen, in der Blutzirkulation zu überleben (Fidler, 1973; Nicolson, 1988). Der gleiche Effekt wird beobachtet, wenn die Tumorzellen sich an Wirtszellen wie Blutplättchen oder Lymphozyten heften (Fidler und Bucana, 1977; Gasic, 1984). Werden diese Emboli durch das Herz transportiert, gelangen sie in das Kapillarbett der Leber oder Lunge und können dort arretieren. Veränderungen in der Expression von Zelladhäsionsmolekülen (CAM) der Immunglobulin-Familie spielen eine wichtige Rolle im Prozess der Invasion und Metastasierung (Johnson, 1991). Zu dieser Familie gehört das „Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 5“ (CEA, CEACAM5), der zur Diagnostik einer humanen Erkrankung an kolorektalem Krebs am häufigsten verwendete Marker (Jessup und Gallick, 1992). Eine Studie verdeutlichte, dass eine verstärkte Expression von CEA die Fähigkeit von Tumorzellen, an andere Tumorzellen zu adhären, erhöhte (Benchimol *et al.*, 1989). In einer anderen Studie bewirkte die stabile Transfektion von humanen Kolonkarzinomzellen mit der cDNA von CEA eine deutliche Erhöhung des metastatischen Potentials der Zellen (Hashino *et al.*, 1994).

Verfangen sich Emboli aus Tumorzellen im Lumen kleinerer Gefäße der Leberzirkulation, so reicht dies allein für die Ausbildung einer Metastase noch nicht aus. Erst die Expression von spezifischen Adhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche ermöglicht eine Anheftung von Tumorzellen an die Gefäßwand von befallenen Organen mittels einer Rezeptor-Ligand-Interaktion. Als nächster Schritt kann dann eine Degradation der Gefäßwand eingeleitet werden. Tumorzellen, die ein bestimmtes Muster an Adhäsionsmolekülen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, besitzen eine Präferenz für die Metastasierung in einem spezifischen Organ. Unter Verwendung der *in vivo*-Videomikroskopie konnte beispielsweise gezeigt werden, dass für eine Extravasation von Krebszellen in das Leberparenchym der Maus eine Integringesteuerte Adhäsion notwendig ist (Morris *et al.*, 1997).

Adhäsionsmoleküle der Integrinfamilie agieren als Zelloberflächenrezeptoren, die spezifisch an die Laminin-, Fibronektin- und Kollagenkomponenten der EZM binden (Koretz *et al.*, 1991; Ruoslahti, 1991). An der Oberfläche von humanen Kolonkarzinomzellen werden viele unterschiedliche Integrine exprimiert (Koretz *et al.*, 1991). Metastasierende Krebszellen werden auf ihrem Weg sich ständig verändernden Gewebeumgebungen ausgesetzt, die jeweils neue Matrixkomponenten präsentieren. Folglich benötigt eine erfolgreiche Kolonialisierung eines neuen Organs die Anpassung der mehr als 22 möglichen α - oder β -Integrin-Untereinheiten mit unterschiedlichen Substratpräferenzen an die umgebende Matrix. Tatsächlich konnte in Krebszellen ein Wechsel in der Integrinexpression beobachtet werden. Integrine, die bevorzugt an die EZM von normalen Epithelien binden, wurden durch Integrine ersetzt, die vorzugsweise an die degradierten, stromalen Komponenten eines befallenen Organs binden, und somit eine nachfolgende Invasion ermöglichen (Lukashev und Werb, 1998). Die experimentell erzwungene Expression von verschiedenen Integrinuntereinheiten in kultivierten Zellen konnte das invasive Verhalten der Zellen erhöhen oder verhindern (Varner und Cheresch, 1996). Nachdem die Tumorzellen sich an die EZM und BM angeheftet und degradierende Substanzen produziert haben, müssen sie sich wieder ablösen können, um in das darunterliegende Stroma zu migrieren. Pignatelli *et al.* (1990) zeigten, dass ein gradueller Abfall der Integrinexpression mit der Tumorprogression assoziiert ist. Dies könnte darauf deuten, dass aggressivere Krebsarten in dieser Phase bestimmte Integrine nicht mehr exprimieren und somit die Ablösung von der EZM und BM erleichtert wird.

Ein Beispiel für die komplexen Interaktionen stellt der E-Cadherin/ α -Catenin-Zell-Zell-Adhäsionskomplex dar, dessen erniedrigte Expression die Ablösung von Tumorzellen aus primären Läsionen beschleunigt. Dieser Vorgang ist assoziiert mit einem höheren metastatischen Potential, einer erniedrigten Differenzierung und einer schlechteren Prognose für Kolonkarzinome (Raftopoulos *et al.*, 1998). E-Cadherin ist ein homotypisches Zell-Zell-Interaktionsmolekül, das ubiquitär von epithelialen Zellen exprimiert wird. Die Verknüpfung von Zellen über E-Cadherin Brücken resultiert in der Ausschüttung von negativen Proliferationssignalen durch zytoplasmatischen Kontakt mit β -Catenin (Christofori und Semb, 1999). E-Cadherin agiert somit als ein Antagonist des invasiven und metastasierenden Potentials von epithelialen Krebsformen. Allerdings sind dessen Funktionen durch unterschiedliche Mechanismen in der Mehrzahl von epithelialen Krebsarten verlorengegangen.

Ein weiteres Adhäsionsmolekül, für das eine Rolle in der Lebermetastasierung beschrieben wurde, ist der Zelloberflächenrezeptor CD44 (Tanabe *et al.*, 1993). CD44 kann an CEA, Komponenten der EZM (Hyaluronsäure) und an Osteopontin binden (Faassen *et al.*, 1992; Jalkanen und Jalkanen, 1992; Weber *et al.*, 1996). Die Bindung von Osteopontin an

CD44 induziert eine zelluläre Chemotaxis aber keine homotypische Aggregation, wie sie durch eine Interaktion von CD44 mit Hyaluronsäure bewirkt wird. Diese unterschiedlichen Reaktionen auf eine Bindung an CD44 werden möglicherweise von Tumorzellen ausgenutzt, denn im Prozess der Metastasierung könnte eine Bindung von Osteopontin an CD44 die Migration durch die EZM regulieren. Anschließend erhalten Tumorzellen in neu besiedelten Geweben einen Wachstumsvorteil durch Bindung von CD44 an Hyaluronsäure (Weber *et al.*, 1996). Der mRNA-Spiegel von CD44 war in humanen CRC-Zellen im Vergleich zur angrenzenden normalen Mukosa deutlich erhöht (Stamenkovic *et al.*, 1991). Zusätzlich wurde ein abnormales Aktivitätsmuster von CD44 in malignen Kolonkarzinomen beschrieben, aber nicht in normalen Geweben (Matsumura und Tarin, 1992; Choi *et al.*, 2000).

1.3.2.2 Migration und Invasion

Die Migration stellt einen zentralen Prozess der Metastasierung dar, der eine lokale Invasion, Intravasation und Extravasation der Tumorzellen durch aktive Beweglichkeit der Zellen ermöglicht. Hierbei vollziehen migrierende Zellen eine durch parakrine und autokrine Faktoren stimulierte pseudopodiale Vorwärtsbewegung (Price *et al.*, 1997). Der erste Schritt im Prozess der Migration führt durch eine Auswölbung (Protrusion) der Plasmamembran zur Bildung von Lamellipodien oder Filopodien. Nachdem sich die Membranauswölbungen an ein Substrat angeheftet haben, kann der Zellkörper durch kontraktile Kräfte, die durch Interaktionen von Myosin mit Aktinfilamenten entstehen, wandern. Gleichzeitig muss sich die Zelle am „Zellende“ durch Zerreißen der Zell-Substrat-Verbindungen ablösen (Lauffenburger und Horwitz, 1996). Gutman und Fidler zeigten 1995, dass eine erhöhte Zellmotilität das Invasionsvermögen von Tumorzellen erhöht. Eine durch einen Wachstumsfaktor induzierte chemotaktische Anziehung hat eine gerichtete Wanderung zur Folge und führt beispielsweise zu einer gerichteten Migration von Leukozyten an den Ort einer Entzündung. Bisher wurden als Mitglieder der Superfamilie der „Chemokine“ bereits über 40 humane Zytokine identifiziert, wie beispielsweise „Interleukin 1, alpha“ (IL1A) und „Tumor Necrosis Factor“ (TNF, Taub, 2000).

Die Degradierung der BM und der EZM ist ein weiterer wesentlicher Mechanismus für die Invasion von Tumorzellen in das Parenchym von Organen. Die EZM und BM stellen eine Barriere zwischen den epithelialen Zellen und dem Stroma dar und bestehen aus einer Mischung von Komponenten des Bindegewebes (Nakajima *et al.*, 1988). Ihre komplexen Mixturen enthalten Kollagen, Laminin, Proteoglykan und andere Moleküle, die von epithelialen und stromalen Zellen produziert werden (Liotta, 1986). Kollagen bildet die strukturelle Unterstützung für die BM, wohingegen Laminin eine Rolle in der zellulären Adhäsion

spielt (Liotta, 1986). Metastasierende Tumorzellen produzieren verschiedene Proteasen und Glykosidasen, die Komponenten der EZM und BM degradieren können. Die Produktion dieser Enzyme wie Typ IV Kollagenase und Heparinase in humanen Kolonkrebszellen korreliert mit den invasiven Fähigkeiten der Zellen. Typ IV kollagenolytische Metalloproteinasen zersetzen die Membran durch Degradierung von Laminin und Kollagen Typ IV (Liotta, 1986; Boyd *et al.*, 1989). Verschiedene Isoformen an Typ IV kollagenolytischen Proteasen mit Molekularmassen von 98, 92, 80, 68 und 64 kD wurden in stark metastasierenden Zellen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu sezernieren wenig metastasierende Zellen lediglich eine Isoform (92 kD) in geringen Mengen (Morikawa *et al.*, 1988b).

Die Kollagenase vom Typ IV kann durch Plasmin aktiviert werden, eine Serinprotease, die aus Plasminogen abgespalten wird. Die Abspaltung von Plasmin erfolgt nach Bindung des Plasminogenaktivators vom Urokinasety (uPA) an den uPA-Rezeptor. Als weitere Komponenten des komplexen uPA-Systems kontrollieren die Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 die Aktivität von uPA (Weidle *et al.*, 1994). Zusätzlich induziert Plasmin die Degradierung von Laminin in der Basalmembran und erleichtert somit die Invasionsfähigkeit von uPA sezernierenden humanen Krebszellen des Kolons.

Ein anderer Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix sind die Proteoglykane, wie Chondroitinsulfat, Heparansulfat, Hyaluronat und Heparin. Obwohl ihre genaue Funktion noch nicht geklärt ist, wird unter anderem vermutet, dass die Moleküle ein Reservoir für Wachstumsfaktoren wie beispielsweise „Transforming Growth Factor, beta 1“ (TGFB1) darstellen könnten. Wird die EZM durch Enzyme degradiert, kann TGFB1 in einer aktiven Form freigesetzt werden (Chakrabarty *et al.*, 1990). Deshalb könnten die Proteoglykane indirekt eine wichtige Rolle in der Wachstumsregulierung und Differenzierung von Tumorzellen spielen.

1.3.2.3 Die organspezifische Modulation der Proliferation von Tumorzellen

Die Proliferation von metastasierenden Zellen wird in den Wirtsgeweben von autokrinen, parakrinen oder endokrinen Signalen beeinflusst und ist von der Balance zwischen stimulierenden und hemmenden Signalen abhängig (Fidler, 1990). Eine Verstärkung der Proliferation kann in den metastatisch befallenen Organen durch sekundär aktivierte Onkogene oder durch parakrine Stimuli (Wachstumsfaktoren) ausgelöst werden. Schon 1914 beobachteten Jones und Rous ein verstärktes Wachstum von Krebszellen in einem verletzten Gewebe. Verwundete Stellen wurden seitdem in verschiedenen Geweben und Spezies als bevorzugte Orte für die Proliferation von malignen Zellen beschrieben (Radinsky, 1993). Wird die Leber verletzt oder teilweise entfernt, treten Folge-

erscheinungen wie schnelle Zellteilungen (Hyperplasia) oder quantitative Veränderungen der Genexpression auf (Michalopoulos, 1990). Eine Leberresektion mit anschließender Regeneration führte zu einer Wachstumsstimulierung von humanen Kolonkarzinomzellen, die subkutan in Nacktmäuse implantiert wurden (Fidler, 1990). Eine parallel dazu durchgeführte Nephrektomie oder Kontrolloperation bewirkte dahingegen keine Stimulierung der Proliferation. Diese Ergebnisse erhärteten die Hypothese, dass die Transkription während der Leberregeneration durch lösliche Faktoren im peripheren Blut stimuliert wird. Insbesondere die Leber bietet Tumorzellen eine reiche Quelle an Wachstumsfaktoren und nährstoffreichem Blut. Dieses besonders vorteilhafte Milieu könnte einer der Gründe sein, weshalb wandernde Krebszellen vergleichsweise häufig in der Leber Zweitumore bilden können. Eine Beschädigung des normalen Lebergewebes, möglicherweise verursacht durch abgelöste Zellklumpen eines CRC, stimuliert die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, um die Reparatur des Gewebes zu ermöglichen. Diese mitogenen Faktoren könnten gleichzeitig die Proliferation von empfänglichen, malignen Tumorzellen, die kompatible Rezeptoren exprimieren, stimulieren und somit zur Ausbildung einer Fernmetastase in dem Organ führen. Eine moderne Interpretation von Pagets „Saat und Boden“-Hypothese sollte diese Punkte berücksichtigen (Radinsky *et al.*, 1995).

In unterschiedlichen Geweben werden verschiedene Wachstumsfaktoren exprimiert. Beispielsweise wird der „Insulin-like Growth Factor-I“ (IGF-I) vorwiegend in der Leber synthetisiert und fördert dort das Zellwachstum durch die Kontrolle des Zellzyklus durch den G1-Schritt (Stiles *et al.*, 1979; Zarrilli *et al.*, 1994). Von der Leber sezerniertes IGF-I stimuliert die Proliferation von metastasierenden Karzinomzellen, ein Effekt, der mit der Oberflächendichte des IGF-I-Rezeptors (IGF-IR) in den Tumorzellen korreliert (Guo *et al.*, 1992; Long *et al.*, 1994).

Der „Transforming Growth Factor, alpha“ (TGFA) agiert in den Hepatozyten durch einen autokrinen Mechanismus als physiologischer Regulator der Leberregeneration (Michalopoulos, 1990). TGFA stimuliert ebenfalls die Proliferation von normalen Epithelzellen des Kolons und übt seine Effekte durch eine spezifische Bindung an den „Epithelial Growth Factor-Receptor“ (EGF-R) aus (Markowitz *et al.*, 1990). Mittels der Ligand-Rezeptor-Interaktion wird eine Serie von schnellen Antworten induziert. Dies sind unter anderem die Phosphorylierung von Tyrosinresten des EGF-Rezeptors, die Hydrolyse von Phosphatidylinositol und die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (van der Geer *et al.*, 1994). In dem Kontext wurde eine erhöhte EGF-Rezeptordichte in menschlichen Kolonkarzinomen identifiziert (Radinsky *et al.*, 1993).

1.3.2.4 Regulation der Angiogenese durch das Milieu eines befallenen Organs

Damit Zellen proliferieren und auch mit zunehmender Tumormasse überleben können, müssen sie stets ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt sein. Zusätzlich ist eine ständige Abführung von toxischen Molekülen notwendig. Sauerstoff kann aus den Kapillaren nur 150-200 µm weit diffundieren, so dass Zellen, die sich weiter entfernt von der Blutversorgung aufhalten, absterben. Für ein makroskopisches Wachstum der Tumormasse ist deshalb das Einsprossen von Blutgefäßen in Primärtumorgewebe und Metastasen grundlegend.

Die Neovaskularisierung besteht aus zahlreichen voneinander unabhängigen Schritten (Folkman, 1986). Zuerst erfolgt eine Invasion von mikrovaskulären Endothelzellen in das umgebende Stroma gefolgt von der Migration dieser Zellen in Richtung einer angiogenischen Stimulation. Daraufhin organisieren sich die proliferierenden Endothelzellen in dreidimensionale Strukturen und bilden neue Kapillarröhren aus (Auerbach und Auerbach, 1994). Diese neugebildeten Gefäße in den Neoplasmen unterscheiden sich wesentlich in der zellulären Zusammensetzung, der Gefäßdurchlässigkeit, der Stabilität und der Wachstumsregulation von Blutgefäßen in normalen Geweben (Folkman, 1986). Studien zeigten, dass ein Primärtumor mit einer besseren Gefäßversorgung eine größere Chance besitzt Fernmetastasen auszubilden (Weidner, 1995). Es wird vermutet, dass eine bessere Gefäßbildung zu einem größeren Primärtumor und somit zu einer erweiterten Oberfläche führt, von der aus Tumorzellen in die Zirkulation eintreten können.

Seit der ersten Entdeckung von Folkman (1986), dass die Tumorentwicklung wesentlich von der Angiogenese abhängt, wurden mehr als zwei Dutzend positive und in etwa gleich viele negative Regulatoren der Angiogenese identifiziert (Hanahan und Weinberg, 2000). Zu den (pro-) angiogenetischen Faktoren gehören der „Fibroblast Growth Factor 2, basic“ (FGF2) und der „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF). Beide Wachstumsfaktoren binden an transmembrane Tyrosin-Kinase-Rezeptoren der Endothelzellen. FGF2 induziert die Proliferation von endothelialen Zellen, stimuliert die Migration der Zellen und bewirkt eine verstärkte Produktion von Proteasen (Folkman und Klagsbrun, 1987; Folkman, 2003). Die Expression von FGF2 durch Tumorzellen ist vom Ort des Tumorwachstums abhängig. Dies zeigte die Implantation von humanen Zellen eines Nierenzellkarzinoms in verschiedene Organumgebungen von Nacktmäusen. Tumorzellen, die in die Niere implantiert wurden, exprimierten 10-20 mal so viel an FGF2 wie subkutan implantierte Tumorzellen und die resultierenden Tumore in den Nieren waren deutlich stärker vaskularisiert als die subkutanen Tumore (Singh *et al.*, 1994). VEGF induziert die Proliferation von endothelialen Zellen, erhöht die vaskuläre Permeabilität und stimuliert die Expression von uPA in endothelialen Zellen (Dvorak *et al.*, 1995). Die Mehrzahl der Lebermetastasen aus humanem kolorektalen Krebs exprimieren VEGF. Gleichzeitig wurde eine erhöhte

Expression von Rezeptoren für VEGF wie beispielsweise des „Kinase-insert Domain Receptor“ (KDR) in endothelialen Zellen der metastasierenden Tumormasse beobachtet (Warren *et al.*, 1995). Ein prominenter Angiogenese-Inhibitor ist „Thrombospondin 1“ (THBS1). THBS1 bindet an CD36, einen von endothelialen Zellen exprimierten Rezeptor (Bull *et al.*, 1994). Die Expression von VEGF und THBS1 in Tumorzellen wird vom Tumorsuppressor SMAD4 (SMAD: „Mothers Against DPP Homolog“) geregelt. SMAD4 liegt in etwa jedem dritten metastasierenden Kolonkarzinom funktionell inaktiviert vor (Miyaki *et al.*, 1999). Die subkutane Injektion von SMAD4-negativen Zellen eines Pankreaskarzinoms in Nacktmäuse führte zu progressiv wachsenden Tumoren, die viel VEGF und wenig THBS1 exprimierten. Durch dieses spezifische Genexpressionsmuster wurden Endothelzellen in der Maus aktiviert, Angiogenese induziert und das weitere Tumorstadium ermöglicht. Die Reexpression von SMAD4 führte zu einer reduzierten Expression von VEGF und zu einer erhöhten Expression von Thrombospondin 1. Hieraus resultierte eine Absenkung des angiogenen Potentials der Tumorzellen und somit eine mangelnde Durchblutung der Tumormasse. Als Folge wurde das weitere Wachstum der Tumore gebremst (Schwarte-Waldhoff *et al.*, 2000).

1.4 Methoden zur Analyse differentieller Genexpression

Ein genetischer Meilenstein, die Entschlüsselung der genomischen Sequenz vieler Spezies bis hin zum Genom des Menschen, wurde erreicht (McPherson *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001).

Die Sequenzanalyse stellt allerdings nur den ersten Schritt zur Aufschlüsselung der genetischen Komplexität dar. Die nächste Ebene wird die Bestimmung der zeitlich und lokal begrenzten Expression der Gene sein. Im menschlichen Genom kodieren nur etwa 1,5% der 3,2 Milliarden Basenpaare für Gene. Von diesem zur Verfügung stehenden Genpool wird in einer einzelnen Zelle zum jeweiligen Zeitpunkt nur ein kleiner Teil exprimiert, wobei die Regulation der Gentranskription durch restriktive Kontrollmechanismen gesteuert wird (Alberts, 1994). Die mRNA-Population einer Zelle besteht aus etwa 10000-20000 verschiedenen mRNA-Molekülen, wobei man häufige, mittel häufige, seltene und sehr seltene mRNA unterscheidet. Man schätzt, dass ~ 85% der exprimierten Gene in weniger als 5 Transkript-Kopien pro Zelle vorkommen. Velculescu *et al.* (1999) zeigten in einer umfassenden Genexpressionsanalyse, dass die 623 am stärksten exprimierten Gene zu 50% des Gesamt-mRNA-Anteils beitrugen und dass der durchschnittliche Expressionspiegel eines Transkripts pro Kolonkarzinomzelle 0,5 bis 2672 Kopien/Zelle betragen kann.

Die Entstehung von Krebs basiert auf genetischen und epigenetischen Veränderungen, die sich häufig in einer veränderten Genexpression ausdrücken. Diese tumorspezifischen Alterationen in der Genexpression resultieren in Zellen, die sich aggressiv vermehren und sämtliche Schritte der metastatischen Kaskade durchlaufen können. Daher ist zum genaueren Verständnis der Tumorprogression von kolorektalen Karzinomen die Erfassung der differentiellen Genexpression ein weiterer wichtiger Fortschritt.

Das „Expressed Sequence Tag“ (EST)-Projekt bildete eine erste wertvolle Quelle zur Erstidentifizierung von funktionellen Genen (Adams *et al.*, 1991). Vergleichbar mit anderen Verfahren wie der „Northernblot“-Analyse, der „RNase-protection“- und RT-PCR-Technik können hierbei aber nur eine sehr begrenzte Anzahl von Genen gleichzeitig analysiert werden (Alwine *et al.*, 1977; Zinn *et al.*, 1983; Veres *et al.*, 1987).

Zu diesem Zweck wurden in den letzten Jahren Techniken für eine massiv-parallele Analyse der Genexpression entwickelt. Die ausgearbeiteten Methoden basieren ebenfalls auf Mechanismen, die die verschiedenen mRNA-Transkriptzahlen in einem Gewebe oder einer Zellprobe messen. Dazu gehören die „Serielle Analyse der Genexpression“ (SAGE, Velculescu *et al.*, 1995) und die „Differential Display“-RT-PCR (DDRT-PCR, Liang und Pardee, 1992). Weitere PCR-basierte cDNA-Subtraktionstechniken wie die „Representational Difference“-Analyse (RDA) und die „Supression Subtractive“-Hybridisierung (SSH) wurden entwickelt (Lisitsyn und Wigler, 1993; Diatchenko *et al.*, 1996). Letztendlich wurde die Hybridisierung auf Mikroarrays als wichtiges Verfahren zur Genexpressionsanalyse beschrieben (Lockhart *et al.*, 1996).

Die SAGE stellt einen quantitativen Assay zur Identifikation des Expressionsprofils eines Systems dar. Der Nachteil bei dieser Methode liegt darin, dass man zwischen 200000 und 300000 kurze, synthetisierte Sequenzen („tags“) sequenzieren muss, um auch seltene Gene identifizieren zu können. Dies birgt einen enormen Arbeitsaufwand in sich.

Bei der PCR-basierten cDNA-Subtraktion werden grundsätzlich zwei zu vergleichende mRNA- oder cDNA-Populationen (z.B. aus zwei Zelllinien oder zwei Geweben) miteinander hybridisiert und differentiell exprimierte mRNA bzw. cDNA angereichert. Der Vorteil dieser Techniken ist, dass eine differentielle Expression von bisher unbekanntem Genen identifiziert werden kann, da für die Versuchsdurchführung keine Sequenzinformationen nötig sind. Ein weiterer entscheidender Vorteil der PCR-basierten Subtraktionstechniken gegenüber allen anderen Methoden ist die Möglichkeit, auch seltene Transkripte identifizieren zu können (Bertram *et al.*, 1998). Der Nachteil liegt aber darin, dass entweder nur eine limitierende Anzahl an Genen untersucht werden kann (z.B. DDRT-PCR), oder dass keine quantitativen Aussagen gemacht werden können (z.B. SSH).

In den letzten Jahren ist die Entwicklung und Nutzung von Mikroarrays zur Genexpressionsanalyse immer mehr in den Vordergrund gerückt (Notterman *et al.*, 2001;

Ramaswamy und Golub, 2002; Wang *et al.*, 2004). Mikroarray-basierte Techniken beruhen auf der Hybridisierung von mRNA- oder cDNA-Populationen auf einen Träger (Nylonmembran oder Glas), auf den Nukleinsäuren in hoher Dichte immobilisiert oder synthetisiert wurden (Schena *et al.*, 1995; Lockhart *et al.*, 1996). Durch die Positionierung bekannter Moleküle in einem definierten Raster entsteht eine Sonden-Matrix, mit deren Hilfe sich aus dem Pool einer komplexen Probe durch eine hochspezifische Hybridisierung genau das Gegenstück finden und detektieren lässt. Über einen Vergleich der Hybridisierungsmuster von zwei mRNA- bzw. cDNA-Populationen können anschließend differentiell exprimierte Gene bzw. cDNA identifiziert werden. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse basieren primär auf Untersuchungen mit Oligonukleotid-Mikroarrays, deren Einsatzmöglichkeiten und limitierende Faktoren im folgenden Kapitel eingehender beschrieben werden.

1.4.1 Qualitätskriterien und Anwendungsfelder für Oligonukleotid-Mikroarrays

Anfänglich wurden cDNA-Bibliotheken zur Positionierung auf Oberflächen verwendet (Gress *et al.*, 1992). Mit der Fertigstellung und öffentlichen Zugänglichkeit der genomischen Sequenz ganzer Organismen konnten bekannte oder vorhergesagte ORF („Open Reading Frames“), spezifisch amplifiziert und positioniert werden (DeRisi *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 1998). Andererseits konnten nun ebenfalls kurze Sequenzbereiche synthetisiert und auf einer Quarzmatrix verankert werden (Fodor *et al.*, 1991; Pease *et al.*, 1994). Bei der Verwendung von kurzen Oligonukleotiden besteht eine erhebliche Gefahr für Fehlhybridisierungen. Zur Vermeidung der resultierenden „falsch-positiven“ Hybridisierungssignale wird jedes Gen auf dem neuesten „Human Genome“- (HG-) U133 Plus 2.0 Gene-Chip[®] der Firma Affymetrix¹ von 11 verschiedenen Oligonukleotiden repräsentiert. Diese werden als 25mer in hoher Kopienzahl auf eine Fläche von 11 μm^2 (Probenzelle) synthetisiert. Ein zweites sogenanntes „MisMatch“-Oligonukleotid (mit zentralem Basenaustausch) dient als Kontrolle für Kreuzhybridisierungen. Über 2,7 Millionen dieser Probenzellen sind auf einem HG-U133 Plus 2.0-Array untergebracht. Ein Vorteil der Verwendung von kurzen, spezifischen Oligonukleotiden besteht darin, dass zumeist auch noch sehr nahe miteinander verwandte Sequenzen voneinander unterschieden werden können (Kane *et al.*, 2000).

Sensitivitätsexperimente mit den HG-U133 Plus 2.0-Arrays zeigten, dass die Detektionsgrenze für mRNA bei 0,75 pM lag. Somit kann ein Transkript unter 200000 Transkripten identifiziert werden. Die Reproduzierbarkeit der durch Hybridisierung von Oligonukleotid-

¹ <http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/hgu133plus.affx>

Mikroarrays erhaltenen Ergebnisse wurde in einer Vielzahl von früheren Experimenten bestätigt (Wodicka *et al.*, 1997; Lipshutz *et al.*, 1999). Die Resultate zeigten, dass die Plattform der Firma Affymetrix verlässlich Expressionsunterschiede bei einem Differenzfaktor von > 2 detektieren kann. Die Höhe von Variationen zwischen zwei identischen Proben in mehreren voneinander unabhängigen Hybridisierungen wurde als $< 2\%$ bestimmt.

Analysen mit DNA-Mikroarrays können zum Vergleich von krankem Gewebe (z.B. Tumor) gegen Normalgewebe verwendet werden (Golub *et al.*, 1999). Andererseits eignen sie sich zur Untersuchung von Zellkulturen, die unterschiedlichen Bedingungen wie Stressfaktoren oder Medikamenten ausgesetzt wurden. Es wird geschätzt, dass nur circa 0,2–10% aller mRNA-Spezies einer humanen Zelle zwischen Tumor- und Normalgeweben differentiell exprimiert vorliegen. Ein Verständnis der kritischen Veränderungen aller Gene in einem solchen experimentellen Ansatz kann durch eine gesamtgenomische Analyse mit dem HG-U133 Plus 2.0-Array ermöglicht werden. Durch die Verwendung der Mikroarrays ist es außerdem möglich, Stoffwechselwege oder Funktionshierarchien durch transgene Modellsysteme aufzuklären. Effekte im Genexpressionsprofil, die durch Manipulationen wie z.B. eine stabile Transfektion von Expressionskassetten mit Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen erzeugt wurden, können anschließend im großen Maßstab untersucht werden. Zusätzlich kann das Expressionsprofil von neuen Genen, die zur Zeit noch als anonyme Sequenzen (EST) vorliegen, erstellt werden. Die Identifizierung einer spezifischen Expression von Genen/EST in abgegrenzten Geweben (z.B. Metastasengewebe) macht sie als Kandidaten für weiterführende Untersuchungen interessant.

Der Einsatz von DNA-Mikroarrays ist aber nicht ausschließlich auf die Expressionsanalyse von Genen beschränkt. Weitere Anwendungsfelder ergeben sich vor allem beim Nachweis von Mutationen und „Single Nucleotide“-Polymorphismen (SNP, Hacia, 1999; Fan *et al.*, 2000; Melton, 2003). Der gezielte Einsatz von DNA-Mikroarrays zur SNP-Analyse in Genen und kodierenden Regionen gilt als ein vielversprechender Ansatz zum Auffinden komplexer krankheitsassoziiierter Änderungen. Kennedy *et al.* beschrieben 2003 die „Whole Genome Sampling“-Analyse (WGSA). Mit dieser Methode können Tausende von SNP in einer komplexen DNA-Probe parallel genotypisiert werden.

Durch das hohe Potential zur Automatisierung sowohl bei der Herstellung als auch in der Anwendung haben DNA-Chips eine wirtschaftlich wichtige Bedeutung erlangt (Smith, 2004). In der pharmazeutischen Industrie hat die Technologie der Mikroarrays vor allem auf die Erforschung und Entwicklung therapeutisch wirksamer Substanzen einen starken Einfluss (Xiang *et al.*, 2003; Smith, 2004). Dabei hat sich die Transkriptom-Analyse mit der DNA-Chiptechnologie, neben der globalen Proteom-Analyse mit MALDI-TOF/TOF-Systemen als ein wichtiges Werkzeug zur Klärung der Wirkmechanismen von Arzneimitteln und Chemikalien etabliert.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bisher ist über die Anzahl und Identität der Gene, die bei der malignen Progression des kolorektalen Karzinoms eine entscheidende Rolle spielen, nur wenig bekannt. Dem Erreichen unterschiedlicher Stadien der metastatischen Kaskade liegen vielfältige genetische Veränderungen zugrunde. Diese drücken sich häufig in einem veränderten Genexpressionsmuster aus, das in der vorliegenden Arbeit mit Oligonukleotid-Mikroarrays untersucht werden soll. Dazu wird ein Kolonkarzinom-Modellsystem verwendet, das zum einem aus einer nicht-metastasierenden humanen Primärtumor-Zelllinie KM12C und zum anderen aus zwei stark zur Leber metastasierenden Zelllinien, KM12SM und KM12L4A besteht. Das von KM12C zu erstellende Expressionsprofil soll mit dem Expressionsprofil der beiden metastasierenden Zelllinien verglichen werden. Diese wurden von KM12C abgeleitet und sollten somit, mit Ausnahme von progressionsassoziierten Genen, die Vielzahl der Gene vergleichbar exprimieren. Das Ziel dieser Arbeit ist, in diesem gut charakterisierten Zellsystem differentiell exprimierte Gene zu identifizieren, von denen ein Zusammenhang zur kolorektalen Metastasierung bisher noch nicht beschrieben wurde. Durch den Einsatz von Oligonukleotid-Mikroarrays, die ausschließlich EST-Sequenzen enthalten, sollen zusätzlich bisher noch nicht bekannte Gene identifiziert werden. Durch die Etablierung von transgenen Zellsystemen mit interessanten Kandidatengenen können anschließend mit diesen Funktionsstudien durchgeführt werden.

Möglicherweise werden durch die Identifizierung und teilweise Charakterisierung von differentiell exprimierten Genen weitere wichtige Einblicke in die genetischen Grundlagen der kolorektalen Tumormetastasierung erhalten. Zusätzlich könnten diese Gene Zielobjekte für therapeutische Ansätze in der Behandlung metastasierender CRC darstellen oder in der Prognose und Diagnostik von Nutzen sein.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und biochemische Reagenzien

[α - ³² P]dATP (370 MBq/ml)	Amersham (Braunschweig)
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Antifoam O-30	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Antigen Retrieval- (AR-10-) Puffer	BioGenex (San Ramon, CA, USA)
Antikörper-Verdünner	DAKO (Hamburg)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Betain	Roche (Mannheim)
BSA (acetyliert)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Calcein-AM	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
DAPI	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
DMSO-Lösung (20%)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
DNA-Ligase (<i>E. coli</i>)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Eisessig	Merck (Darmstadt)
Eosin	Merck (Darmstadt)
Ethanol, absolut (p.A.)	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Fibronektin	Roche (Mannheim)
Formaldehyd (37%)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Glyzerin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
H ₂ O ₂ (30%, Perhydrol)	Merck (Darmstadt)
Hämatoxylin	Merck (Darmstadt)
Heringssperma-DNA (fragmentiert)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaninchenserum	DAKO (Hamburg)
Kollagen I und IV	BD-Biosciences (San Jose, CA, USA)
Lachssperma-DNA	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Laminin	Roche (Mannheim)
LB-Agar	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
MES	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

Proteinstandard (Multi-Colored, „MultiMark“)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
NaCl-Lösung (5 M, RNase-frei)	Ambion (Austin, TX, USA)
Natrium-(di)-hydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
NorthernMax Denaturierender Gelpuffer (10x)	Ambion (Austin, TX, USA)
NorthernMax Laufpuffer (10x)	Ambion (Austin, TX, USA)
NorthernMax Formaldehyd-Ladepuffer	Ambion (Austin, TX, USA)
NorthernMax Transferpuffer	Ambion (Austin, TX, USA)
NuPAGE LDS-Probenpuffer (4x)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
NuPAGE MOPS-Laufpuffer (20x)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
NuPAGE Reduzierungsagens (10x)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
Peroxidase-Blockierungsreagenz	DAKO (Hamburg)
Plasma (human)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
RNA Millenium Marker	Ambion (Austin, TX, USA)
RNA-Ladepuffer mit Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
RNaseZap	Ambion (Austin, TX, USA)
R-Phycoerythrin Streptavidin Konjugat	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)
SDS-Lösung (20%)	Ambion (Austin, TX, USA)
SSPE (20x)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Sukrose	Merck (Darmstadt)
Superscript II (Reverse Transkriptase)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Thrombin (aus Rinderplasma)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Trypanblau	Merck (Darmstadt)
Tween-20 (10%)	Merck (Darmstadt)
ULTRAhyb-Hybridisierungslösung	Ambion (Austin, TX, USA)
Velcorin E242	Bayer (Leverkusen)
Vitronektin	BD-Biosciences (San Jose, CA, USA)
Xylol	Merck (Darmstadt)
Ziegenserum	DAKO (Hamburg)

Restriktionsenzyme und dazugehörige Puffer wurden von der Firma Roche (Mannheim) bezogen. Soweit nicht anders vermerkt, stammten alle weiteren Enzyme, Reaktionspuffer, Nukleotide, Längenstandards und sonstige molekularbiologische Reagenzien ebenfalls von der Firma Roche (Mannheim).

2.1.2 Bakterienstämme

Folgende *E. coli*-Bakterienstämme sind für die Amplifikation von Plasmid-DNA verwendet worden:

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
TOP10, Chemisch kompetente Zellen	F ⁻ , mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
XL1-Blue, Superkompetente Zellen	supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 re- IA1 lac [F' proAB+ lacI ^q lacZ Δ M15 Tn10(Tet ^r)]	Stratagene (Heidelberg)

2.1.3 Kits und Reaktionssysteme

BCA Protein Assay Kit	Pierce (Rockford, IL, USA)
cDNA Synthesis System	Roche (Mannheim)
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche (Mannheim)
ChemMate Detection Kit, DAB/Peroxidase	DAKO (Hamburg)
DNA-free Kit	Ambion (Austin, TX, USA)
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche (Mannheim)
High Fidelity PCR Master Kit	Roche (Mannheim)
High Pure RNA Paraffin Kit	Roche (Mannheim)
LightCycler DNA Master Hybridization Probes	Roche (Mannheim)
LightCycler DNA Master SYBR Green I Kit	Roche (Mannheim)
LightCycler h-G6PDH Housekeeping Gene Set	Roche (Mannheim)
Lumi-Light ^{PLUS} Western Blotting Kit	Roche (Mannheim)
MEGAscript T7 Kit	Ambion (Austin, TX, USA)
Oligotex mRNA Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Rapid DNA Ligation Kit	Roche (Mannheim)
RNeasy Mini/Midi Kit	Qiagen (Hilden)
Strip-EZ DNA Kit	Ambion (Austin, TX, USA)
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Biocoat-Matrigel Invasionskammern	BD-Biosciences (San Jose, CA, USA)
Biocoat-Zellkulturinsertionen, Kontrollplatten	BD-Biosciences (San Jose, CA, USA)
Chemiluminescent Detection Film	Roche (Mannheim)
Cronex 5 Medical Röntgenfilme	Agfa-Gevaert (Mortsel, Belgien)
DNA-Rotationssäulen (Sephadex G50)	Roche (Mannheim)
Fast-RNA tube green Homogenisierungsgefäße	Qbiogene (Carlsbad, CA, USA)
Fettstift DAKO Pen	DAKO (Hamburg)
Glaspipetten	BD-Biosciences (San Jose, CA, USA)
Klonierungszyylinder (8 x 8 mm)	Corning (Acton, MA, USA)
Kryogefäße (1,8 ml)	NUNC (Wiesbaden)
LightCycler Reaktionskapillaren	Roche (Mannheim)
Lochplatten für Zellkultur	BD-Biosciences (San Jose, CA, USA)
Nitrozellulosemembran (0,45 µm Porengröße)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
NuPAGE Bis-Tris Gele	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Nylonmembran BrightStar-Plus	Ambion (Austin, TX, USA)
Objektträger (SuperfrostPlus)	Menzel-Gläser (Braunschweig)
PCR Reaktionsgefäße 0,2 ml (RNase-frei)	Eppendorf (Hamburg)
Phase Lock Gel-Gefäße	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen Marke Safeseal-Tips	Biozym (Hessisch Oldendorf)
QIAshredder-Homogenisierungsgefäße	Qiagen (Hilden)
Reaktionsgefäße (RNase-frei, 1,5 ml)	Ambion (Austin, TX, USA)
UVetten 220-1600 nm (8,5 mm)	Eppendorf (Hamburg)
Zellkulturflaschen	BD-Biosciences (San Jose, CA, USA)
Zellschaber	BD-Biosciences (San Jose, CA, USA)

2.1.5 Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen

Bathocuproin-Disulfonat	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Fötale Rinderserum (Myoclon Super Plus)	Life Technologies (Rockville, MD, USA)
Hygromycin B	Roche (Mannheim)
L-Glutamin (200 mM)	Life Technologies (Rockville, MD, USA)
Minimum Essential-Medium (MEM, 1x), ohne L-Glutamin (Eagle, 1959)	Life Technologies (Rockville, MD, USA)
Natriumpyruvat (100 mM)	Life Technologies (Rockville, MD, USA)
Nicht-essentielle Aminosäurenlösung (100x)	Life Technologies (Rockville, MD, USA)
Phosphate-Buffered Saline (PBS, 1x), Roswell Park Memorial Institute (RPMI)	Life Technologies (Rockville, MD, USA)
1640-Medium (1x) ohne L-Glutamin	Life Technologies (Rockville, MD, USA)
α -Thioglycerol	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Trypsin-EDTA-Lösung (1x)	Roche (Mannheim)
Vitaminlösung (100x, flüssig)	Life Technologies (Rockville, MD, USA)

2.1.6 Plasmide

pCR4-TOPO	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
pcDNA3.1/Hygro (+)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
pCI-neo-GFP	Promega (Madison, WI, USA)
pBJ1-neo-Trop-2	S. Alberti, University "G. D'Annunzio", Chieti, Italien

2.1.7 Arrays

2.1.7.1 Oligonukleotid-Mikroarrays (GeneChip[®])

- HG-U95Av2-E-Array-Set.
Das HG-U95-Set der Firma Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) repräsentiert mehr als 60000 Gene bzw. EST-Cluster auf einem Glasträger.
- Test2-Array.
Enthält Sequenzen von Haushaltsgenen und Kontrollen zur Qualitätsabschätzung von hergestellten Hybridisierungscocktails (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).

2.1.7.2 RNA- bzw. cDNA-Arrays

- Humaner „Cancer Gene Screening Total RNA Dot“-Blot.
Enthält 48 Paare von je 5 µg isolierter Gesamt-RNA aus Tumor- und korrespondierenden Normalgeweben gespottet auf eine Nylonmembran (BioChain, Hayward, CA, USA).
- Humaner „Multiple Tissue Expression“- (MTE-) Array.
Enthält isolierte Poly(A)-mRNA aus 78 verschiedenen humanen Geweben die auf eine Nylonmembran gespottet sind (BD-Biosciences, San Jose, CA, USA).
- „Cancer Profiling“-Array.
Enthält normalisierte cDNA aus humanen Normal- und korrespondierenden Tumorgeweben von 241 Patienten. Die cDNA ist paarweise auf eine Nylonmembran gespottet (BD-Biosciences, San Jose, CA, USA).

2.1.7.3 Gewebearrays

- Gewebearray MAN1.
Gewebearray mit zu dem Multitumor-Array MA1 korrespondierendem humanen Normalgewebe. Die Gewebeproben stammen aus Magen, Speiseröhre, Lunge, Rektum, Schilddrüse und Niere (BioCat, Heidelberg).
- Gewebearray MA1.
Humaner Multitumor-Array mit 60 Formalin-fixierten und paraffinisierten Gewebeproben auf einem Objektträger (BioCat, Heidelberg).

2.1.8 Geräte

Analysenwaage A&D HF-1200G	A&D Company (Tokyo, Japan)
Ausbettstation	Tissue-Tek (Zoetwoude, Niederlande)
Brutschrank Jouan IG 150	Jouan (Nantes, Frankreich)
Celloshaker Variospeed	Renner (Dannstadt)
Dampftopf „Multi-Gourmet“	Braun (Kronberg)
Eindeckautomat	Tissue-Tek (Zoetwoude, Niederlande)
Elektrophoresekammer Horizon 11-14	Life Technologies (Rockville, MD, USA)
Elektrophoresekammer XCell <i>SureLock</i>	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
ELISA-Reader TECAN Spectra Rainbow	Tecan (Crailsheim)
FACScan	Becton Dickinson (Heidelberg)

Filmentwickler Curix HT330U	Agfa-Gevaert (Mortsel, Belgien)
GeneChip® Fluidics Station 400	Affymetrix (Santa Clara, CA, USA)
Gewebe-Einbettautomat	Shandon (Frankfurt)
Homogenisator BIO101	Qbiogene (Carlsbad, CA, USA)
HP G2500A GeneArray Scanner	Affymetrix (Santa Clara, CA, USA)
LightCycler Instrument	Roche (Mannheim)
Liquid Scintillation Counter Win Spectral 1414	Wallac (Freiburg)
Pipettierhilfe Easypet 4420	Eppendorf (Hamburg)
pH-Meter inoLab	WTW (Wien, Österreich)
Schlittenmikrotom	Leica (Bensheim)
Spannungsgerät EPS 301	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Spannungsgerät PowerEase 500	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Spectrophotometer UVIKON 931	Kontron Instruments (Mailand, Italien)
SpeedVac Concentrator	Savant (Farmingdale, NY, USA)
Sterilbank	BDK (Sonnenbühl)
TECAN Spectra Fluor Plus	Tecan (Crailsheim)
Thermalcycler GeneAmp 9700	Applied Biosystem (Weiterstadt)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Heraeus Biofuge 15R	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf (Hamburg)
Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell	BIO-RAD (München)
Ultrazentrifuge Sorvall RC5Bplus	Kendro (Langenselbold)
UV-Crosslinker Modell UV-Stratalinker 2400	Stratagene (Heidelberg)
UV-Transilluminator	UVP (San Gabriel, CA, USA)
Wasserbad precitherm PFV	Roche (Mannheim)
Zellkulturmikroskop Leitz Labovert	Leitz (Wetzlar)
Zellkulturzentrifuge Minifuge RF	Heraeus Instruments (Hanau)

2.1.9 Gewebe

Die Gewebe wurden von J. Rüschoff (Institut für Pathologie, Klinikum Kassel) und W. Dietmaier (Institut für Pathologie, Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt.

Patienten- Nummer	Kodierung der Gewebeprobe	Primär- tumor	Metastase	Dukes'- Stadium	TNM- Klassifizierung			Mann (M) / Frau (F)
					T	N	M	
T1	K00006-7	Rektum	-	A	1	0	0	M
T2	K00012-6	Rektum	-	A	2	0	0	M
T3	K00004-8	Kolon	-	B	3	0	0	F
T4	R00017-5	Kolon	-	C	1	1	0	F
T5	R00022-5	Kolon	-	C	2	1	0	M
T6	R00039-5	Kolon	-	C	3	2	0	M
T7	K00001-5	Kolon	-	D	3	1	1	F
T8	K00002-5	Rektum	-	D	4	2	1	M
T9	R00009-5	Zäkum	-	D	3	2	1	M
M1	R00021-8	Zäkum	Leber	-	3	1	1	M
M2	R00025-8	Kolon	Leber	-	4	0	1	F
M3	R00026-8	Rektum	Leber	-	2	1	1	M
M4	R00028-7	Kolon	Leber	-	n.b.	n.b.	1	M
M5	R00042-1	Rektum	Leber	-	4	0	1	F
M6	R00044-1	Kolon	Leber	-	3	1	1	F
M7	R00048-5	Rektum	Leber	-	4	2	1	M
M8	R00055-1	Kolon	Leber	-	2	1	1	M
M9	R00056-1	Kolon	Leber	-	3	0	1	M

n.b. = nicht bekannt

2.1.10 cDNA-Klone für „Northernblot“-Analysen

Alle cDNA-Klone sind von der Firma Incyte (Palo Alto, CA, USA) bezogen worden. Die Bezeichnung der Klone sowie die Länge der cDNA-Insertionen sind angegeben.

pINCY1975287 (1050 bp)	BCMP11: „breast cancer membrane protein 11“
pINCY4538869 (1200 bp)	CA12: „carbonic anhydrase XII“
pINCY1626390 (1050 bp)	EST: AI344189
pINCY1870984 (1250 bp)	EST: AI804917
pINCY3342160 (1550 bp)	FUT4: „fucosyltransferase 4“
pINCY1975760 (800 bp)	HSPG2: „heparan sulfate proteoglycan 2“
pINCY4577013 (1050 bp)	MDK: „midkine“
pINCY1820603 (1700 bp)	MPP5: „membrane protein, palmitoylated 5“
pBlue2011744 (1000 bp)	MUC3B: „mucin 3B“
pINCY5187727 (1900 bp)	NET-7: „transmembrane 4 superfamily member tetraspan“
pINCY1311945 (800 bp)	RGS2: „regulator of G-protein signalling 2“
pINCY1355205 (350 bp)	S100A13: „S100 calcium-binding protein A13“
pINCY3971503 (900 bp)	SNX25: „sorting nexin 25“
pINCY2547610 (800 bp)	TACSTD1: „tumor-associated calcium signal transducer 1“
pINCY4229860 (900 bp)	TMSB4X: „thymosin, beta 4, X-linked“

2.1.11 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide sind bei der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert worden. Die Länge des amplifizierten DNA-Produktes ist für jedes Primerpaare angegeben.

T7-(T) ₂₄	5'-GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGG CGG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3'	
B2 Kontroll-Oligonukleotid	5'-bioGTCGTC AAGATGCTACCGTTCAGGA-3'	
AA309047_for	5'-AGA TGG AGC GAG TCA GAA C-3'	372 bp
AA309047_rev	5'-TAC CTC TGG AAC TTT GAA GC-3'	
AI344053_for	5'-GCC CTT ATT GTT CTT GCT T-3'	204 bp
AI344053_rev	5'-CAG TCA GCA ACT TGG AAT AT-3'	
AI344189_for	5'-CAA ATG CCT AAA TGG AAC C-3'	324 bp
AI344189_rev	5'-CAG AGA AGA GAG CAC CTG TT-3'	
AI739241_for	5'-GGT TGT GTT ACA TGA CAA GA-3'	330 bp
AI739241_rev	5'-GCT ATC ACG TAC ATA CTC CA-3'	
AI832118_for	5'-TCA TGT GTA TGT TGG CTA CAG-3'	300 bp
AI832118_rev	5'-CAA CTT TCT TTG CTT CGA TC-3'	
AI832477_for	5'-GTT ACA AAA CAG CGG GAA C-3'	308 bp
AI832477_rev	5'-AAG CAG ACC CAG AAG CTG-3'	
ACTB_for	5'-ACA CCT TCT ACA ATG AGC TGC G-3'	324 bp
ACTB_rev	5'-CGC TCG GTG AGG ATC TTC ATG-3'	
CANX_LC_for	5'-ATT GTC AGA TCG TTC ATT GC-3'	204 bp
CANX_LC_rev	5'-ATG GAA CAG GTA ACC AGC AT-3'	
CANX_LC_FA_for	5'-GTC TGC AGG TTT CTC CTT GA-3'	83 bp
CANX_LC_FA_rev	5'-ATA CTG TCA ACG GTG GGT GA-3'	
FUT3_for	5'-ACT GGG ATA TCA TGT CCA ACC CTA AGT CAC-3'	582 bp
FUT3_rev	5'-GGG CCA GGT CCT TGG GGC TCT GGA AGT CG-3'	
FUT6_for	5'-GTC CCC AAG CCA CTG CTG GCA GCT GAA AGC-3'	497 bp
FUT6_rev	5'-GGG CCA GGT CCT TGG GGC TCT GGA AGT CG-3'	
GAPD_for	5'-TCG GAG TCA ACG GAT TTG GTC GTA-3'	520 bp
GAPD_rev	5'-ATG GAC TGT GGT CAT GAG TCC TTC-3'	
Trop-2_Northern_for	5'-GCG CAA AGG AGA CGT TTA TC-3'	204 bp
Trop-2_Northern_rev	5'-ACA TAA CGC TGT GCC ATC C-3'	
Trop-2_LC_FA_for	5'-GTA TCC CCT TTC GGT CCA A-3'	71 bp
Trop-2_Nhe I_for	5'-GTT CCT CCG CGC TAG CAT GGC TCG-3'	985 bp
Trop-2_Bam HI_rev	5'-CGG GAT CCT ACA AGC TCG GTT CCT TTC TC-3'	
VIM_for	5'-CAA AGC AGG AGT CCA CTG A-3'	200 bp
VIM_rev	5'-ACG AGC CAT TTC CTC CTT-3'	

Primer für Sequenzanalysen von TROP2

Trop-2_Seq_for 5'-GTG CTG GTG CGT GAA CTC-3'
Startpunkt der Vorwärtssequenzierung: Base 372 des TROP2-ORF

Trop-2_Seq_rev 5'-CAG GTC TGA GTG GTT GAA GG-3'
Startpunkt der reversen Sequenzierung: Base 516 des TROP2-ORF

2.1.12 Antikörper

2.1.12.1 Primäre Antikörper

Die in der „Westernblot“-Analyse eingesetzten Verdünnungen der primären Antikörper sind in eckigen Klammern angeführt.

- Polyklonaler Antikörper generiert in Ziege gegen humanes Trop-2 [1:500] (AF650, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).
- Monoklonaler Antikörper generiert in Maus gegen humanes Ep-CAM [1:500] (Klon AUA1, Neomarkers, Fremont, CA, USA).
- Polyklonaler Antikörper generiert in Kaninchen gegen humanes Cyclin D1 [1:200] (M-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).
- Monoklonaler Antikörper generiert in Maus gegen humanes β -Catenin [1:500] (Klon 14, BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA).
- Monoklonaler Antikörper generiert in Maus gegen humanes β -Aktin [1:2000] (Klon JLA20, Oncogene Research Products, Cambridge, MA, USA).

2.1.12.2 Sekundäre Antikörper

- Ziegen-Immunglobulin G isoliert aus Serum (Sigma-Aldrich, Deisenhofen).
- CY3-konjugierter Antikörper generiert in Kaninchen gegen Ziege (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA).
- FITC-konjugierter Antikörper generiert in Kaninchen gegen Ziege (Sigma-Aldrich, Deisenhofen).
- Biotin-konjugierter Antikörper generiert in Ziege gegen Streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).
- POD-konjugierter Antikörper generiert in Maus gegen Ziege (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).
- POD-konjugierter Antikörper generiert in Schaf gegen Maus (Roche, Mannheim).
- POD-konjugierter Antikörper generiert in Schaf gegen Kaninchen (Roche, Mannheim).

2.1.13 Zelllinien

2.1.13.1 Das KM12-Zellsystem

Die humanen Kolonkarzinom-Zelllinien KM12C, KM12SM und KM12L4A wurden freundlicherweise von I. J. Fidler (M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie KM12C wurde aus einem als Dukes' B₂ klassifizierten Primärtumor (lokale Invasion, kein Nachweis von Metastasen) des Kolons etabliert. Die Zelllinien KM12SM und KM12L4A sind hochmetastatische Varianten von KM12C, die in Nacktmäusen generiert wurden (Morikawa *et al.*, 1988a und 1988b). Hierzu wurden KM12C-Zellen in die Milz von athymischen Nacktmäusen injiziert und die (sehr wenigen) erhaltenen Lebermetastasen isoliert und kultiviert. Nach vier dieser Zyklen (Injektion von kultivierten Zellen in die Milz - Isolierung der erhaltenen Lebermetastasen – Etablierung einer Zelllinie aus isolierten Lebermetastasen) wurde die zur Leber hochmetastatische Zelllinie KM12L4A erhalten. Die Zelllinie KM12SM wurde durch orthotope Injektion von KM12C-Zellen in die Wand des Zäkums und durch Isolierung und Kultivierung einer daraus resultierenden Lebermetastase generiert. Die KM12-Zellen wachsen adhärent und wurden in Eagle's MEM-Medium ergänzt mit 10% fötalem Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, einer 1x Lösung an nicht-essentiellen Aminosäuren und einer 2x Vitaminlösung kultiviert.

2.1.13.2 Das HCT116-Zellsystem

Die humanen Kolonkarzinom-Zelllinien HCT116 und HCT116U5.5 sind bei der Zellbank der Roche Diagnostics GmbH (Penzberg) erhältlich. Die ursprüngliche HCT116-Zelllinie wurde am National Cancer Institute (NCI) aus einem humanen Kolon-Primärtumor etabliert (Brattain *et al.*, 1981). Der HCT116U5.5-Zellklon ist eine zur Lunge hochmetastatische Variante von HCT116 (bisher nicht publizierte Daten). Hierzu wurden HCT116-Zellen subkutan in athymische Nacktmäuse injiziert und daraus resultierende Lungenmetastasen in Zellkultur etabliert. Nach mehreren Selektionsrunden (subkutane Injektion – Isolierung von Lungenmetastasen - Etablierung einer Zelllinie aus den isolierten Lungenmetastasen) wurde der Zellklon HCT116U5.5 erhalten. Die HCT116-Zellen wachsen adhärent und wurden in RPMI 1640-Medium ergänzt mit 10% FKS und 2 mM L-Glutamin kultiviert.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Rekultivierung von Kryokulturen

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden rasch durch Zugabe von vorgewärmtem (37°C) Medium aufgetaut und bei 300 x g für 10 min abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde einmal mit warmem Medium vom DMSO-Gefrierschutz gewaschen und mit 7 ml Medium in einer T25-Kulturflasche kultiviert (siehe Kapitel 2.2.1.2).

2.2.1.2 Kultivierung permanenter Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden in den angegebenen Medien bei 37°C, 5% CO₂ unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Für die Passagierung und „Ernte“ wurde der Zellrasen einmal mit vorgewärmtem PBS gewaschen, durch Inkubation mit 0,05% Trypsin-/0,02% EDTA-Lösung vom Flaschenboden abgelöst und die Reaktion anschließend durch Zusatz von Medium mit 10% FKS gestoppt. Nach einer Zentrifugation bei 300 x g für 10 min wurde das Zellsediment in Kulturmedium aufgenommen und die Zellen wieder in gewünschter Dichte ausgesät oder für weitere Analysen verwendet.

2.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Zellkulturen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase, wie unter 2.2.1.2 beschrieben, geerntet. Zur Kryokonservierung vermischte man ca. 1-5 x 10⁶-Zellen in 0,7 ml Kulturmedium mit 0,7 ml kaltem FKS/DMSO (v/v 5:1). Die Zellsuspension wurde in ein 1,8 ml Kryogefäß gefüllt und zur langsamen Abkühlung in einer vorgekühlten Isopropanol-Box für mindestens 24 h bei -80°C aufbewahrt. Eine Dauerlagerung der Zellen erfolgte bei -196°C in einem Stickstofftank.

2.2.1.4 Einfrieren von sedimentierten Zellen

Trypsinierte und abzentrifugierte Zellen aus subkonfluenten Zellkulturen wurden in PBS resuspendiert und gezählt. Anschließend sedimentierte man entsprechende Aliquots von 1 x 10⁷ - 1 x 10⁸-Zellen bei 300 x g für 10 min, entfernte den PBS-Überstand vollständig und frohr das Zellsediment in flüssigem Stickstoff schockartig ein. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C.

2.2.1.5 Bestimmung der Lebendzellzahl

50 μl der erhaltenen Zellsuspensionen wurden mit 50 μl Trypanblau vermischt. Nach kurzer Einwirkzeit haben sich tote Zellen komplett blau gefärbt, während lebende Zellen den sauren Farbstoff nicht aufnehmen können. Die Zellsuspension wurde in eine Neubauer Zählkammer zwischen Kammer und Deckglas gegeben und die lebenden Zellen, die sich in den 4 Großquadraten der Kammer befanden, unter dem Mikroskop gezählt. Die Zellzahl konnte dann durch Gleichung 2.1 errechnet werden.

Gleichung 2.1:

Zellzahl/ml = Mittelwert gezählter Zellen in den vier Großquadraten $\times 2 \times 10^4$

- Der Faktor 2 entspricht der Verdünnung mit Trypanblau.
- Der Faktor 10^4 bezieht sich auf die Umrechnung von 0,1 μl Volumen eines Großquadrates auf ein Volumen von 1 ml.

2.2.1.6 Transfektion von KM12C-Zellen

Jeweils 2×10^6 -Zellen der Zelllinie KM12C wurden in 6-Lochplatten (10 cm^2 Oberfläche/Loch) in Kulturmedium ausgesät. Nach 16 h Wachstum hatten die Zellen eine Konfluenz von circa 90% erreicht und konnten transfiziert werden. Für den Transfektionsansatz vermischte man 242 μl serumfreies Medium mit 4 μg eines GFP-Kontrollvektors (pCI-neo-GFP) oder mit 4 μg eines Expressionsvektors für Trop-2- bzw. einem Leervektor als Kontrolle. Parallel dazu wurde 240 μl serumfreies Medium mit 10 μl Lipofectamine 2000-Reagenz vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurden die 250 μl der DNA-Lösung mit den 250 μl der Liposomenlösung vermischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Währenddessen ersetzte man in jeder Vertiefung das Standard-Kulturmedium durch 500 μl serumfreies Medium und gab dann die Transfektionsmischung tropfenweise hinzu. Nach 4 h Inkubationszeit im Brutschrank wurden die Komplexe durch Mediumwechsel entfernt und die Zellen wieder in Medium mit 10% FKS gehalten. Die Analyse der Transfektionseffizienz mit dem GFP-Kontrollvektor erfolgte nach 48 h mittels der Durchflusszytometrie (FACS).

2.2.1.7 Isolierung stabil transfizierter Zellklone

Zur Isolierung stabil transfizierter Klone wurden die Zellen 16 h nach der Transfektion in Zellkulturschalen von 10 cm Durchmesser überführt und für ca. 48 h in Standard-Kulturmedium gehalten. Nach Austausch des Mediums gegen Selektionsmedium mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B konnte nach einer Woche ein massiver Zelltod beobachtet werden. Ungefähr vier Wochen später waren isolierte Zellkolonien mit Hilfe von

Klonierungszyklindern vereinzelbar. Dazu wurden die Zellkolonien zweimal vorsichtig mit warmem PBS gewaschen, die Klonierungszyklinder auf der Unterseite mit sterilem Vakuumsfett bestrichen und über einzelne Klone auf den Schalenboden gesetzt. Durch Zugabe von 2-3 Tropfen Trypsin-EDTA lösten sich die Klone ab und man transferierte sie mit 100 µl Medium in eine 96-Lochplatte. Um das Auswachsen der isolierten Klone zu verbessern, wurde das „frische“ Selektionsmedium entweder 1:1 mit konditioniertem Medium vermischt oder mit PTB-Antioxidantien versetzt. Dazu entnahm man das konditionierte Medium von konfluent wachsenden KM12C-Zellen, filtrierte steril (0,22 µm Porengröße) und versetzte es ebenfalls mit 100 µg/ml Hygromycin B. Der PTB-Antioxidantiencocktail wurde nach Brielmeier *et al.* (1998) in folgenden Endkonzentrationen zum Selektionsmedium gegeben: 1 mM Natriumpyruvat, 50 µM α-Thioglycerol und 20 nM Bathocuproin-disulfonat.

2.2.1.8 FACS-Analysen

Die Zelloberflächenexpression von Trop-2 wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers und eines Durchflusszytometers analysiert. Dazu wurden 1×10^6 -Zellen sedimentiert, in 100 µl einer 1:20 Verdünnung des primären Antikörpers in Kulturmedium aufgenommen und für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 3 ml Medium gewaschen und bei 300 x g für 10 min zentrifugiert. Nach einer Inkubation mit 100 µl einer 1:20 Verdünnung des sekundären FITC-gekoppelten Antikörpers (30 min, 4°C) wurde erneut mit 3 ml Medium gewaschen, abzentrifugiert und die FITC-markierten Zellen wurden in 400 µl Medium aufgenommen. Die Messung der Oberflächenexpression des Trop-2-Proteins erfolgte mit dem FACScan Durchflusszytometer.

2.2.1.9 Immunfluoreszenzmarkierung von Zellen

Neben der FACS-Analyse wurde die Immunfluoreszenzmarkierung von Zellen als Methode zur Visualisierung der Oberflächenexpression von Trop-2 verwendet.

2.2.1.9.1 Fixierung von Zellen auf Deckgläser

Die Zellen wurden über Nacht auf einem sterilen Deckglas in 6-Lochplatten bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert, zweimal mit warmem PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Fixierlösung/Loch für 15 min inkubiert. Die fixierten Zellen auf den Deckgläsern konnten in PBS bei 4°C für eine Woche gelagert werden.

-Fixierlösung: 4% Paraformaldehyd, 4% Saccharose, 120 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,4)

2.2.1.9.2 Immunfärbung von Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CY3

Alle Waschschr itte des Protokolls wurden für jeweils 5 min bei RT durchgeführt.

Die fixierten Zellen wurden zuerst zweimal in NS-Na-Phosphatpuffer und HS-Na-Phosphatpuffer gewaschen. Es folgte ein Blockierungsschritt für 30 min mit 1 ml KSL-Puffer in den 6-Lochplatten. Danach wurden die Zellen auf den Deckgläsern in einer feuchten Kammer mit dem primären Antikörper (1:1000 in KSL-Puffer) für 1 h bei RT inkubiert. In 6-Lochplatten wurde dreimal mit HS-Na-Phosphatpuffer gewaschen und anschließend mit einem sekundären CY3-gekoppelten Antikörper (1:70 in KSL-Puffer) für 1 h bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Nach einem weiteren Waschschr itt (3 x HS-Na-Phosphatpuffer, 1x NS-Na-Phosphatpuffer) erfolgte die Kernfärbung durch direkte Zugabe von DAPI-Lösung (1:2000 in NS-Na-Phosphatpuffer). Nach 2 min Inkubation mit DAPI wurde wieder gewaschen (3 x HS-Na-Phosphatpuffer, 1x NS-Na-Phosphatpuffer) und die Zellen wurden in einer 70%igen Glycerin/PBS-Lösung auf einem Objektträger (OT) eingebettet. Mit Nagellack versiegelt konnten die Präparate bei 4°C gelagert werden. Für die Visualisierung wurde das „Axioplan“ Mikroskop von Zeiss (Göttingen) mit speziellen Filterkombinationen für die Auflichtfluoreszenz verwendet (487901 für DAPI, 478915 für CY3). Die fluoreszierenden Präparate wurden mit einer CCD-Kamera (Photometrics, Ottobrunn) aufgenommen und digitalisierte Bilder mit dem Bildverarbeitungsprogramm *MetaMorph 4.5.0.0*. (Universal Imaging, Downingtown, PA, USA) weiterverarbeitet.

- <u>HS (Hochsalz)-Na-Phosphatpuffer (pH 7,4):</u>	500 mM NaCl, 20 mM Na-Phosphat,
- <u>NS (Niedrigsalz)-Na-Phosphatpuffer (pH 7,4):</u>	150 mM NaCl, 10 mM Na-Phosphat,
- <u>2x KSL (Kaninchen-Serum-Lösung)-Puffer:</u>	16,7% Kaninchenserum, 0,3% Triton X-100, 450 mM NaCl, 20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH 7,4)

2.2.1.10 Adh sionstest

2.2.1.10.1 Beschichtung von Lochplatten mit Substraten der extrazellulären Matrix

Für den Adh sionstest wurden schwarze 96-Lochplatten eingesetzt. Untersucht wurde die Adhäsion von Zellen an fünf Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix: Kollagen Typ I und Typ IV, Laminin, Fibronectin und Vitronectin. Hierzu wurden die Proteine in den vom Hersteller empfohlenen Verdünnungen auf Konzentrationen von 40 µg/ml bzw. auf 0,4 µg/ml für Vitronectin eingestellt. In jede Vertiefung gab man 50 µl der Proteinlösungen (50 ng/cm² Vitronectin bzw. 5 µg/cm² für die anderen Proteine) und inkubierte die Platten für eine Stunde bei RT und dann über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Überstände entfernt und die beschichteten Vertiefungen zweimal mit PBS gewaschen.

2.2.1.10.2 Test auf Zelladhäsion an Substraten der extrazellulären Matrix

80% konfluente Zellen löste man mit einer 0,5 mM EDTA-Lösung in PBS durch Inkubation für 10 min bei 37°C vom Zellflaschenboden ab. Nach zwei Waschschritten mit PBS stellte man die Zellen mit serumfreiem Medium auf eine Konzentration von 5×10^6 -Zellen/ml ein und markierte sie mit dem Fluorophor Calcein-AM (10 µl/ml Zellsuspension). Der ungeladene Calcein-Acetoxy-methylester kann durch die Membran in die Zelle eindringen und wird in der Zelle durch Esterasen von der lipophilen Blockierungsgruppe abgespalten, wodurch der Farbstoff die Zelle nicht wieder verlassen kann. Die Markierung erfolgte für 30 min bei 37°C, gefolgt von zwei Waschschritten in warmem, serumfreiem Medium. 100 µl der fluoreszierenden Zellsuspension mit 1×10^6 -Zellen pro ml wurden auf die beschichteten Vertiefungen gegeben und für 90 min bei 37°C inkubiert. Ein gleiches Aliquot von je 1×10^5 -Fluorophor-markierten Zellen pipettierte man zur Bestimmung der Ausgangszellzahl in unbeschichtete Vertiefungen. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden zweimal vorsichtig mit warmem PBS abgewaschen und die verbleibenden adhärenenten Zellen mit einer 1:1 Mischung von serumfreiem Medium und PBS überschichtet. Die Anzahl der adhärenenten Zellen ist direkt proportional zur detektierten Fluoreszenz in einem „SpectraFluor Plus“-Leser mit einem Fluoreszenzfilter von 485 nm (F_{485} , Referenzwellenlänge: 535 nm). Die Adhäsionsfähigkeit an ein bestimmtes Substrat wurde in % Adhäsion nach Gleichung 2.2 errechnet.

Gleichung 2.2:

$$\% \text{ Adhäsion} = F_{485} (\text{adhärierte Zellen}) \times 100 / F_{485} (\text{ausplattierte Zellen})$$

2.2.1.11 Invasions- und Migrationstest

Beim Invasionstest wandern die Zellen durch eine aufgetragene Matrigelschicht und durch eine Kunststoffmembran mit einer definierten Porengröße von 8 µm aus einem Einsatz in ein unteres Kompartiment. Der Aufbau des Migrationstests entspricht dem Invasionstest mit der Ausnahme, dass die Kunststoffmembran nicht mit einem Matrigel beschichtet ist. Der verwendete Aufbau eines Filtereinsatzes in einer Lochplatte wird allgemein als „Boyden Kammer“ bezeichnet. Beim Invasionstest musste die Matrigelschicht vor Versuchsbeginn für zwei Stunden in Standard-Kulturmedium rehydriert werden.

Für beide Tests wurden subkonfluent wachsende Zellen abtrypsiniert und jeweils 1×10^5 -Zellen in 500 µl Medium mit 5% FKS aufgenommen. In die entweder mit Matrigel beschichteten oder unbeschichteten Filtereinsätze (oberes Kompartiment) pipettierte man die Zellsuspension. In das untere Kompartiment wurde 800 µl Medium mit 20% FKS als Chemoattraktant gefüllt. Nach 72 h Inkubation bei 37°C im Brutschrank entfernte man

vollständig die Zellen von der oberen Seite der Membran mit einem Baumwollstäbchen – mit Ausnahme der Referenzkammern. Der Prozentsatz an Zellen, die in der Lage waren, das Matrigel zu durchqueren (im Falle des Invasionstests) und durch die Poren der Membran zu migrieren, wurden nach der Methode von Sasaki und Passaniti (1998) bestimmt. Hierzu wurde ein modifizierter MTT-Konversionstest verwendet, um lebende Zellen im unteren Kompartiment durch Assimilation des Tetrazoliumsalses zu quantifizieren. Zuerst entfernte man das Medium im Einsatz und in der unteren Kammer. Danach pipettierte man 250 µl Medium mit 0,5 mg/ml MTT-Lösung in die obere Kammer bzw. 500 µl in die untere Kammer. Nach einer Inkubation für 4 h bei 37°C wurden die gebildeten Formazan-Kristalle durch Zugabe von gleichen Volumina an Solubilisierungslösung über Nacht bei 37°C gelöst. Von der Lösung überführte man am nächsten Tag ein Aliquot von 100 µl in eine 96-Lochplatte und bestimmte die Absorption bei 550 nm (A_{550} , Referenzwellenlänge: 690 nm) mit einem Plattenlesegerät unter Verwendung eines „Spectra Rainbow“-Filters.

Der Prozentsatz der migrierten oder invadierten Zellen wurde im Verhältnis zu dem jeweiligen Referenzansatz (= Zellen in beiden Kammern) nach der Gleichung 2.3 ermittelt.

Gleichung 2.3:

$$\% \text{ Invasion oder } \% \text{ Migration} = A_{550} (\text{untere Kammer}) \times 100 / A_{550} (\text{obere+untere Kammer})$$

-Solubilisierungslösung: 10% SDS in 0,01 M HCl

2.2.2 Histologische und immunhistochemische Analysen

2.2.2.1 Herstellung von „künstlichen Geweben“ aus kultivierten Einzelzellen

Die „künstlichen Gewebe“ aus kultivierten Einzelzellen wurden nach der Methode von Cottler-Fox und Fox (1991) hergestellt. Dazu wurden als erstes circa 1×10^8 -Zellen in PBS für 2 min bei 300 x g abzentrifugiert. Den Überstand saugte man ab und resuspendierte das Zellsediment gründlich in 500 µl humanem Plasma. Die Vernetzung des Plasmas mit den Zellen erfolgte durch unmittelbare Zugabe von 250 Einheiten Thrombin in 100 µl. Es entstand ein harter Klumpen der nach 5 min in 12 ml gepufferter 3,8%iger Formaldehydlösung aufgenommen wurde. Die Penetration im Fixativ erfolgte über Nacht unter Drehen an einem Rotor.

2.2.2.2 Fixierung der „künstlichen Gewebe“ und Herstellung von Paraffinschnitten

Der Plasma/Thrombin-Zellklumpen (siehe Kapitel 2.2.2.1) wurde mit einem Skalpell in 2–3 mm dicke Stücke geschnitten und in einem Gewebe-Einbettautomaten weiter behandelt. Dort durchliefen sie einen Entwässerungsvorgang und wurden über Xylol in Paraffin überführt. Das verwendete Programm beinhaltet mehrere Schritte, die in Tabelle 2.1 aufgelistet sind.

Reagenz	Temperatur	Immersion [h]	Reagenz	Temperatur	Immersion [h]
H ₂ O fließend	RT	2,0	100% Ethanol	RT	1,5
70% Ethanol	RT	1,5	Xylol	RT	1,5
70% Ethanol	RT	1,5	Xylol	RT	1,5
70% Ethanol	RT	1,5	Xylol	RT	1,5
95% Ethanol	RT	1,5	Paraffin	60°C	2,0
95% Ethanol	RT	1,5	Paraffin	60°C	2,0
100% Ethanol	RT	1,5			

Tabelle 2.1: Programm des Gewebe-Einbettautomaten.

Im Anschluss daran wurden die Zellklumpen an einer Ausbettstation in Paraffinblöcke eingebettet. Von den in Paraffin eingebetteten dicht beieinander liegenden Zellen wurden mit einem Schlittenmikrotom 2-4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf SuperfrostPlus-OT aufgezogen. Diese wurden über Nacht bei 37°C getrocknet und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2.3 Doppelfärbung mit Hämatoxylin-Eosin

Bei der Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung handelt es sich um eine Kern-Plasma-Färbung für die Routineuntersuchung von histologischen Schnitten. Die Zellkerne färben sich blauschwarz bis violett, zytoplasmatische Bestandteile rosa bis rot. Erythrozyten weisen eine charakteristische ziegelrote Farbe auf.

Vor der Färbung mussten die histologischen Schnitte entparaffiniert und rehydriert werden. Dazu wurden die Schnitte in spezielle Färbeständer einsortiert und nach dem Protokoll in Tabelle 2.2 A durch die in Glasküvetten gefüllten Lösungen geführt.

Lösungsmittel	Inkubationszeit
Xylol	5 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min
100% Ethanol	3 min
100% Ethanol	3 min
90% Ethanol	3 min
80% Ethanol	3 min
70% Ethanol	3 min
70% Ethanol	3 min
Aqua dest.	3 min
Aqua dest.	3 min

Tabelle 2.2 A: Deparaffinierung und Rehydrierung von Gewebeschnitten.

Lösungsmittel	Inkubationszeit
70% Ethanol	10 s
80% Ethanol	1 min
90% Ethanol	1 min
100% Ethanol	1 min
100% Ethanol	1 min
Xylol	3 min
Xylol	3 min
Xylol	3 min

Tabelle 2.2 B: Dehydrierung von Gewebeschnitten.

Nun erfolgte die Färbung:

Hämalaun nach Mayer	20 min
H ₂ O fließend	15 min „bläuen“ unter fließendem Leitungswasser
Aqua dest.	kurz
Eosin	30 s
Aqua dest.	kurz

Die Schnitte dehydrierte man anschließend in einer Alkoholreihe mit steigender Ethanolkonzentration nach dem Protokoll in Tabelle 2.2 B. Nun konnten die Schnitte maschinell am Eindeckautomat eingedeckt und unter dem Mikroskop betrachtet werden.

-1% Eosin-Lösung: 10 g Eosin in 1000 ml Aqua dest. lösen, vor Gebrauch 0,3 ml Eisessig zu 200 ml Eosin geben

-Hämalaunlösung: 1,0 g Zitronensäure, 1,0 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumjodat, 50 g Aluminiumkaliumsulfat, 50 g Chloralhydrat, ad 1000 ml Aqua dest.

2.2.2.4 Immunhistologischer Nachweis von Trop-2

Zur Optimierung der einzelnen Bedingungen für die Immunhistologie (z.B. Demaskierung, Antikörperkonzentrationen) konnten die „künstlichen Gewebe“ aus Zelllinien verwendet werden (siehe Kapitel 2.2.2.1 und 2.2.2.2).

Die paraffinierten Leerschnitte auf SuperfrostPlus-OT mussten zunächst für 1 h bei 58°C getrocknet werden. Danach wurden sie für 3 x 5 min in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanol-Reihe rehydriert (siehe Kapitel 2.2.2.3, Tabelle 2.2 A). Anschließend wurden die OT für 3 min in PBS gewaschen.

Die Maskierung der Antigene hobte man durch Kochen der Schnitte für 20 min in einem basischen 1x „Antigen-Retrieval“-Puffer (AR-10) im Dampfgerar auf. Danach ließ man den AR-10-Puffer mit den Schnitten bei RT auf 64°C abkühlen und stellte die OT für 2 x 5 min in PBS. Nun wurden die Schnitte zur Blockierung von endogenen Peroxidasen für 5 min bei RT mit einer 3%igen Wasserstoffperoxidlösung in PBS inkubiert und anschließend für 2 x 3 min in PBS gewaschen. Daraufhin begrenzte man das Gewebeareal auf den OT mit einem speziellen Fettstift, um bei den folgenden Schritten ein Abfließen der aufgetragenen Lösungen zu vermeiden. Durch Inkubation für 30 min bei RT mit Blockierungslösung in einer feuchten Kammer wurden unspezifische Bindungen blockiert. Nach der Blockierung wurden die Gewebeschnitte mit dem primären Trop-2-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate 2 x für 3 min in PBST-Puffer gewaschen und mit einem 1:100 verdünnten biotinylierten sekundärem Antikörper bei RT für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift für 2 x 3 min mit PBST-Puffer inkubierte man die Schnitte für 15 min mit einer Lösung aus Meerrettich-Peroxidase- (HRP)-konjugiertem Streptavidin bei RT in der feuchten Kammer. Es schloss sich ein erneuter Waschschrift mit PBST (3 x 1 min bei RT) an. Durch Zugabe von einem Tropfen DAB (gelöst in HRP-Substratpuffer) auf den Gewebeschnitt entwickelte man die Farbreaktion. Hierbei fällt das Enzym Peroxidase unter Zusatz des Elektronendonors H_2O_2 das Chromogen DAB (3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochlorid) zu einem braunen Farbniederschlag aus. Die Farbreaktion wurde nach 20 s mit destilliertem Wasser abgestoppt. Anschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin für 30 s gegengefärbt und für 2 min mit Leitungswasser gespült. Danach wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe Kapitel 2.2.2.3, Tabelle 2.2 B) dehydriert, für 2 x 3 min in Xylol inkubiert und mittels eines Eindeckautomaten mit Folie bedeckt. Die immunhistochemisch gefärbten Schnitten wurden an einem Zeiss-Mikroskop (Axioscop) mit einer integrierten Kamera (opto-electronics, Gleichen) aufgenommen und unter Verwendung der Software Kappa Image-Base Control DX30 des Kameraherstellers visualisiert.

-1x PBST-Puffer: 1x PBS-Puffer + 0,05% Tween-20

-Blockierungslösung: 1x PBS-Puffer, 1% BSA, 2% Kaninchenserum

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Methoden zur RNA-Analyse

2.2.3.1.1 Arbeiten mit RNA

Bei allen Arbeiten mit RNA wurde Dimethyldicarbonat-behandeltes Wasser verwendet. Hierzu wurde 0,1% Velcorin E242 zu doppelt-destilliertem Wasser pipettiert, für eine Stunde gerührt und anschließend autoklaviert. Alle Komponenten, die mit RNA in Berührung kommen konnten, behandelte man vorher für 10 min mit RNaseZap, ebenso wurden stets spezielle RNase-freie Reaktionsgefäße verwendet.

2.2.3.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte entweder direkt aus Zellen in der Zellkulturschale oder aus tiefgefrorenen Zellsedimenten (siehe Kapitel 2.2.1.4) nach der RNeasy Methode der Firma Qiagen.

Für die direkte Lyse von subkonfluenten Zellen in 6-Loch-Zellkulturplatten (ca. 1×10^6 -Zellen) wurden die Zellen einmal mit PBS-Puffer gewaschen und in 350 μ l Guanidium-Isothiocyanat-haltigem Lysepuffer mit 3,5 μ l β -Mercaptoethanol für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Homogenisierung der Probe erfolgte mittels Zentrifugation bei 14000 x g in einer QIAshredder-Säule. Die Zellsedimente wurden nach Zugabe von 350 μ l Lysepuffer mit 3,5 μ l β -Mercaptoethanol mit einem Stabrotor für 2 min mechanisch homogenisiert.

Nach Zugabe des gleichen Volumens an 70%igem Ethanol zu der homogenisierten Probe wurde die RNA in Gegenwart eines Puffersystems mit einer hohen Konzentration an chaotropen Salzen in einer Mini-Säule an eine Silica-Gelmatrix gebunden. Die an die Matrix gebundene RNA wurde nach den Angaben des Herstellers mehrfach gewaschen und in 20-40 μ l Wasser eluiert. Eine Quantitäts- und Qualitätsabschätzung der isolierten RNA erfolgte am Spektralphotometer (siehe Kapitel 2.2.3.1.6).

2.2.3.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Geweben

Ein jeweils 50-100 mg schweres Gewebestück trennte man mit einem Skalpell von einem tiefgefrorenen Gewebestück ab und überführte es in ein „FastRNA tube green“ Reaktionsgefäß, das mit Keramikugeln gefüllt war. Das Gewebe wurde mit 1 ml Phenol-Reagenz (TriPure) versetzt und für 30 s an einem Homogenisator lysiert und homogenisiert. Die erhitze Probe kühlte man für 10 s auf Eis, versetzte sie mit 200 μ l Chloroform und mischte für 5 s am Homogenisator. Daraufhin wurde für 5 min auf Eis gekühlt und für 15 min bei 12000 x g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500 μ l Isopropanol in einem neuen Reaktionsgefäß für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (15 min,

12000 x g, 4°C). Dann wurde das Sediment einmal mit 75%igem Ethanol gewaschen und bei 7500 x g für 5 min (4°C) zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes ließ man die isolierte RNA an der Luft trocknen und resuspendierte in 100 µl Wasser bei 55°C für 10 min. Anschließend wurde die RNA mit RNeasy Mini-Rotationssäulen der Firma Qiagen weiter aufgereinigt (siehe Kapitel 2.2.3.1.2).

2.2.3.1.4 Isolierung von RNA aus Paraffinschnitten

Zur Isolierung der RNA mussten die auf OT aufgezogenen Gewebeschnitte zuerst deparaffiniert werden. Hierzu wurden die OT für 10 min in ein Xylolbad gestellt und anschließend für 2 x 10 min in absolutem Ethanol inkubiert. Mit einem sterilen Skalpell kratzte man die deparaffinierten Proben von der Oberfläche ab, überführte sie in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß und ließ das Gewebe für 10 min bei 55°C trocknen.

Die RNA-Isolierung aus den Geweben erfolgte im wesentlichen nach der High Pure RNA Paraffin Methode der Firma Roche. Hierzu wurden die Gewebeproben während einer Inkubation über Nacht in 800 µg Proteinase K/1,6% SDS homogenisiert und die Ribonukleinsäuren in Gegenwart von chaotropem Salz an die Oberfläche von Glasfasern gebunden. Die gebundene RNA wurde dann in einer Serie von Waschschritten von zellulären Komponenten gereinigt und schließlich vom Glasfaservlies eluiert. Eine anschließende Behandlung für 45 min mit 5 Einheiten DNase I und eine zweite Proteinase K-Inkubation verbesserten die Qualität der erhaltenen RNA, die dann nochmals in einer Glasfasersäule gewaschen und mit einer Nidrigsalzlösung eluiert wurde. Die vereinigte RNA von jeweils drei Paraffinschnitten eines Gewebes wurde am Spektralphotometer quantifiziert und der Größenbereich der stark fragmentierten RNA in einem denaturierenden Agarosegel überprüft (siehe Kapitel 2.2.3.1.9). Eine abschließende Überprüfung der RNA-Qualität erfolgte mit dem LightCycler h-G6PDH DNA Housekeeping Gene Set in Kombination mit dem LightCycler DNA Master Hybridization Probes Kit der Firma Roche (siehe Kapitel 2.2.3.2.1.4.4).

2.2.3.1.5 Isolierung von Poly(A)-mRNA

Die Isolierung von Poly(A)-mRNA aus Gesamt-RNA erfolgt mit der Oligotex mRNA Methode der Firma Qiagen.

Zuerst wurden 250 µg isolierte Gesamt-RNA in einem Reaktionsgefäß mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 250 µl gebracht. Nach Zugabe von 250 µl Hochsalz-Bindungspuffer wurden RNA-Sekundärstrukturen durch eine Inkubation für 3 min bei 70°C zerstört und die RNA anschließend für 10 min bei RT an 15 µl Oligotexsuspension hybridisiert. Die Suspension enthält Oligotexpartikel aus Polystyrol/Latex, an deren Oberfläche dC₁₀T₃₀-

Oligonukleotide kovalent gebunden sind. Die an die Oligotexpartikel gebundene Poly(A)-mRNA wurde als Komplex für 2 min bei 14000 x g sedimentiert und nach Herstellerangaben in einer Rotationssäule gewaschen. Mit 70 µl eines bei 70°C vorgewärmten Eluierungspuffer mit niedrigem Salzgehalt löste man die Poly(A)-mRNA von den Oligotexpartikeln und zentrifugierte sie mit einer Rotationssäule ab. Die Konzentrationsbestimmung des Eluats erfolgte spektralphotometrisch. Durchschnittlich konnten circa 1% Poly(A)-mRNA aus der eingesetzten Gesamt-RNA erhalten werden. Die Reinheit der isolierten Poly(A)-mRNA wurde elektrophoretisch mit einem 1%igen FA-Agarosegel untersucht (siehe Kapitel 2.2.3.1.9).

2.2.3.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in einer Probe wurde durch Messen der Absorption bei 260 nm (A_{260}) am Spektralphotometer bestimmt. Man wählte hierzu stets eine entsprechende Probenverdünnung in Wasser, bei der ein A_{260} Wert zwischen 0,1 und 1,0 erreicht wurde. Die Bestimmung der Konzentration einer RNA-Probe $C_{(RNA)}$ erfolgte nach der Kalkulation in Gleichung 2.4.

Gleichung 2.4: $C_{(RNA)} = 40 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Der Faktor 40 ergibt sich aus der Tatsache, dass 40 µg RNA bei 260 nm eine Absorption von 1 zeigen. Bei DNA-Messungen beträgt der Faktor 50 ($A_{260} = 1$ entspricht 40 µg/ml RNA bzw. 50 µg/ml DNA in Wasser).

Die Reinheit der gemessenen Nukleinsäuren wurde durch das Verhältnis von A_{260} zu A_{280} abgeschätzt, da Verunreinigungen durch Proteine in der Probe bei 280 nm ein Absorptionsmaximum aufweisen. Eine Probe mit einem Verhältnis $A_{260} : A_{280} < 1,5$ musste entweder noch mit Proteinase nachbehandelt werden oder wurde verworfen.

2.2.3.1.7 Entfernung von DNA-Verunreinigungen aus RNA-Isolierungen

Zur Quantifizierung von RNA-Transkripten mit der LightCycler Technik (siehe Kapitel 2.2.3.2.1.4.3.1) war es erforderlich, noch vorhandene Verunreinigungen durch genomische DNA vollständig zu entfernen. Hierzu wurde die DNA-free Methode der Firma Ambion verwendet. Man inkubierte jeweils 10 µg RNA mit 0,1 Volumen von 10x DNase I-Puffer und 2 Einheiten DNase I für 30 min bei 37°C. Dann wurde mit 0,1 Volumen DNase-Inaktivierungsreagenz für 2 min bei RT inkubiert und das Inaktivierungsreagenz bei 10000 x g abzentrifugiert.

-10x DNase I-Puffer: 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 25 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂

2.2.3.1.8 Analyse von Oligonukleotid-Mikroarrays (GeneChip®)

2.2.3.1.8.1 Herstellung von Biotin-markierter cRNA

2.2.3.1.8.1.1 Erststrangsynthese von cDNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus tiefgefrorenen Zellsedimenten ist unter 2.2.3.1.2 beschrieben. Zur Erststrangsynthese wurde ein Ansatz mit 20 µg gesamtzellulärer RNA und 200 pmol eines T7-(T)₂₄ Primers, der eine T7 RNA-Polymerase-Promotor-Sequenz enthält, mit Wasser auf 23 µl aufgefüllt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Dann gab man auf Eis 8 µl 5x RT-Puffer, 4 µl 0,1 M DTT, 25 Einheiten RNase Inhibitor und je 500 µM dNTP dazu und temperierte für zwei Minuten auf 42°C vor. Nach Zugabe von 600 Einheiten Reverse Transkriptase (Superscript II) wurde die reverse Transkription in 40 µl Gesamtvolumen für 1 h bei 42°C durchgeführt.

-5x RT-Puffer: 250 mM Tris-Acetat (pH 8,4), 375 mM Kaliumacetat, 40 mM Magnesiumacetat

2.2.3.1.8.1.2 Synthese des zweiten cDNA-Strangs und Aufreinigung der cDNA

Auf Eis wurden zum gesamten Reaktionsansatz der Erststrangsynthese 30 µl 5x Zweitstrang-Synthesepuffer, je 200 µM dNTP, 10 Einheiten *E. coli* DNA-Ligase, 40 Einheiten *E. coli* DNA-Polymerase I und 2 Einheiten RNase H gegeben und das Volumen mit Wasser auf 150 µl eingestellt. Nach einer Inkubation für 2 h bei 16°C pipettierte man 10 Einheiten T4-DNA Polymerase zu und stoppte die Reaktion nach einer weiteren Inkubation für 5 min bei 16°C mit 10 µl 0,5 M EDTA. Die verbliebene RNA wurde mit 15 Einheiten RNase A für 30 min bei 37°C entfernt. Es folgte eine Behandlung mit 76 µg Proteinase K in 2 µl SDS (10%) für 30 min bei 37°C. Die cDNA-Aufreinigung erfolgte durch eine Phenol-Chloroform Extraktion in Phase Lock Gel-Reaktionsgefäßen. Die anschließende DNA-Fällung von 250 µl der wässrigen Phase wurde mit 125 µl 7,5 M Ammoniumacetat und mit 940 µl Ethanol bei -20°C für 16 h durchgeführt. Die gefällte DNA zentrifugierte man bei 14000 x g für 20 min ab. Dann wurde 2 x mit 80%igem Ethanol und 1 x mit 100%igem Ethanol gewaschen und man ließ nach Abnahme des Überstands die cDNA an der Luft trocknen.

-5x Zweitstrang-Synthesepuffer: 125 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 50 mM (NH₄)₂SO₄, 0,75 mM β-Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (β-NAD)

2.2.3.1.8.1.3 IVT und Fragmentierung der biotinylierten cRNA

Zuerst wurde die präzipitierte cDNA eines Ansatzes (ca. 0,2-0,4 µg cDNA) in 1,5 µl Wasser gelöst. Dann wurde die *in vitro*-Transkription (IVT) mit dem MEGAscript T7 Kit der Firma Ambion in Gegenwart von biotinyliertem (Biotin-16-) UTP und biotinyliertem (Biotin-11-) CTP nach Herstellerangaben durchgeführt. Eine Aufreinigung der markierten

cRNA erfolgte über Rotationssäulen des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen (siehe Kapitel 2.2.3.1.2). Nach einer Konzentrationsbestimmung am Spektralphotometer (siehe Kapitel 2.2.3.1.6) wurden 20 µg der biotinylierten cRNA in 8 µl 5x Fragmentierungspuffer in einem Volumen von 40 µl für 35 min bei 94°C fragmentiert. Die fragmentierte cRNA (≈ 35-200 Basenpaare lang) konnte entweder bei -20°C gelagert oder sofort in eine Hybridisierung eingesetzt werden.

-5x Fragmentierungspuffer: 200 mM Tris-Acetat (pH 8,1), 500 mM Kaliumacetat, 150 mM Magnesiumacetat

2.2.3.1.8.2 Hybridisierung und Waschen der Genchips

15 µg fragmentierte cRNA wurde mit 162 µl Hybridisierungslösung vermischt und mit Wasser auf ein Volumen von 300 µl gebracht. Dieser Hybridisierungscocktail konnte anschließend bei -20°C gelagert oder gleich für die Hybridisierung eines Oligonukleotid-Mikroarrays verwendet werden. Hierzu wurde der Hybridisierungscocktail für 5 min bei 99°C denaturiert, anschließend für 5 min bei 45°C vortemperiert und unlösliche Bestandteile für 5 min bei 14000 x g abzentrifugiert. Dann pipettierte man ein 80 µl Aliquot des Hybridisierungscocktails zum Qualitätstest in einen GeneChip® Test2-Chip und inkubierte für 16 h bei 45°C unter Rotation. Erfüllte der Hybridisierungscocktail die erforderlichen Qualitätskriterien (siehe Kapitel 2.2.3.1.8.3), wurde ein weiteres Aliquot von 200 µl in die entsprechenden Oligonukleotid-Chips HG-U95Av2 oder HG-U95B-E gefüllt (siehe Kapitel 2.2.3.1.8.4). Nach der Hybridisierung wurden die Chips in einer Waschstation gemäß Herstellerangaben computergesteuert mit nicht-stringenten und stringenten Puffern gewaschen. Zur Detektion und Verstärkung der Fluoreszenzsignale behandelte man die Chips mit drei Antikörperlösungen (1-3). Zwischen den Antikörperbehandlungen und am Ende des Programmes wurden die Chips jeweils mit nicht-stringentem und stringentem Puffer gewaschen.

Biotin-markierte Kontroll-cRNA I-IV (*bioB*, *bioC*, *bioD* und *Cre*) und ein antisense Kontroll-Oligonukleotid B2 wurden freundlicherweise von Frau Bär (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) zur Verfügung gestellt. *bioB*, *bioC* und *bioD* sind Gene, die in der Biotinsynthese von *E. coli* involviert sind. *Cre* kodiert für das Rekombinase-Protein des Bakteriophagen P1. Die Kontroll-cRNA dienen in unterschiedlichen Konzentrationen als Hybridisierungsstandards zur Abschätzung der Expressionshöhe von RNA-Transkripten in der Probe und konnten zur Normalisierung der Expressionshöhe verschiedener Experimente während der Software-Analyse verwendet werden. Das Kontroll-Oligonukleotid B2 hybridisierte an den Rand der Chips und an eine kreuzförmige Markierung innerhalb des Chips und diente somit zur genauen Ausrichtung eines Gitters bei der Chip-Auswertung.

<u>-Hybridisierungslösung:</u>	Kontroll-cRNA I-IV (1,5, 5, 25 und 100 pM), 50 pM Kontroll-Oligonukleotide, 100 µg/ml fragmentierte Heringsperma-DNA, 500 µg/ml acetyliertes BSA, 50 mM MES, 0,5 M NaCl, 10 mM EDTA, 0,005% Tween-20
<u>-Hybridisierungscocktail:</u>	Hybridisierungslösung mit 50 ng/µl fragmentierter cRNA
<u>-Stringenter Waschlösung:</u>	100 mM MES, 100 mM NaCl, 0,01% Tween-20
<u>-Nicht-stringenter Waschlösung:</u>	0,9 M NaCl, 60 mM NaH ₂ PO ₄ , 6 mM EDTA, 0,005% Anti-foam O-30, 0,01% Tween-20
<u>-Antikörperlösung 1:</u>	10 µg/ml rekombinantes Streptavidin in 600 µl Färbepuffer mit 2 µg/µl acetyliertem BSA
<u>-Antikörperlösung 2:</u>	0,1 mg/ml Ziegen-IgG, 3 µg/ml biotinylierter Ziegen anti-streptavidin IgG in 600 µl Färbepuffer mit 2 µg/µl acetyliertem BSA
<u>-Antikörperlösung 3:</u>	10 µg/ml Streptavidin-Phycoerythrin in 600 µl Färbepuffer mit 2 µg/µl acetyliertem BSA
<u>-Färbepuffer:</u>	100 mM MES, 1 M NaCl, 0,05% Tween-20, 0,005% Anti-foam O-30

2.2.3.1.8.3 Bestimmung der cRNA-Qualität

Die Qualität der hybridisierten cRNA wurde mit Oligonukleotiden für eine 5′-, mittlere-, oder 3′-Sequenz von β-Aktin (ACTB) und der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPD) bestimmt, die auf die Genchips synthetisiert sind. cRNA-Ansätze mit einem 3′-/5′-Verhältnis von < 3 wurden als qualitativ ausreichend angesehen. Diese Qualitätskontrolle wurde jeweils zuerst auf speziellen kostengünstigeren Testchips (Test2-Chips) durchgeführt. Bei einem ausreichend guten 3′-/5′-Verhältnis für ACTB und GAPD konnten mit einem zweiten Aliquot der Hybridisierungscocktails anschließend die HG-U95-Arrays hybridisiert werden. Auf denen befinden sich zusätzlich auch die Oligosequenzen der erwähnten Kontrollgene.

2.2.3.1.8.4 Beschreibung der verwendeten Genchips

Zur Genexpressionsanalyse wurde das aus 5 Arrays bestehende Set HG-U95Av2-E verwendet. Die patentierten Arrays (GeneChip®) der Firma Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) werden im weiteren vereinfacht als Genchips bezeichnet. Das HG-U95-Set repräsentiert auf dem HG-U95Av2 (Version 2)-Chip 12652 Sequenzen von zumeist Genen deren volle Länge bekannt ist und von denen entweder bereits Funktionen oder Assoziationen mit Krankheiten beschrieben sind. Die Chips HG-U95B, C, D und E enthalten primär Oligonukleotide aus circa 50000 Clustern von exprimierten sequenzmarkierten Stellen (EST). Insgesamt repräsentiert das HG-U95-Set also mehr als 60000 Gene oder EST-Cluster, die allesamt aus dem „Build 95“-Archiv der UniGene-Datenbank entnommen sind. Die in UniGene „Build 95“ dokumentierten Sequenzen stammen entweder aus der GenBank 113 oder von der Datenbank dbEST/10-02-99.

2.2.3.1.8.5 Aufbau der Genchips

Etwa 10^7 -Kopien eines Oligonukleotids von durchschnittlich 25 Basenpaaren Länge werden auf eine Fläche von $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ mittels Photolithographie und kombinatorischer Chemie direkt auf eine Glasplatte synthetisiert (Pease *et al.*, 1994). Diese Fläche wird als Probenzelle bezeichnet. Die Sequenz eines 25mer Oligonukleotids entspricht exakt der Sequenz einer cDNA und wird mit „**Perfect Match**“ (PM) bezeichnet. Ein zweites auf die Platte synthetisiertes Oligonukleotid mit der gleichen Sequenz, aber einem homomeren Basenaustausch in der zentralen 13. Position wird als „**MisMatch**“ (MM) bezeichnet und dient als eine Kontrolle für mögliche Kreuzhybridisierungen. Ein **Probenpaar** (PP) besteht aus einer PM- und einer MM-Probenzelle, wobei auf dem Chip jeweils die PM-Probenzelle direkt über der MM-Probenzelle liegt. Um ein Transkript detektieren zu können, sind jeweils 16-20 Probenpaare auf dem Chip angeordnet. Diese 16-20 verschiedenen Sequenzen einer cDNA werden zusammen als **Probenstet** (PS) bezeichnet (Abb. 2.1).

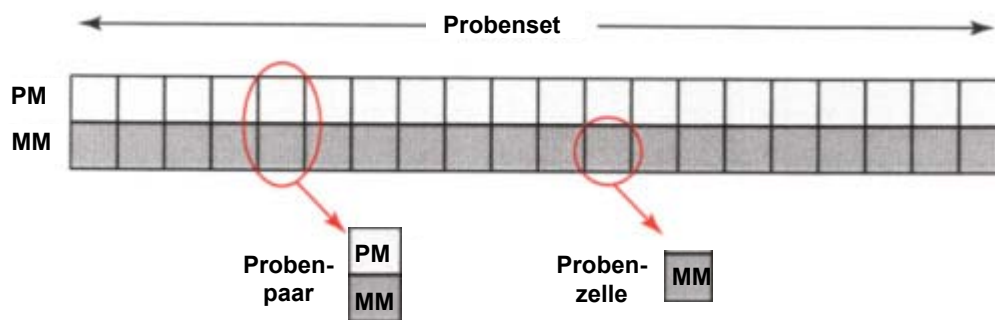


Abbildung 2.1: Anordnung von 20 Oligonukleotiden auf dem Chip, die einer cDNA aus den Datenbanken entsprechen.

PM = sequenzspezifische „Perfect Match“-Probenzelle, MM = „MisMatch“-Kontrollprobenzelle.

2.2.3.1.8.6 Scannen der Genchips

Das Scannen der Chips erfolgte mit einem HP G2500A GeneArray-Scanner der Firma Affymetrix. Der Chip wurde dabei von dem Argon-Ionen Laser mit einer Auflösung von $3 \mu\text{m}/\text{Pixel}$ gescannt. Somit wurden also circa 64 Pixel/Probenzelle berechnet.

2.2.3.1.8.7 Algorithmen zur Auswertung der Genchips

2.2.3.1.8.7.1 Die absolute Analyse von einzelnen Genchips

Die Auswertung wurde mit den Programmen Microarray Suite 4.0, GeneChip[®] Data Mining Tool 2.0, GeneChip[®] LIMS Manager 1.5 (alle von der Firma Affymetrix) und Roche Affymetrix Chip Experiment–Analysis 2.0.0 (RACE-A) durchgeführt.

Da die Pixel auf der Fläche nicht gleichmäßig verteilt sind, beginnt die Analyse mit der Kalkulation einer **durchschnittlichen Intensität** (AvgInt) für jede Probenzelle. Damit werden Probenzellen untereinander rechnerisch vergleichbar. Dann wird der **Hintergrund** kalkuliert und von den Intensitäten aller Probenzellen abgezogen. Hintergrundintensitäten entstehen durch unspezifische SAPE-Bindung an die Chipmatrix und durch Auto-fluoreszenz der Chipoberfläche. Als **Rauschen** bezeichnet man kleine Variationen in dem digitalisierten Signal, die entstehen können, wenn der Scanner die Chipoberfläche abtastet. Das Rauschen wird ermittelt, indem man den Grad der Abweichungen von Pixel zu Pixel innerhalb einer Probenzelle kalkuliert. Das Rauschen ist eines der Kriterien für die Signifikanz von Intensitätsunterschieden zwischen „Perfect Match“-Probenzellen und ihren „MisMatch“-Kontrollen. Als nächstes wird die Anzahl von positiven und negativen Probenpaaren für jedes Probenset bestimmt. Man definiert ein Probenpaar als positiv, wenn die Intensität der sequenzspezifischen (PM-) Probenzelle signifikant höher ist als die Intensität der Kontroll-(MM-) Probenzelle. Entsprechend definiert sich ein negatives Probenpaar, wenn die Intensität der MM-Probenzelle signifikant höher ist als die Intensität der PM-Probenzelle. Die Anzahl von positiven und negativen Probenpaaren wird verwendet, um die Hybridisierungseffizienz von jedem Probenset zu beschreiben. Diese wird ausgedrückt durch die **positive Fraktion** und die „**Positiv/Negativ Ratio**“ (Pos/Neg Ratio). Die positive Fraktion ist ein Maß des Anteils von Probenpaaren bei denen die PM-Probenzellen mit einem spezifischen Transkript mehr hybridisiert haben als die korrespondierende MM-Kontrolle. Das Verhältnis von positiven Probenpaaren zu negativen Probenpaaren in einem Probenset wird dann durch die Pos/Neg Ratio dargestellt.

Zwei weitere wichtige Algorithmen kalkulieren die „**Log Average Ratio**“ und die „**Average Difference**“ (AvgDiff). Die AvgDiff für jedes Probenset ist ein Durchschnitt der Unterschiede zwischen jeder PM-Probenzelle und seiner Kontroll-MM-Probenzelle und dient als Maß für die Abundanz einer RNA in der Probe. Die AvgDiff kann somit verwendet werden um die Expressionsänderung eines bestimmten Gens zwischen zwei Experimenten nach Gleichung 2.5 zu bestimmen.

Gleichung 2.5:
$$\text{AvgDiff} = \frac{\sum \text{PM} - \text{MM}}{\text{Anzahl der Probenpaare}}$$

Abschließend wird eine „Entscheidungsmatrix“ zur Bestimmung von Anwesenheit oder Abwesenheit jedes Transkripts verwendet – dem „**Absolute Call**“. Dies wird erreicht durch die Untersuchung von drei der Analysen-Algorithmen: der positiven Fraktion, der Pos/Neg Ratio und der Log Average Ratio. Der „Absolute Call“ wird ausgedrückt durch die Bezeichnungen „Vorhanden“, „Marginal“ oder „Fehlend“.

2.2.3.1.8.7.2 Vergleichende Analyse zwischen mehreren Genchip-Experimenten

Die vergleichende Analyse beginnt damit, dass eine absolute Analyse eines Chip-Experiments als **Basislinie** („Base“) bestimmt wird. Ein anderer mit diesen Basisdaten zu vergleichender Chip wird als **experimenteller Chip** („Exp“) bezeichnet. Um diese zwei Chips miteinander vergleichen zu können, müssen zuerst die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten der Chips einander angeglichen werden (**Normalisierung**). Diese unterschiedlichen Intensitäten können durch Abweichungen in der Menge und der Qualität der hybridisierten cRNA entstehen. Eine andere Quelle für diese Unterschiede sind leichte Pipettiervariationen bei den Färbelösungen, sowie weitere experimentelle Faktoren. In den Experimenten wurde die globale Normalisierung eingesetzt. Hierbei werden die Werte des experimentellen Chips mit einem **Normalisierungsfaktor** (NF) multipliziert, um seine durchschnittliche Intensität dem Basislinien-Chip anzupassen. Die durchschnittliche Intensität eines Chips wird berechnet aus dem Durchschnitt der AvgDiff Werte aller Probensets auf einem Chip, wobei die niedrigsten und höchsten 2% der Werte abgezogen werden. Bei der vergleichenden Analyse werden ebenfalls zuerst die Absolutwerte des zu vergleichenden Chips bestimmt. Daraufhin werden Vergleichsalgorithmen eingesetzt, die im wesentlichen zu einer „Entscheidungsmatrix“ führen – dem **„Difference Call“**. Dieser zeigt an ob ein Probenset gegenüber dem gleichen Probenset auf der Basislinie induziert bzw. reprimiert ist oder keinen Unterschied zeigt. Zusätzlich erhält man eine **„Change Factor“**- (CF-) Kalkulation als Indikator für eine relative Veränderung jedes Transkripts, das auf dem Chip repräsentiert ist. Zur Berechnung ist der **„Average Difference Change“** (AvgDiff Chg) entscheidend, der zuerst nach Gleichung 2.6 als der Unterschied aller AvgDiff von Chip 1 („Exp“) und Chip 2 („Base“) berechnet wird.

Gleichung 2.6: **AvgDiff Chg** = $\text{AvgDiff}_{\text{Exp}} - \text{AvgDiff}_{\text{Base}}$

Die Berechnung des „Change Factor“ (CF) ist in Gleichung 2.7 gezeigt.

Gleichung 2.7:

$$\text{CF} = \frac{\text{AvgDiff Chg}}{\max[\min(\text{AvgDiff}_{\text{Exp}}, \text{AvgDiff}_{\text{Base}}), 2,8 \times \max(\text{Q}_{\text{Exp}}, \text{Q}_{\text{Base}})]}$$

Der CF hängt also von den Beträgen der AvgDiff-Werte und dem Rauschen (siehe Kapitel 2.2.3.1.8.7.1) ab. Ist beispielsweise der Wert von $\text{AvgDiff}_{\text{Base}}$ kleiner als $\text{AvgDiff}_{\text{Exp}}$, aber größer als $2,8 Q$, dann vereinfacht sich die Berechnung zu Gleichung 2.8.

Gleichung 2.8:
$$CF = \left(\frac{\text{AvgDiff}_{\text{Exp}}}{\text{AvgDiff}_{\text{Base}}} \right)$$

Die statistische Relevanz des CF wird letztendlich von der „**Change Factor Quality**“ (CFQ) bestimmt. In der Arbeit wurde eine CFQ von ≥ 1 gewählt, was bedeutet, dass sich die Standardabweichungen von $\text{AvgDiff}_{\text{Base}}$ und $\text{AvgDiff}_{\text{Exp}}$ nicht überlappen. In Abbildung 2.2 ist dies für induzierte Gene im experimentellen Chip im Vergleich zum Basislinien-Chip dargestellt.

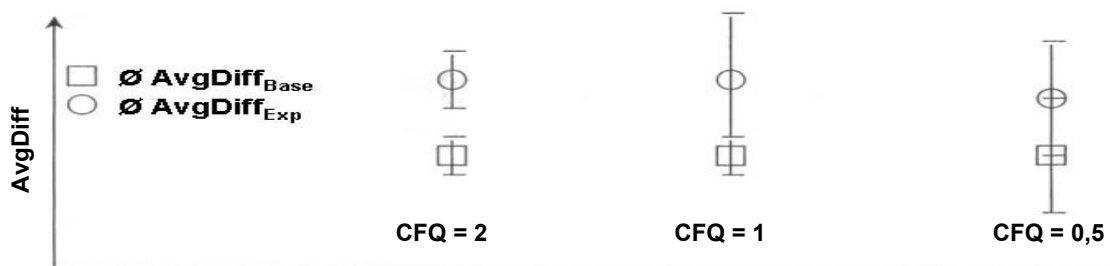


Abbildung 2.2: Darstellung der „Change Factor Quality“ von 2, 1 und 0,5.

Als Quadrat ist exemplarisch der Mittelwert von mehreren AvgDiff -Bestimmungen für ein Gen mit den entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. Dieser Wert wurde als Basislinie ($\text{Ø AvgDiff}_{\text{Base}}$) definiert. Der durchschnittliche AvgDiff -Wert eines Gens auf den zu vergleichenden experimentellen Chips ($\text{Ø AvgDiff}_{\text{Exp}}$) ist als Kreis dargestellt. Bei einer CFQ von > 1 ist keine Überlappung der Standardabweichungen mehr gegeben.

2.2.3.1.9 Auftrennung von RNA mittels Agarosegelelektrophorese

10 μg Gesamt-RNA oder 1 μg Poly(A)-mRNA in einem Volumen von 5 μl wurden mit 15 μl Formaldehyd- (FA-) Ladepuffer für 15 min bei 65°C denaturiert und in einem 1%igen denaturierenden FA-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der RNA-Millennium Marker mit Ethidiumbromid-haltigem FA-Ladepuffer verwendet. Nach dem Gellauf wurde die RNA über einer UV-Lampe (254 nm) sichtbar gemacht und fotografiert.

-10x Formaldehyd-Gelpuffer (1 l): 200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 180 ml 37% Formaldehyd, 10 mM EDTA (pH 7,0)

-1x Formaldehyd-Laufpuffer (1 l): 100 ml 10x FA-Gelpuffer, 20 ml 37% Formaldehyd

-Formaldehyd-Ladepuffer: 50% Formamid, 2,2 M Formaldehyd, 1x MOPS-Puffer, 0,2% Bromphenol-Blau (w/v), 10% Ficoll (w/v), 50 mg/ml Ethidiumbromid

2.2.3.1.10 „Northernblot“-Analyse

2.2.3.1.10.1 Transfer von RNA auf eine Nylonmembran („Northernblot“)

Die RNA wurde mittels Kapillartransfer abwärts vom Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (BrightStar Plus) überführt (Chomczynski, 1992). Hierzu verwendete man einen schwach alkalischen Transferpuffer und baute die Transferapparatur nach Angaben des Membran-Herstellers auf. Nach einem zweistündigen Transfer wurde die Membran kurz in 1x FA-Laufpuffer gewaschen und die RNA unter UV-Licht mit 120 millijoule kovalent an die Membran gebunden. Die Membranen konnten bei -20°C gelagert werden.

-Transferpuffer: 1 M NaCl, 10 mM NaOH

2.2.3.1.10.2 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die Herstellung von radioaktiv-markierten Sonden für die spezifische Hybridisierung von membrangebundener RNA erfolgte unter Zuhilfenahme des Strip-EZ DNA Kits der Firma Ambion nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983). 25 ng DNA wurden in 9 μl Gesamtvolumen für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Man pipettierte auf Eis 2,5 μl Dekamere (Mischung sämtlicher, möglicher Basensequenzen), 5 μl 5x Reaktionspuffer (enthielt dATP und dCTP), 2,5 μl 10x dCTP und 5 μl [α - ^{32}P]dATP (10 mCi/ml) zur Sonden-DNA hinzu. Die Klenow-Reaktion wurde mit 1 μl Exonuklease-freiem Klenow-Enzym gestartet und für 25 min bei 37°C im Wasserbad durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktion mit 1 μl 0,5 M EDTA gestoppt und nicht eingebaute Nukleotide durch Zentrifugation über eine Sephadex G-50-Säule für 4 min bei 3000 x g abgetrennt. Die spezifische Aktivität der Probe und die Einbaurrate von [α - ^{32}P]dATP wurde an einem Szintillationszähler bestimmt.

2.2.3.1.10.3 Hybridisierung von „Northernblots“ mit radioaktiv-markierter DNA

Je 1×10^7 cpm an radioaktiv-markierter Sonden-DNA wurde für 10 min bei 90°C denaturiert und in 10 ml auf 68°C vorgewärmte ULTRAhyb-Hybridisierungslösung aufgenommen. Die Nylonmembran mit der transferierten RNA schweißte man in eine Plastikhülle ein gab nach einer Vorhybridisierung für 30 min bei 68°C die radioaktive Sondenlösung zu. Die Inkubation erfolgte an einem Rotor über Nacht bei 68°C . Am nächsten Tag wurde die Membran zuerst für 30 min in Waschpuffer 1 bei RT und dann im stringenten Waschpuffer 2 für 15 min bei 50°C gewaschen. Zur Signaldetektion wurde ein Röntgenfilm bei -80°C exponiert und am Entwicklerautomat entwickelt.

-20x SSC-Puffer (pH 7,0): 3 M NaCl, 0,3 M $\text{Na}_3\text{Citrat} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

-Waschpuffer 1: 2x SSC, 0,05% SDS

-Waschpuffer 2: 0,1x SSC, 0,1% SDS

2.2.3.1.10.4 „Strippen“ von „Northernblots“

Radioaktiv-markierte Sonden-DNA konnte mittels Komponenten des Strip-EZ DNA Kits der Firma Ambion wieder effektiv von der RNA gelöst werden („Strippen“). Hierzu wurden die Membranen bei 68°C für 2 x 10 min in dem beigefügten Degradierungspuffer inkubiert. Nach Herstellerangaben wird durch Inkubation mit dem Degradierungspuffer die Sonden-DNA in kurze Oligonukleotide geschnitten, und kann deshalb anschließend unter milden Bedingungen von der RNA abgelöst werden. Die Ablösung der DNA erfolgte durch Waschen mit Rekonstituierungspuffer für 10 min bei 68°C. Anschließend konnten die Membranen mit der transferierten RNA für weitere Markierungsreaktionen eingesetzt werden.

2.2.3.1.11 Hybridisierung von kommerziellen Blots mit radioaktiv-markierter DNA

Kommerziell erhältliche RNA- oder cDNA Blots wurden im wesentlichen nach dem in den Kapiteln 2.2.3.1.10.2 und 2.2.3.1.10.3 aufgeführtem Protokoll mit spezifischen radioaktiv-markierten DNA-Sonden hybridisiert. Folgende Modifikationen waren aber für die Hybridisierung des mit Poly(A)-mRNA getüpfelten humanen „Multiple Tissue Expression“-Arrays, des „Cancer Gene Screening 96 Dot Total RNA Dot“-Blots und für den mit cDNA getüpfelten „Cancer Profiling“-Array erforderlich:

1 x 10⁷ cpm radioaktiv-markierter Sonden-DNA wurden zur Unterdrückung von Kreuzhybridisierungen mit 30 µg humaner C₀t-1-DNA, 150 µg fragmentierter Lachssperma-DNA sowie 50 ml 20x SSC-Puffer vermischt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 200 µl gebracht. Dieser Hybridisierungscocktail wurde bei 95°C für 5 min denaturiert und in 5 ml der auf 68°C vorgewärmten ULTRAhyb-Hybridisierungslösung überführt. Zu 15 ml der Hybridisierungslösung gab man 1,5 mg denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA und verwendete davon 10 ml, um den jeweiligen Array bei 68°C für 30 min vorzuhybridisieren. Die Inkubation erfolgte an einem Rotor über Nacht bei 68°C.

Das für die Arrays modifizierte stringenteres Waschprotokoll lautete: 5 x 20 min bei 65°C in Waschpuffer 1B und 2 x 20 min bei 55°C in Waschpuffer 2B.

-Waschpuffer 1B: 2x SSC, 1% SDS

-Waschpuffer 2B: 0,1x SSC, 0,5% SDS

2.2.3.2 Methoden zur DNA-Analyse

2.2.3.2.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.3.2.1.1 Erststrang-cDNA-Synthese am Thermozykler (RT-PCR)

Zur Erststrang-Synthese von einzelsträngiger cDNA aus einer RNA-Vorlage wurde der First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) der Firma Roche verwendet.

Ein Standard RT-PCR-Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

0,5 µg Gesamt-RNA, 1x Reaktionspuffer, 1 mM dNTP-Mischung, 5 mM MgCl₂, 1,6 µg Oligo-p(dT)₁₅-Primer oder 3,2 µg „Random-Primer“ p(dN)₆, 50 Einheiten RNase-Inhibitor, 20 Einheiten AMV Reverse Transkriptase, mit Wasser auf ein Volumen von 20 µl eingestellt.

Die RNA wurde in Wasser aufgenommen, mit den Nukleotiden und dem Primer für 10 min bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Nach Zugabe der restlichen Komponenten inklusive der Reversen Transkriptase ließ man die Primer bei 25°C für 10 min im Thermozykler an die RNA anlagern. Die reverse Transkription wurde für 60 min bei 42°C durchgeführt, danach denaturierte man die Reverse Transkriptase bei 99°C für 5 min und kühlte auf 4°C ab.

-1x Reaktionspuffer (pH 8,3): 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl

2.2.3.2.1.2 DNA-Amplifikation mit der PCR-Reaktion

Die PCR wurde eingesetzt um für „Northernblot“-Analysen genspezifische Sonden-DNA herzustellen oder um flankierende Schnittstellen an die kodierende Sequenz des *TROP2*-Gens zu synthetisieren. Die PCR erfolgte nach dem Protokoll des High Fidelity PCR Master Systems der Firma Roche mit den für das jeweilige Primerset optimalen Anlagerungstemperaturen.

2.2.3.2.1.3 Synthese von flankierenden Schnittstellen an eine DNA-Sequenz

Zur Generierung einer DNA-Sequenz von *TROP2*, die genau den ORF umschließt und eine *Nhe* I-Schnittstelle am 5'-Ende sowie eine *Bam* HI-Schnittstelle am 3'-Ende trägt, hatte uns freundlicherweise S. Alberti den pBJI-neo-Trop-2-Vektor als PCR-Vorlage zur Verfügung gestellt. Das Plasmid enthält einen genomischen Klon (Klon AC: X77753) für *TROP2*. Aufgrund des hohen GC-Gehaltes im Bereich des 5'-UTR (untranslatierte Region) sowie des Startkodons von *TROP2* musste der PCR-Ansatz wie folgt modifiziert werden:

- 1 µg Vektor-DNA (pBJI-neo-Trop-2)
- 300 nM Trop-2_*Nhe* I_for-Primer
- 300 nM Trop-2_*Bam* HI_rev-Primer
- 5% DMSO (Dimethylsulfoxid)
- 1,5 M Betain (N, N, N-trimethylglycine)
- mit Wasser auf 25 µl auffüllen
- 25 µl 2x PCR-Mischung

Die PCR-Reaktion erfolgte am Thermozykler mit beheiztem Deckel unter den in Tabelle 2.3 aufgelisteten Bedingungen.

Zyklen	Zeit (s)	Temperatur (°C)	Programm
1	240	94	Denaturierung
10	30	94	Denaturierung
	30	75	Hybridisierung
	45	72	Extension
30	15	94	Denaturierung
	30	75	Hybridisierung
	45+x*	72	Extension
1	490	72	Extension
1	300	4	Kühlung

x* = Erhöhung der Zeit um 5 s pro Zyklus

Tabelle 2.3: PCR-Protokoll zur Amplifizierung des offenen Leserahmens von *TROP2* aus einem genomischen Klon mit Primern, die zusätzlich Schnittstellen für *Nhe* I und *Bam* HI enthalten.

2.2.3.2.1.4 PCR mit dem LightCycler System

2.2.3.2.1.4.1 Aufbau und Vorteile des LightCycler Systems

Das LightCycler Gerät besteht aus zwei verschiedenen Komponenten: einem PCR-Cycler und einem Fluorimeter. Gegenüber der klassischen PCR hat die Verwendung des LightCyclers den Vorteil, dass die Reaktion wesentlich schneller durchgeführt werden kann. Zudem kann die gesamte PCR-Reaktion am Bildschirm verfolgt und ausgewertet werden und muss nicht zur Visualisierung auf ein Agarosegel aufgetragen werden.

2.2.3.2.1.4.2 Die verschiedenen Detektionsarten mit dem LightCycler System

Die PCR-Produkte können mit dem LightCycler System über zwei unterschiedliche Fluoreszenz-Techniken detektiert werden. Der interkalierende SYBR Green I-Farbstoff bindet an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle unabhängig von deren Sequenz und generiert somit ein Fluoreszenzsignal, das proportional zu der in der PCR amplifizierten DNA-Menge ist. Das LightCycler Gerät misst die fluorometrische Intensität von SYBR Green I am Ende jeder DNA-Verlängerungsphase. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass möglicherweise gebildete Primerdimere oder unspezifische DNA-Produkte die quantitative Messung verfälschen können. Darum wird zur Analyse der PCR-Produkte im Anschluss an die PCR-Reaktion noch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Amplifizierte doppelsträngige DNA-Produkte schmelzen für gewöhnlich schnell und vollständig bei einer charakteristischen Temperatur. Lässt man die DNA in der Reaktionskapillare langsam von 60°C auf 95°C erhitzen und misst dabei kontinuierlich die Fluoreszenz, so fällt die Fluoreszenz am charakteristischen Schmelzpunkt plötzlich stark ab, da sich der

SYBR Green I-Farbstoff von der DNA löst. Primerdimere schmelzen bei tieferen Temperaturen als spezifische PCR-Produkte, deshalb kann das Programm diese voneinander unterscheiden. Das Schmelzverhalten wird graphisch durch die erste negative Ableitung der Fluoreszenz zur Temperatur dargestellt ($-dF/dT$).

Alternativ dazu kann ein amplifiziertes PCR-Produkt durch ein spezifisches Paar von Oligonukleotiden bestimmt werden, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. Diese Methode verwendet zwei Oligonukleotid-Hybridisierungssonden die sich an eng benachbarte interne Sequenzen anlagern. Das 5'-Oligonukleotid (Geber) ist am 3'-Ende Fluoreszin-gekoppelt, während das 3'-Oligonukleotid (Empfänger) den Farbstoff „Rot 640“ an seinem 5'-Ende trägt und am 3'-Ende phosphoryliert ist. Nach der Hybridisierung an die Ziel-DNA kommen sich die zwei Proben so nahe (10–100 Å), dass Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) auftreten kann. Hierbei wird das Geber-Fluoreszenzmolekül F1 durch eine externe Lichtquelle angeregt und gibt einen Teil seiner Anregungsenergie an das benachbarte Empfänger-Molekül F2 ab. Das angeregte Empfängermolekül strahlt daraufhin messbares Licht ab. Der wesentliche Nachteil dieser Methode ist, dass man bei spezialisierten Anbietern zuerst die genspezifischen fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide synthetisieren lassen muss.

2.2.3.2.1.4.3 Semiquantitative-Analyse von PCR-Produkten

Das LightCycler Analyseprogramm (Version 3.5) ermöglicht eine Quantifizierungsanalyse durch den Vergleich der Fluoreszenz eines PCR-Produktes unbekannter Konzentration mit der Fluoreszenz von verschiedenen Verdünnungen eines externen Standards. Für die Quantifizierung werden nur Fluoreszenzwerte verwendet, die während der log-linearen Zyklen der Reaktion auftreten, außerdem muss die Amplifikationseffizienz des Standards und der Probe vergleichbar sein. Die Quantifizierungssoftware ermittelt eine „**Bestfit-Linie**“ von der log-linearen Region jeder Kurve, die signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Diese „Bestfit-Linie“ verläuft parallel zur x-Achse und wird als Kreuzungslinie bezeichnet. Der Punkt an dem die Kreuzungslinie auf die log-lineare Region jeder Fluoreszenzkurve trifft (**Kreuzungspunkt**) wird zur Konzentrationsbestimmung verwendet. Das Instrument trägt eine Standardkurve aus den Kreuzungspunkten des Standards gegen die bekannte Konzentration des Standards auf. Durch Vergleiche der Kreuzungspunkte einer unbekannt Probe mit der erstellten Standardkurve wird die Anfangskopienanzahl der zu untersuchenden cDNA in der unbekannt Probe ermittelt. Hierzu wird von der Analysensoftware das Maximum der zweiten Ableitung einer Kurve bestimmt („**Second Derivative Maximum**“-Methode) und somit die PCR-Zyklusanzahl beim Erreichen des Kreuzungspunktes kalkuliert. Die Kurve wird vom Programm als halblogarithmische Darstellung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zykluszahl präsentiert.

2.2.3.2.1.4.3.1 Versuchsdurchführung

Für die Genexpressionsanalyse wurde der LightCycler DNA Master SYBR Green I Kit der Firma Roche verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 1x PCR-Mischung (enthält Taq DNA-Polymerase, dNTP-Mischung, SYBR Green I)
- je 0,5 µM Primer
- 3 mM bzw. 4 mM MgCl₂ Endkonzentration
- mit H₂O auf 18 µl aufgefüllt.

Nach Zugabe von 2 µl cDNA oder einer Wasserkontrolle wurden die Glaskapillaren verschlossen, kurz abzentrifugiert und in den Rotor des LightCycler Geräts gestellt. Der Ablauf der Reaktion setzte sich aus vier Schritten, die in Tabelle 2.4 aufgeführt sind, zusammen. Abschließend konnten die PCR-Reaktionen aus den Kapillaren mittels Zentrifugation in Reaktionsgefäße überführt und eine Größenabschätzung des Produkts in einem Agarosegel durchgeführt werden.

Programm: Denaturierung				Zyklen:	1
Segment-Nummer	Zieltemperatur (°C)	Haltezeit der Temperatur (s)	Temperaturänderung / Zeit (°C/s)	Messung	
1	95	120	20	Keine	
Programm: Amplifizierung				Zyklen:	45
Segment-Nummer	Zieltemperatur (°C)	Haltezeit der Temperatur (s)	Temperaturänderung / Zeit (°C/s)	Messung	
1	95	0	20	Keine	
2	58	5	20	Keine	
3	72	8	20	Einzel	
Programm: Schmelzkurve				Zyklen:	1
Segment-Nummer	Zieltemperatur (°C)	Haltezeit der Temperatur (s)	Temperaturänderung / Zeit (°C/s)	Messungsart	
1	95	0	20	Keine	
2	65	30	20	Keine	
3	95	0	0,1	Kontinuierlich	
Programm: Kühlung				Zyklen:	1
Segment-Nummer	Zieltemperatur (°C)	Haltezeit der Temperatur (s)	Temperaturänderung / Zeit (°C/s)	Messungsart	
1	40	30	20	Keine	

Tabelle 2.4: Standard-PCR-Protokoll zur semiquantitativen Genexpressionsanalyse von cDNA aus Zelllinien und Geweben mittels der SYBR Green I-Methode. Im Anschluss an die PCR erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse.

2.2.3.2.1.4.3.2 Definition der Standardkurve

Für die Quantifizierung wurde eine Standardkurve des zu untersuchenden Gens sowie von Calnexin (CANX) als Referenzgen für die Normalisierung erstellt. Zuerst wurden je 1 µg DNase-verdaute Gesamt-RNA der Zelllinie KM12SM revers transkribiert und je 2 µl einer Verdünnung von 0, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 und 1:1000 eingesetzt. Indem bei jedem PCR-Lauf ein Standard der unverdünnten cDNA mitamplifiziert wurde (der willkürlich mit dem Wert 1000 definiert wurde), konnte man die Expression des untersuchten Gens in den jeweiligen Proben relativ zueinander vergleichen. Die Normalisierung der Proben auf Calnexin erfolgte nach Gleichung 2.9.

$$\text{Gleichung 2.9: } E_{\text{normalisiert (Probe)}} = \frac{E_{\text{(Probe)}} * E_{\text{(Calnexin/Probe)}}}{E_{\text{(Calnexin/Standard)}}}$$

$E_{\text{(Probe)}}$ = relative Expression des Zielgens in der zu untersuchenden Probe

$E_{\text{(Calnexin/Probe)}}$ = relative Expression von Calnexin in der zu untersuchenden Probe

$E_{\text{(Calnexin/Standard)}}$ = relative Expression von Calnexin in der Standardprobe

2.2.3.2.1.4.4 Analyse der GAPD-Expression mit dem LightCycler System

Zur Qualitätsanalyse von RNA-Isolaten aus Paraffinschnitten wurde das LightCycler h-G6PDH DNA Housekeeping Gene Set in Kombination mit dem LightCycler DNA Master Hybridization Probes System der Firma Roche verwendet. Hierzu wurde jeweils 5 µl an cDNA eingesetzt. Diese stammten aus 20 µl einer reversen Transkription von jeweils 250 ng DNase-behandelter Gesamt-RNA aus Paraffinschnitten (siehe Kapitel 2.2.3.1.4) oder von je 5 µl einer *in vitro* transkribierten Standard-GAPD-RNA (5×10^6 - oder 5×10^5 -Kopien, im Kit enthalten).

Der Reaktionsansatz erfolgte nach dem im LightCycler DNA Master Hybridization Probes Kit angegebenen Schema unter den angegebenen Reaktionsbedingungen. Mit den im Kit enthaltenen Primern wurde ein GAPD-Fragment von 123 bp amplifiziert.

2.2.3.2.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung im 1-2%igen Agarosegel durch Ausschneiden der Banden mit einem Skalpell und anschließender Gel-extraktion mit dem QIAquick Gel Extraktion System der Firma Qiagen.

2.2.3.2.3 Restriktionsspaltung von DNA

Jeweils 1-4 µg DNA in einem Volumen von 18 µl wurden in 2 µl des jeweiligen Puffers (10x) aufgenommen und mit 2 Einheiten des Restriktionsenzym pro µg DNA für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend auf Eis gestoppt.

2.2.3.2.4 Ligierung von DNA in Vektoren

Die zu inserierende DNA und der Vektor wurden mit den gleichen Enzymen geschnitten und mit dem Rapid DNA Ligation System der Firma Roche ligiert. Hierzu vermischte man 30 ng Vektor-DNA mit 90 ng der zu inserierenden DNA in 10 µl Endvolumen und gab 10 µl T4 DNA-Ligierungspuffer zu. Mit 1 µl T4 DNA-Ligase wurde für 120 min bei 20°C inkubiert und die Hälfte des Ansatzes zur Kontrolle auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

2.2.3.2.5 Transformation von *E. coli*

Zu einem 100 µl Aliquot von superkompetenten *E. coli* XL1-Blue-Zellen wurden 25 mM β-Mercaptoethanol zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann gab man circa 40 ng eines Ligierungsansatzes zu und inkubierte für 30 min auf Eis. Nach einer Hitzeschockbehandlung für 45 s bei 42°C wurde der Ansatz für 2 min auf Eis gehalten. Dann wurden 0,9 ml SOC-Medium zugegeben und 50 µl der Zellsuspension nach einer einstündigen Anzucht bei 37°C auf LB- (Luria-Bertani-) Ampicillin Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

-SOC-Medium (1 l): 2% Bacto-Trypton, 0,5% Bacto-Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose
-LB-Ampicillin Agar (1 l, pH 7,0): 200 mM NaCl, 1% Bacto-Trypton, 0,5% Bacto-Hefeextrakt, 2% Agar, 50 mg Ampicillin

2.2.3.2.6 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterienkulturen

Einzelkolonien von Bakterien wurden als Suspensionskulturen in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht am Rotor kultiviert. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine dichtgewachsene Bakterienkultur mit 25% Glycerin versetzt und bei einer Temperatur von -80°C aufbewahrt.

-LB-Medium (1 l): 1% Bacto-Trypton, 0,5% Bacto-Hefeextrakt, 10 mM NaCl

2.2.3.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen erfolgte mit dem QIAprep Miniprep Kit der Firma Qiagen. Bakterienkulturen in LB-Medium wurden bei 4°C für 15 min bei 5300 x g sedimentiert, in 250 µl RNase A-haltigem Resuspendierungspuffer aufgenommen und durch Zugabe von 250 µl alkalischem SDS-Lysepuffer lysiert. Das Lysat wurde nach 3 min mit 350 µl Neutralisierungspuffer versetzt, wodurch denaturierte Proteine, an die Zellwand gebundene chromosomale DNA, SDS und zelluläre Bestandteile präzipitierten und durch Zentrifugation für 10 min bei 14300 x g sedimentiert werden konnten. Der Überstand mit der zirkulären Plasmid-DNA wurde auf eine Silicagel-haltige Rotationssäule gegeben und die DNA nach den Angaben des Herstellers isoliert, gewaschen und in Wasser eluiert.

- Resuspendierungspuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
- Lysepuffer: 200 mM NaOH, 1% SDS
- Neutralisierungspuffer (pH 5,5): 3 M Kaliumacetat

2.2.3.2.8 Isolierung von Endotoxin-freier Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen durchgeführt, um die Transfektionseffizienz von humanen Zelllinien mit Liposomenlösungen zu verbessern. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte wie im vorherigen Kapitel 2.2.3.2.7 beschrieben. Die zusätzliche Entfernung der Lipopolysaccharide der Bakterienmembran (Endotoxine) aus dem DNA-Lysat, sowie alle weiteren Fäll- und Waschschriffe wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.3.1 Gesamtproteinextraktion aus Zellen

Zur Proteinextraktion wurden die Zellen subkonfluent in T-75 Zellkulturflaschen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit Hilfe eines Schabers vom Boden abgelöst. Die abgeschabten Zellen wurden in 5 ml kaltem PBS für 5 min bei 1000 x g sedimentiert. Danach wurde der PBS-Puffer entfernt, das Zellsediment in 200 µl kaltem RIPA-Lysepuffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Lyse für 15 min auf Eis wurden die unlöslichen Fragmente durch Zentrifugation bei 14000 x g (4°C) für 15 min abgetrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Abnahme eines Aliquots zur Mengenbestimmung wurden die isolierten Proteine in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

- RIPA-Lysepuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Nonidet P40, 0,5% Natriumdeoxycholat, 1 Tablette Complete Mini Proteasen-Inhibitor-Cocktail

2.2.3.3.2 Quantifizierung von Proteinen

Zur Generierung einer Konzentrations-Eichkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit einem Proteinstandard aus Albumin der Firma Pierce von 2000 µg/ml bis 25 µg/ml in PBS hergestellt. Die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden in Verdünnungen von 1:3, 1:6 und unverdünnt vorbereitet. 10 µl aller Lösungen wurden zur Doppelbestimmung in eine 96-Lochplatte pipettiert und mit jeweils 200 µl einer Bicinchonsäure (BCA)-Lösung auf einem Rüttler vermischt. Nach einer Inkubation für 30 min bei 37°C erfolgte die Messung der Absorption bei 562 nm (Referenzwellenlänge: 700 nm). Die Proteinkonzentrationen konnten über ein Roche-internes Programm unter Verwendung der Microsoft XL Fit-Software berechnet werden.

-BCA-Lösung: 50 ml BCA-Assay-Reagenz A mit 1 ml BCA-Assay-Reagenz B mischen

2.2.3.3.3 Auftrennung von Proteinen mit SDS-PAGE

Proteingemische wurden zunächst mit einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Hierzu wurden 10%ige oder 12%ige vorgefertigte 8 cm x 8 cm NuPAGE Bis-Tris-Gele (pH 6,4) der Firma Invitrogen und ein reduzierender 1x MOPS/SDS-Laufpuffer verwendet.

Proteinlösungen mit 10-80 µg Proteingehalt vermischte man mit ¼ Volumen LDS-Probenpuffer und 1/10 Volumen 0,5 M DTT in 22 µl Gesamtvolumen. Dann wurde die Probe für 10 min bei 70°C denaturiert, das Gel beladen und in einer vertikalen Gel-Apparatur bei 130 V für 90 min elektrophoretisiert.

-1x Laufpuffer 1 (äußere Kammer): 50 mM Tris-Base, 3,4 mM SDS, 1 mM EDTA
-1x reduzierender Laufpuffer 2: 200 ml 1x Laufpuffer 1 + 500 µl Nu PAGE-Antioxidantien
(innere Kammer)
-LDS-Probenpuffer: 4 g Glycerol, 0,682 g Tris-Base, 0,666 g Tris-HCl, 0,8 g LDS, 0,006 g EDTA, 0,75 ml 1%iger Lösung an Serva Blue G250, 0,75 ml 1%iger Lösung an Phenolrot, auf 10 ml mit Wasser auffüllen

2.2.3.3.4 „Westernblot“-Analyse

2.2.3.3.4.1 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen („Westernblot“)

Der Transfer der aufgetrennten Proteinproben auf eine Nitrozellulosemembran (0,45 µm Porengröße) erfolgte nach der „Semidry-Blotting“-Methode (Burnette, 1981). Hierzu wurde an ein mit Transferpuffer getränktes Gel-Membran-Blottingpapier-Sandwich für 90 min eine Spannung von 60 mA angelegt.

-Transferpuffer: 39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,04% SDS, 20% Methanol (v/v)

2.2.3.3.4.2 Immundetektion von immobilisierten Proteinen

Wenn nicht gesondert aufgeführt wurden alle Schritte bei RT unter ständigem leichtem Schütteln durchgeführt.

Die Membran wurde nach dem Transfer für 2 x 5 min in TBS-Puffer gewaschen und anschließend für 90 min mit 10 ml Blockierlösung vorbehandelt. Der primäre Antikörper wurde in 12 ml der Blockierlösung verdünnt und die Membran über Nacht bei 4°C mit der Antikörperlösung inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer wurde die Membran erneut für 30 min blockiert und anschließend mit dem zweiten POD-konjugierten Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 für 90 min inkubiert. Es schlossen sich vier Waschschrte mit dem Waschpuffer, einmal mit 0,5% TBS/Milchlösung und zweimal kurz in TBS-Puffer an. Die Detektion erfolgte durch Reaktion der Antikörpergekoppelten Peroxidase mit 10 ml einer Luminol/Peroxidlösung (Lumi-Light^{PLUS}). Das emittierte Licht wurde durch Exposition eines Röntgenfilms nachgewiesen. Die Signalintensitäten wurden anschließend mit der Software LumiAnalyst (Version 3.1) der Firma Roche ermittelt.

- 1x TBS-Puffer (pH 7,5): 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl
- 1xTBST-Puffer: 1x TBS-Puffer + 0,05% (v/v) Tween-20
- Blockierlösung: 5% fettfreies Milchpulver in TBS-Puffer
- Waschpuffer: 0,5% fettfreies Milchpulver in TBST-Puffer

2.2.3.3.4.3 „Strippen“ von Immunblots

Die Antikörper wurden von der Membran durch zwei fünfminütige Waschschrte in 70°C warmem TBST-Puffer abgewaschen („Strippen“). Anschließend folgten drei Waschschrte für 5 min bei Raumtemperatur in TBS-Puffer, wonach der Blot zur quantitativen Auftragskontrolle mit einem Antikörper gegen β -Aktin erneut inkubiert werden konnte.

3 Ergebnisse

3.1 Genexpressionsanalyse mit dem KM12-Zellmodell

3.1.1 Deregulierte Gene im KM12-Zellmodell

Zur Bestimmung von Unterschieden im Genexpressionsmuster wurden von der nicht-metastasierenden Kolonkarzinom-Zelllinie KM12C und von den stark metastasierenden Zelllinien KM12SM und KM12L4A mittels Oligonukleotid-Mikroarrays Genexpressionsprofile erstellt. Das hierzu verwendete GeneChip® HG-U95-Set bestand aus fünf unterschiedlichen Arrays (HG-U95Av2, HG-U95B-E), die eine gleichzeitige Expressionsanalyse von über 60000 humanen Genen und bisher nicht näher charakterisierten Gensequenzen ermöglichten (siehe Kapitel 2.2.3.1.8.4). Von jedem der Zellklone KM12C, KM12SM und KM12L4A wurde die RNA dreimal isoliert und die daraus synthetisierten cDNA einer *in vitro*-Transkription unterzogen. Dann wurden von jeder erstellten, Biotin-markierten cRNA zwei Hybridisierungscocktails hergestellt (siehe Kapitel 2.2.3.1.8.2), um die 5 Genchips eines Sets zu hybridisieren. Insgesamt wurden für die Genexpressionsanalyse mit dem KM12-Zellmodell 45 Genchips hybridisiert. Zur Bestimmung von differentiell exprimierten Genen und EST wurden zuerst die absoluten Genchip-Analysen mit der nicht-metastasierenden Zelllinie KM12C als Basislinien definiert und die Signalintensitäten aller Genchips aufeinander normalisiert (siehe Kapitel 2.2.3.1.8.7.2).

Die mit den ca. 60000 gleichzeitig analysierten Genen und EST erhaltene Datenmenge machte es notwendig, folgende begrenzende Kriterien zu definieren:

1. Es wurden nur Kandidaten analysiert, deren „Absolute Call“ als „Vorhanden“ ausgedrückt wurde und die somit ein signifikantes, auswertbares Signal auf dem Genchip zeigten (siehe Kapitel 2.2.3.1.8.7.1). Ein Kriterium für den „Absolute Call“ war die „Average Difference“ (AvgDiff), die als Maß für die Abundanz einer RNA mindestens den Wert 200 betragen musste.
2. Jedes Gen oder EST musste in mindestens 8 der 9 Kreuzvergleiche induziert oder reprimiert sein („Difference Call“, siehe Kapitel 2.2.3.1.8.7.2), um eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Vergleiche zu garantieren.
3. Ein induziertes Gen oder EST musste einen „Change Factor“ (CF) ≥ 2 haben (siehe Kapitel 2.2.3.1.8.7.2). Für reprimierte Gene oder EST wurde entsprechend ein CF ≤ -2 gewählt.
4. Die „Change Factor Quality“ (CFQ) musste bei allen vergleichenden Analysen einen Wert von > 1 aufweisen (siehe Kapitel 2.2.3.1.8.7.2).

Einen Überblick über das Ergebnis der vergleichenden Genexpressionsanalysen mit dem KM12-Zellmodell vermittelt Abbildung 3.1. Insgesamt wurden in der Zelllinie KM12SM 231- und in der Zelllinie KM12L4A 307 Gene und EST im Vergleich zu KM12C als dereguliert bestimmt. Eine Schnittmengenanalyse ergab, dass hiervon 182 Gene und EST in beiden metastasierenden Zelllinien induziert oder reprimiert waren.

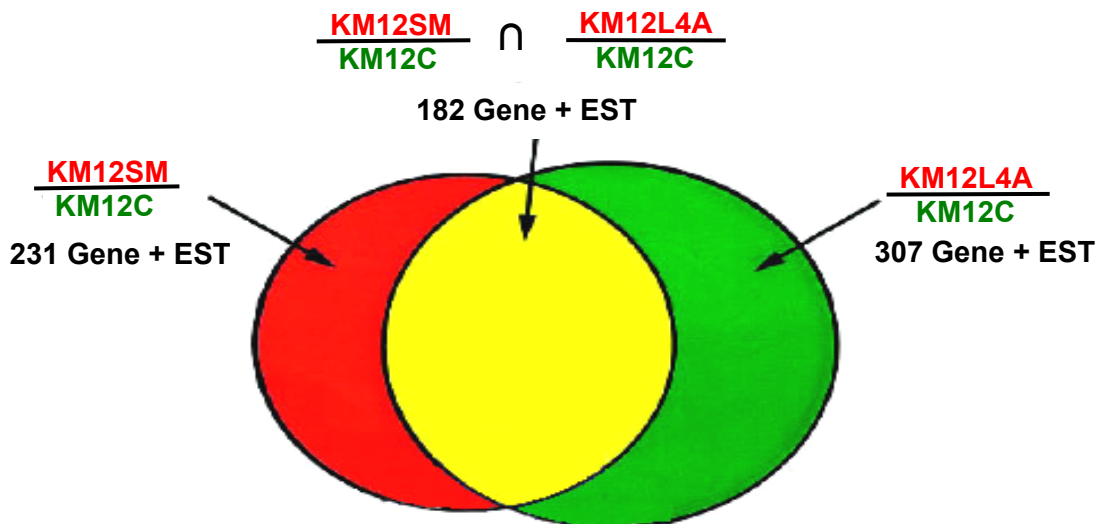


Abbildung 3.1: Schnittmengendiagramm der Genexpressionsanalyse mit Oligonukleotidarrays. In der Zelllinie KM12L4A wurden 307 Gene und EST als dereguliert zur Bezugs-Zelllinie KM12C identifiziert (grüner Kreis), in der Zelllinie KM12SM waren es dementsprechend 231 Gene oder EST (roter Kreis). Davon waren 182 in beiden metastasierenden Zelllinien dereguliert (induziert oder reprimiert, gelber Bereich).

Um Gene zu identifizieren, die potentiell in den Prozess der Lebermetastasierung von Kolon-Primärtumoren involviert sind, fokussierte die Arbeit sich auf die 182 Gene und EST die in beiden metastasierenden Zelllinien als dereguliert identifiziert wurden. Diese wurden tabellarisch erfasst und mit „UniGene² Cluster“-Bezeichnungen annotiert (Tabellen 3.1 und 3.2). In die Kategorie, in beiden metastasierenden Zelllinien induziert, fielen insgesamt 137 Gene und EST (Tab. 3.1), reprimiert waren 45 Gene und EST (Tab. 3.2). Die Proteinprodukte der deregulierten Gene konnten *in silico* mit Hilfe von Annotierungsprogrammen [NetAffx (Affymetrix), GeneIndex (Roche), LocusLink (NCBI, Bethesda, MD, USA)] oder mittels Literaturrecherchen (Medline, OMIM) in folgende 11 Kategorien gruppiert werden: Immunantwortassoziierte Proteine, Enzyme, Transmembran-Proteine, sezernierte Proteine, Zytoskelett- oder EZM-assoziierte Proteine, Transkription- oder Translationassoziierte Proteine, Signalmoleküle, Zellzyklus- oder Apoptoseassoziierte Proteine, Transportmoleküle und Proteine anderer Funktion (Tab. 3.1 und 3.2). EST und potentielle ORF wurden gesondert klassifiziert.

² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>

Unigene Cluster	Genbezeichnung	CF	
		KM12	
		L4A	SM

Immunantwortassoziierte Proteine

Hs.17409	CRIP1: cysteine-rich protein 1 (intestinal)	19,4	7,1
Hs.204238	LCN2: lipocalin 2 (oncogene 24p3)	13,5	3,8
Hs.211580	MICB: MHC class I polypeptide-related sequence B	10,9	17,2
Hs.77961	HLA-B: major histocompatibility complex, class I, B	4,8	3,2
Hs.180062	PSMB8: proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8	2,4	2,1

Enzyme

Hs.226795	GSTP1: glutathione S-transferase pi	262,7	155,5
Hs.118633	OASL: 2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	19,4	26,7
Hs.104117	CYP3A5: cytochrome P450, subfamily IIIA (niphedipine oxidase), polypeptide 5	9,7	7,6
Hs.3838	SNK: serum-inducible kinase	8,6	2,4
Hs.170171	GLUL: glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	7,7	4,8
Hs.75616	DHCR24: 24-dehydrocholesterol reductase	7,5	5,5
Hs.183109	MAOA: monoamine oxidase A	7,3	5,0
Hs.171811	AK2: adenylate kinase 2	6,5	5,4
Hs.79876	STS: steroid sulfatase (microsomal), arylsulfatase C, isozyme S	6,3	6,5
Hs.156784	CHST5: carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 5	5,5	6,0
Hs.249175	IRAK2: interleukin-1 receptor-associated kinase 2	5,3	3,6
Hs.239926	SC4MOL: sterol-C4-methyl oxidase-like	5,2	4,5
Hs.169895	UBE2L6: ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	4,9	4,5
Hs.150403	DDC: dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)	3,9	2,6
Hs.59889	HMGCS2: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (mitochondrial)	3,9	5,5
Hs.82396	OAS1: 2', 5'-oligoadenylate synthetase 1 (40-46 kDA)	3,4	4,9
Hs.71465	SQLE: squalene epoxidase	2,9	3,0
Hs.2173	FUT4: fucosyltransferase 4 (alpha (1,3) fucosyltransferase, myeloid-specific)	2,9	3,0
Hs.151988	MAP3K5: mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	2,8	2,8
Hs.160786	ASS: argininosuccinate synthetase	2,6	3,7
Hs.374490	LRAP: leukocyte-derived arginine aminopeptidase	2,4	2,4
Hs.70604	ATP9A: ATPase, Class II, type 9A	2,3	3,3
Hs.77910	HMGCS1: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	2,2	5,2
Hs.85962	HAS3: hyaluronan synthase 3	2,2	2,3
Hs.48876	FDFT1: farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1	2,2	2,5
Hs.11638	FACL5: fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 5	2,1	2,7
Hs.232116	PRKWNK2: protein kinase, lysine deficient 2	2,1	2,3

Transmembran-Proteine

Hs.195155	SN2: similar to N system amino acids transporter NAT-1	72,9	32,8
Hs.23582	TACSTD2: tumor-associated calcium signal transducer 2	21,9	28,2
Hs.38972	TSPAN-1: tetraspan 1	14,4	5,7
Hs.266175	PAG: phosphoprotein associated with GEMs	13,3	32,7
Hs.118110	BST2: bone marrow stromal cell antigen 2	9,0	11,9
Hs.5338	CA12: carbonic anhydrase XII	8,4	3,5
Hs.321709	P2RX4: purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 4	6,1	4,9
Hs.489354	MUC3B: mucin 3B	5,4	3,1
Hs.25640	CLDN3: claudin 3	4,7	2,4
Hs.522989	NET-7: transmembrane 4 superfamily member tetraspan NET-7	4,5	3,1
Hs.82353	PROCR: protein C receptor, endothelial (EPCR)	4,4	3,5
Hs.8037	TM4SF9: transmembrane 4 superfamily member 9	4,3	4,3
Hs.172199	ADCY7: adenylate cyclase 7	4,0	2,7
Hs.234642	AQP3: aquaporin 3	4,0	3,0
Hs.220529	CEACAM5: carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	3,4	2,6
Hs.61635	STEAP: six transmembrane epithelial antigen of the prostate	3,4	2,5
Hs.37169	KCNJ3: potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3	3,1	2,1
Hs.109122	MPP5: membrane protein, palmitoylated 5 (MAGUK p55 subfamily member	2,5	2,3
Hs.5372	CLDN4: claudin 4	2,5	2,3

Unigene Cluster	Genbezeichnung	CF	
		KM12	
		L4A	SM

Sezernierte Proteine

Hs.82045	MDK: midkine (neurite growth-promoting factor 2)	11,5	3,0
Hs.170195	BMP7: bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)	4,8	3,1
Hs.211573	HSPG2: heparan sulfate proteoglycan 2 (perlecan)	3,9	2,1
Hs.833	ISG15: interferon-stimulated protein, 15 kDa	3,8	3,1
Hs.241257	LTBP1: latent transforming growth factor beta binding protein 1	2,8	2,5
Hs.95655	SECTM1: secreted and transmembrane 1	2,7	2,6
Hs.5302	LGALS4: lectin, galactoside-binding, soluble, 4 (galectin 4)	2,6	2,4
Hs.101382	TNFAIP2: tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	2,1	2,3

Zytoskelett- oder EZM-assoziierte Proteine

Hs.166068	VIL1: villin 1	11,4	5,9
Hs.75968	TMSB4X: thymosin, beta 4, X-linked	5,8	6,7
Hs.297753	VIM: vimentin	4,7	4,0
Hs.336780	TUBB: tubulin, beta polypeptide	3,2	2,2
Hs.172740	MAPRE3: microtubule-associated protein, RP/EB family, member 3	2,5	2,9

Transkription- oder Translationassoziierte Proteine

Hs.76507	PIG7: LPS-induced TNF-alpha factor	10,2	6,2
Hs.446354	TCEA3: transcription elongation factor A (SII), 3	5,9	6,6
Hs.334695	GATA2: GATA-binding protein 2	5,7	5,3
Hs.5671	DMTF1: cyclin D binding Myb-like transcription factor 1	4,0	3,9
Hs.22554	HOXB5: homeo box B5	3,3	7,0
Hs.1545	CDX1: caudal type homeo box transcription factor 1	3,0	5,5
Hs.241529	HNF4G: hepatocyte nuclear factor 4, gamma	3,0	3,0
Hs.32967	CKN1: Cockayne syndrome 1 (classical)	2,8	3,4
Hs.75678	FOSB: FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	2,6	2,1
Hs.406300	RPL23: ribosomal protein L23	2,4	3,6
Hs.75307	H1FX: H1 histone family, member X	2,1	2,1

Signalmoleküle

Hs.112278	ARRB1: arrestin, beta 1	19,6	18,7
Hs.194678	WISP3: WNT1 inducible signaling pathway protein 3	4,5	5,6
Hs.78944	RGS2: regulator of G-protein signalling 2, 24kD	4,1	3,2
Hs.14331	S100A13: S100 calcium-binding protein A13	3,2	2,8
Hs.38772	RAB36: RAB36, member RAS oncogene family	2,9	3,2
Hs.250830	ARHGAP6: Rho GTPase activating protein 6	2,9	2,3
Hs.96063	IRS1: insulin receptor substrate 1	2,8	2,1
Hs.306881	SNX25: sorting nexin 25	2,5	5,2
Hs.79022	GEM: GTP-binding protein overexpressed in skeletal muscle	2,1	2,1

Zellzyklus- oder Apoptoseassoziierte Proteine

Hs.75586	CCND2: cyclin D2	6,2	5,1
Hs.56205	INSIG1: insulin induced gene 1	3,4	5,2
Hs.155419	BIK: BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	2,4	2,1
Hs.172894	BID: BH3 interacting domain death agonist	2,2	2,3

Transportmoleküle

Hs.195155	SLC38A5: solute carrier family 38, member 5	10,6	20,0
Hs.17296	KCTD14: potassium channel tetramerisation domain containing 14	7,2	6,3
Hs.76927	TOM34: translocase of outer mitochondrial membrane 34	5,4	3,3
Hs.5344	AP1G1: adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit	3,3	2,9
Hs.105509	CTL2: Choline transporter like 2 gene	2,8	4,4
Hs.408723	VCP: valosin-containing protein	2,4	2,9

Unigene Cluster	Genbezeichnung	CF	
		KM12	
		L4A	SM

Proteine anderer Funktion

Hs.100686	BCMP11: breast cancer membrane protein 11	10,3	4,8
Hs.59545	TRIM38: tripartite motif-containing 38	9,4	4,1
Hs.109276	LXN: latexin protein	8,4	6,6
Hs.10887	LAMP3: lysosomal-associated membrane protein 3	7,3	3,3
Hs.18760	SIPA1L2: Signal-induced proliferation-associated 1 like 2	6,1	2,1
Hs.43654	CLN6: ceroid-lipofuscinosis, neuronal 6, late infantile, variant	6,0	6,3
Hs.22393	DENR: density-regulated protein	5,1	4,6
Hs.13913	ZSWIM6: zinc finger, SWIM domain containing 6	3,7	3,0
Hs.132883	NOXA1: NADPH oxidase activator 1	3,5	6,1
Hs.173159	TACC1: transforming, acidic coiled-coil containing protein 1	3,2	3,8
Hs.153057	SPAG1: sperm associated antigen 1	2,8	2,2
Hs.334841	SELENBP1: selenium binding protein 1	2,7	6,1
Hs.8185	SQRDL: sulfide quinone reductase-like (yeast)	2,7	3,6
Hs.25130	TUWD12: TUWD12	2,7	2,5
Hs.145807	TMC5: transmembrane channel-like 5	2,7	2,5
Hs.444947	C8FW: phosphoprotein regulated by mitogenic pathways	2,4	4,2
Hs.34892	MIB: ubiquitin ligase mind bomb	2,4	3,4
Hs.409117	PHF14: PHD finger protein 14	2,4	3,1
Hs.300446	STARD10: START domain containing 10	2,4	2,3

EST/Potentielle ORF

Hs.32358	DKFZp434L142: hypothetical protein DKFZp434L142	56,4	14,2
Hs.9842	Homo sapiens transcribed sequences (AI344189)	19,6	7,4
Hs.15106	C14orf1: chromosome 14 open reading frame 1	13,4	11,4
Hs.17148	Homo sapiens transcribed sequences (AI739241)	8,9	6,6
Hs.19258	LOC134147: Hypothetical protein BC001573	7,8	9,5
Hs.78991	FAM16AX: family with sequence similarity 16, member A, X-linked	7,8	7,8
Hs.30376	C6orf53: chromosome 6 open reading frame 53	7,0	5,6
Hs.12529	LOC221002: CG4853 gene product	6,7	3,7
Hs.94952	cDNA highly similar to HSTFIISH: transcription elongation factor TFIIIS	5,6	7,4
Hs.93675	C10orf10: chromosome 10 open reading frame 10	5,4	8,1
Hs.17370	Homo sapiens transcribed sequence with moderate similarity to FLJ20378	5,3	3,7
Hs.44920	Homo sapiens transcribed sequence with moderate similarity to FLJ20489	5,3	5,9
Hs.18464	C11orf9: chromosome 11 open reading frame 9	4,4	2,5
Hs.15292	KIAA1268 protein	4,3	3,7
Hs.34620	FLJ10159: Hypothetical protein FLJ10159	3,7	3,3
Hs.17287	KIAA1913: KIAA1913	3,4	3,2
Hs.6716	Homo sapiens cDNA, 3' end (AA502753)	3,2	5,5
Hs.42622	FLJ21941: FLJ21941 protein	2,8	4,6
Hs.51262	FLJ20151: hypothetical protein FLJ20151	2,6	3,8
Hs.35574	Homo sapiens LOC374963 mRNA	2,6	3,6
Hs.99843	DKFZP586N0721: DKFZP586N0721 protein	2,6	2,3
Hs.40842	C20orf92: chromosome 20 open reading frame 92 (AA309047)	2,4	2,9
Hs.11583	LOC374699: LOC374699 (AI344053)	2,4	3,8
Hs.28368	C8orf4: chromosome 8 open reading frame 4	2,1	2,9

Tabelle 3.1: Auflistung der in den metastasierenden Zelllinien KM12L4A und KM12SM als induziert (im Vergleich zur nicht-metastasierenden Zelllinie KM12C) bestimmten Gene und EST.

Insgesamt wurden 113 Gene ermittelt, die mit einem CF von > 2 induziert waren. Diese Gene wurden nach der UniGene-Datenbank annotiert und nach der Funktion oder Lokalisierung der Proteinprodukte klassifiziert. Eine zusätzliche Klasse fasst alle 24 induzierten EST und potentiellen ORF zusammen. Die differentielle Expression von den fett gedruckt hervorgehobenen Genen und EST/Potentiellen ORF wurde mittels „Northernblot“-Analyse bestätigt.

Unigene Cluster	Genbezeichnung	CF	
		KM12	
		L4A	SM

Enzyme

Hs.182217	SUCLA2: succinate-CoA ligase, ADP-forming, beta subunit	-40,6	-40,6
Hs.21122	PJA1: praja 1	-26,4	-15,3
Hs.26350	TPST2: tyrosylprotein sulfotransferase 2	-11,7	-14,3
Hs.73875	FAH: fumarylacetoacetate hydrolase (fumarylacetoacetase)	-3,6	-2,7
Hs.433337	SMOX: spermine oxidase	-3,0	-4,0
Hs.300463	ACO2: aconitase 2, mitochondrial	-2,3	-4,9
Hs.188	PDE4B: phosphodiesterase 4B, cAMP-specific	-2,1	-5,2

Transmembran-Proteine

Hs.54481	LRP8: low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	-4,7	-2,5
----------	-------------------------------------------------------------------------------------	------	------

Zytoskelett- oder EZM-assoziierte Proteine

Hs.53563	COL9A3: collagen, type IX, alpha 3	-9,4	-2,4
Hs.162953	MYRIP: myosin VIIA and Rab interacting protein	-9,2	-16,9
Hs.23395	MYO9A: myosin IXA	-3,5	-2,2

Transkription- oder Translationassoziierte Proteine

Hs.350684	MPP7: membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7)	-9,9	-3,3
Hs.436991	RINZF: zinc finger protein RINZF	-5,3	-15,4
Hs.129914	RUNX1: runt-related transcription factor 1 (acute myeloid leukemia 1 oncogene)	-4,0	-2,1
Hs.143638	WDR4: WD repeat domain 4	-3,3	-7,1
Hs.169294	TCF7: transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)	-2,9	-2,8
Hs.159456	ZNF288: zinc finger protein 288	-2,5	-10,4
Hs.153405	PER2: period (Drosophila) homolog 2	-2,2	-7,0

Signalmoleküle

Hs.369912	STARD13: START domain containing 13	-3,3	-3,3
-----------	-------------------------------------	------	------

Zellzyklus- oder Apoptoseassoziierte Proteine

Hs.78501	GAS6: growth arrest-specific 6	-3,5	-10,7
Hs.411347	HSMPP8: M-phase phosphoprotein, mpp8	-2,3	-3,5
Hs.40137	ANAPC1: anaphase promoting complex subunit 1	-2,1	-19,9

Transportmoleküle

Hs.279771	RAB4B: RAB4B, member RAS oncogene family	-12,1	-25,2
Hs.2012	TCN1: transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	-5,3	-4,3
Hs.187958	SLC6A8: solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8	-4,8	-105,4
Hs.13845	SLC25A20: solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20	-4,3	-2,1
Hs.298023	AQP5: aquaporin 5	-4,1	-5,1

Proteine anderer Funktion

Hs.413226	ASB4: ankyrin repeat and SOCS box-containing 4	-118,2	-73,5
Hs.65425	CALB1: calbindin 1, (28kD)	-112,7	-43,7
Hs.182429	P5: protein disulfide isomerase-related protein	-14,5	-16,1
Hs.151573	CRY1: cryptochrome 1 (photolyase-like)	-4,5	-4,2
Hs.75789	NDRG1: N-myc downstream regulated	-3,2	-3,8

EST/Potentielle ORF

Hs.222637	Homo sapiens cDNA, 3' end	-566,7	-850,6
Hs.352240	MGC15523: hypothetical protein MGC15523	-28,8	-70,4
Hs.79881	Homo sapiens cDNA: FLJ23006 fis, clone LNG00414	-17,7	-17,7
Hs.202598	Homo sapiens cDNA, 3' end	-16,6	-28,6
Hs.328097	Homo sapiens cDNA clone IMAGE: 5286266, partial cds	-12,5	-12,5
Hs.167167	Homo sapiens cDNA FLJ36553 fis, clone TRACH2008478	-6,5	-31,4
Hs.184093	Homo sapiens cDNA, 3' end	-5,7	-3,3
Hs.134491	Homo sapiens transcribed sequences	-4,9	-3,5
Hs.445835	DJ667H12.2: hypothetical protein DJ667H12.2	-4,3	-5,2
Hs.61268	C2orf7: chromosome 2 open reading frame 7	-4,0	-3,6

Unigene Cluster	Genbezeichnung	CF	
		KM12	
		L4A	SM

EST/Potentielle ORF (Fortsetzung)

Hs.280387	Homo sapiens, clone IMAGE: 4753714, mRNA	-3,1	-2,1
Hs.317821	MGC13251: hypothetical protein MGC13251	-2,6	-2,3
Hs.381430	Homo sapiens cDNA FLJ26252 fis, clone DMC03335 (AI832118)	-2,1	-2,4

Tabelle 3.2: Auflistung der in den metastasierenden Zelllinien KM12L4A und KM12SM als reprimiert (im Vergleich zur nicht-metastasierenden Zelllinie KM12C) bestimmten Gene und EST. Insgesamt wurden 32 Gene ermittelt, die mit einem CF von < -2 reprimiert waren. Diese Gene wurden nach der UniGene-Datenbank annotiert und nach der Funktion oder Lokalisierung der Proteinprodukte klassifiziert. Eine zusätzliche Klasse fasst die 13 reprimierten EST und potentiellen ORF zusammen. Die differentielle Expression des fett gedruckt hervorgehobenen EST/Potentiellen ORF wurde mittels einer „Northernblot“-Analyse bestätigt.

In Tabelle 3.3 ist die Verteilung der induzierten und reprimierten Gene im KM12-Zellsystem auf die 11 Kategorien (sowie zusätzliche EST/ Potentielle ORF) aufgelistet.

Kategorien	Anzahl an deregulierten Genen	Anzahl an induzierten Genen (CF > 2)	Anzahl an reprimierten Genen (CF < -2)
Immunantwortassoziierte Proteine	5	5	0
Enzyme	34	27	7
Transmembran-Proteine	20	19	1
Sezernierte Proteine	8	8	0
Zytoskelett- oder EZM-assoziierte Proteine	8	5	3
Transkription- oder Translation-assoziierte Proteine	18	11	7
Signalmoleküle	10	9	1
Zellzyklus- oder Apoptose-assoziierte Proteine	7	4	3
Transportmoleküle	11	6	5
Proteine anderer Funktion	24	19	5
EST/Potentielle ORF	37	24	13

Tabelle 3.3: Klassifizierung der Gene, die in beiden metastasierenden Zelllinien des KM12-Zellsystems dereguliert waren, nach der Funktion oder Lokalisation der Proteinprodukte.

Insgesamt wurden 182 Gene mit Oligonukleotid-Mikroarrays identifiziert, die in den Zelllinien KM12SM und KM12L4A als dereguliert bestimmt wurden. Diese konnten in 11 Kategorien eingeteilt werden. EST und potentielle ORF wurden gesondert gruppiert.

3.1.2 Bestätigung der Genchip-Ergebnisse mit „Northernblot“-Analysen

3.1.2.1 Bestätigung von deregulierten Genen

Um die Möglichkeit „falsch-positiver“ Ergebnisse für die mit den Genchips erhaltenen Daten auszuschließen, hätten entweder noch deutlich mehr Expressionsprofile miteinander verglichen werden müssen, oder die Ergebnisse mussten zusätzlich mit anderen Techniken bestätigt werden. Eine eindeutige Aussage, ob ein Gen induziert oder reprimiert vorliegt, erhält man mit der „Northernblot“-Analyse von RNA (siehe Kapitel 2.2.3.1.9). Zusätzlich erhält man mit der „Northernblot“-Analyse wichtige Informationen über die Größe des untersuchten Transkripts. Deshalb wurden mit der „Northernblot“-Analyse einige Kandidatengene aus verschiedenen Kategorien auf ihre differentielle Expression in den Zelllinien überprüft (Tab. 3.1 und 3.2, fett gedruckt hervorgehoben). Der Schwerpunkt wurde dabei auf Gene gelegt, die in beiden metastasierenden Zelllinien induziert waren, um potentielle Kandidaten für eine Antikörper-basierte Therapie zu identifizieren. Untersucht wurden die Transkripte von: FUT4, S100A13, TMSB4X, CA12, NET-7, VIM, BCMP11, TACSTD2, HSPG2, RGS2, MUC3B und MDK (Abb. 3.2 A - L).

Zusätzlich zur Fucosyltransferase 4 (FUT4) die in beiden metastasierenden Zelllinien induziert vorlag, wurden interessanterweise in der Zelllinie KM12SM noch zwei weitere $\alpha(1,3)$ -Fucosyltransferasen, FUT6 (CF: 46,5) und FUT3 (CF: 6,6), als induziert identifiziert. Die „Northernblot“-Analyse bestätigte die erhöhten Spiegel an FUT3- und FUT6-mRNA in der KM12SM-Zelllinie (Abb. 3.2 M und N).

Insgesamt wurde die Deregulierung von 14 Genen, deren Sequenz in voller Länge bekannt ist, mittels einer „Northernblot“-Analyse untersucht (siehe Kapitel 2.2.3.1.9 und 2.2.3.1.10). Von 13 der 14 untersuchten Transkripte konnte die Genchip-Analyse vollständig bestätigt werden. Ein erhöhter mRNA-Spiegel des sezernierten Proteins Midkine (MDK, Abb. 3.2 L) konnte nur in der Zelllinie KM12L4A bestätigt werden, während in KM12SM das 1,0 kb große Transkript im Vergleich zu KM12C schwächere Hybridisierungssignale zeigte. Dies stand im Kontrast zur Genchip-Analyse, bei der in beiden Zelllinien Midkine als induziert bestimmt wurde.

Als interne RNA-Auftragskontrolle wurde jeder Blot abschließend „gestrippt“ und mit einer [α -³²P]dATP-markierten cDNA von β -Aktin (ACTB, Abb. 3.2 O) oder GAPD- (Abb. 3.2 P) hybridisiert, von denen exemplarisch jeweils eine Hybridisierung gezeigt ist.

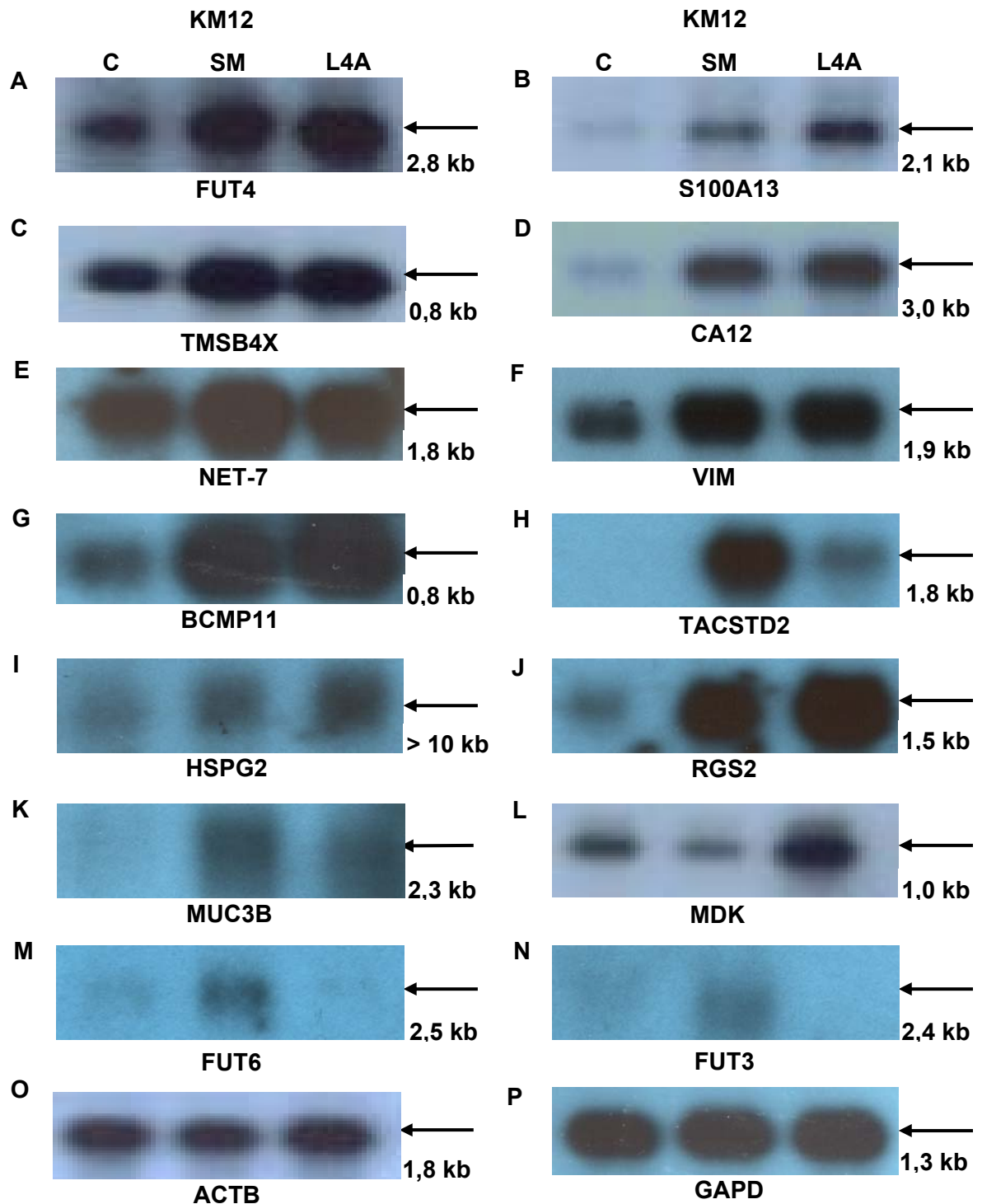


Abbildung 3.2: „Northernblot“-Analyse von ausgewählten Genen, von denen in der Genchip-Analyse eine erhöhte Expression in den metastasierenden Zelllinien bestimmt wurde.

Die meisten, der analysierten Kandidaten sind in Tabelle 3.1 klassifiziert: FUT4, S100A13, TMSB4X, CA12, NET-7, VIM, BCMP11, TACSTD2, HSPG2, RGS2, MUC3B und MDK (A–L). Zusätzlich wurden noch FUT6 (M) und FUT3 (N) auf ihre differentielle Expression überprüft. Für die Ladungskontrolle wurden die Blots abschließend „gestrippt“ und mit cDNA von ACTB (O) oder GAPD (P) hybridisiert. Die Pfeile weisen auf die spezifischen Hybridisierungssignale in den jeweils angegebenen Größen.

Die verwendete RNA stammte aus den Experimenten für die Genchip-Analyse. Jeweils 1 µg aufgetrennte mRNA der Zelllinien KM12C, KM12SM und KM12L4A wurden mit [α - 32 P]dATP-markierten, spezifischen Sonden hybridisiert.

3.1.2.2 Bestätigung von deregulierten EST-Sequenzen

Mit Hilfe der HG-U95B-E-Arrays wurden unter stringenten Auswahlkriterien (siehe Kapitel 3.1.1) insgesamt 37 Teilsequenzen von potentiellen humanen Genen als dereguliert in den beiden metastasierenden Zelllinien bestimmt (Stand: Juni 2004). Zumeist konnten mehrere differentiell exprimierte EST-Sequenzen einer „Konsensussequenz“ zugeordnet werden (mit entsprechender „UniGene Cluster“-Nummer). Hiervon wurde jeweils nur die EST-Sequenz mit dem höchsten CF in die Tabelle 3.1 oder 3.2 aufgenommen. Somit konnten mit den Genchips 24 EST oder potentielle ORF identifiziert werden, die in beiden metastasierenden Zelllinien induziert waren. Dementsprechend lagen 13 EST oder potentielle ORF in den metastasierenden Zellen im Vergleich zu den Primärtumorzellen als reprimiert vor (Tab. 3.1, 3.2 und 3.3). Die EST wurden mittels einer „elektronischen Northernblot“-Analyse (Datenbank der Firma Incyte) *in silico* auf ihre gewebespezifische Verteilung vorselektiert. Ein weiteres Kriterium für eine zusätzliche „Northernblot“-Analyse mit einem EST war die Art des Gewebes aus dem die cDNA-Bank ursprünglich gewonnen wurde. Der Fokus lag hierbei primär auf EST, die zuerst in kolorektalem Gewebe identifiziert wurden.

Die mit der Genchip-Analyse bestimmte differentielle Expression konnte von 9 EST mittels „Northernblot“-Analyse bestätigt werden (Abb. 3.3). Zur Detektion wurden entweder EST-spezifische cDNA-Klone der Firma Incyte verwendet (siehe Kapitel 2.1.10) oder spezifische Sonden-cDNA mittels RT-PCR generiert (siehe Kapitel 2.1.11). In Tabelle 3.4 sind diese 9 bestätigten EST näher charakterisiert. Von vier der neun EST, die im März 2001 in den metastasierenden Zelllinien als dereguliert bestimmt wurden, waren im Juni 2004 die Proteinprodukte ihrer Konsensussequenzen annotiert (MPP5, SQRDL, PRKWINK2, SNX25). Die in der „Northernblot“-Analyse identifizierten Längen der Transkripte, denen die EST zugeordnet wurden (Abb. 3.3 A, E, F und G), korrelierten in allen Fällen mit den später in der UniGene-Datenbank publizierten Längen.

MPP5 (PALS1, „Stardust“, Abb. 3.3 A) wurde als ein Mitglied der Familie der peripheren Membranassoziierten Guanylatkinasen (MAGUK) identifiziert, deren Funktion in der Tumorunterdrückung und als Gerüstbildner für Multiproteinkomplexe an epithelialen Zell-Zell-Kontaktstellen beschrieben wurde (Hanada *et al.*, 2000). Hierbei spielt MPP5 als Komponente des Multiproteinkomplexes Crumbs-MPP5-PATJ eine wichtige Rolle in der Bildung von „tight junctions“ und somit in der Etablierung der Zellpolarität von Säugetier-epithelien (Hurd *et al.*, 2003). In der „Northernblot“-Analyse wurde mit einer spezifischen Sonde für das EST AA203294 ein 5,5 kb großes Transkript für MPP5 erhalten.

Das EST AI804917 umfasste eine Teilsequenz für das Gen des Enzyms **SQRDL** („Sulfide Quinone Reductase Like“, Abb. 3.3 E). Die Sulfid/Quinone Reduktase wurde zuerst in den Mitochondrien der Hefe *S. pombe* identifiziert, als nach der Zugabe von Cadmium ein Defekt im Schwefelmetabolismus auftrat (Vande Weghe und Ow, 1999). Potentiell funktionelle, homologe Sequenzen zu dem Sulfid-oxidierenden Enzym wurden auch im Menschengenom identifiziert. Über deren Funktion ist bisher aber noch nichts genaueres bekannt. In der „Northernblot“-Analyse wurde ein 1,7 kb großes Transkript für SQRDL erhalten.

PRKWINK2 (Abb. 3.3 F) wurde der WNK- („With No Lysine, Kinase“-) Familie der Serin /Threonin-Kinasen zugeordnet, denen die Aminosäure Lysin in der Kinasedomäne fehlt. Diese wurde lange Zeit als unerlässlich für die Kinaseaktivität gehalten, da sie für die Bindung an ATP notwendig ist (Xu *et al.*, 2000). Yang *et al.* (2003) identifizierten eine erste mögliche Funktion von PRKWINK2 in der Regulation des Thiazid-sensitiven NaCl-Cotransporters (NCC) im distalen Nephron beim Auftreten eines Pseudohyperaldosteronismus. In der „Northernblot“-Analyse wurde für PRKWINK2 ein 7,0 kb großes Transkript identifiziert.

Das EST AW008976 wurde dem Gen das für **SNX25** kodiert, zugeordnet (Abb. 3.3 G). „Sorting Nexin 25“ gehört zur Gruppe der „sortierenden“ Nexine. Diese besteht aus zellulären Transportproteinen, denen allen ein Phospholipid-Bindungsmotif - die PX-Domäne - gemeinsam ist. Die Fähigkeit dieser Proteine, spezifisch an Phospholipide zu binden und Protein-Proteinkomplexe zu bilden, weist auf eine Rolle im Membrantransport und der Proteinsortierung hin. Bisher ist noch nicht bekannt, ob die einzelnen Nexine spezifische oder eher eine universelle Funktion beim Proteintransport haben (Worby und Dixon, 2002). In der „Northernblot“-Analyse wurde ein 3,3 kb großes Transkript für SNX25 erhalten.

Die differentielle Expression der induzierten EST-Sequenzen oder der potentiellen ORF AA309047/C20orf92 (1,5 kb, Abb. 3.3 B), AI344053/LOC374699 (4,2 kb und 4,8 kb, Abb. 3.3 C), AI344189 (5,0 kb, Abb. 3.3 D) und AI739241 (2,2 kb, Abb. 3.3 H) konnte in der „Northernblot“-Analyse bestätigt werden. Ferner konnte dem in der Genchip-Analyse als reprimiert bestimmten EST AI832118/FLJ26252 *fis* in der „Northernblot“-Analyse ein 2,3 kb großes, reprimiertes Transkript zugeordnet werden (Abb. 3.3 I).

In Abbildung 3.3 J ist eine repräsentative β -Aktin (ACTB) Ladungskontrolle dargestellt, wie sie für jeden „Northernblot“ abschließend durchgeführt wurde.

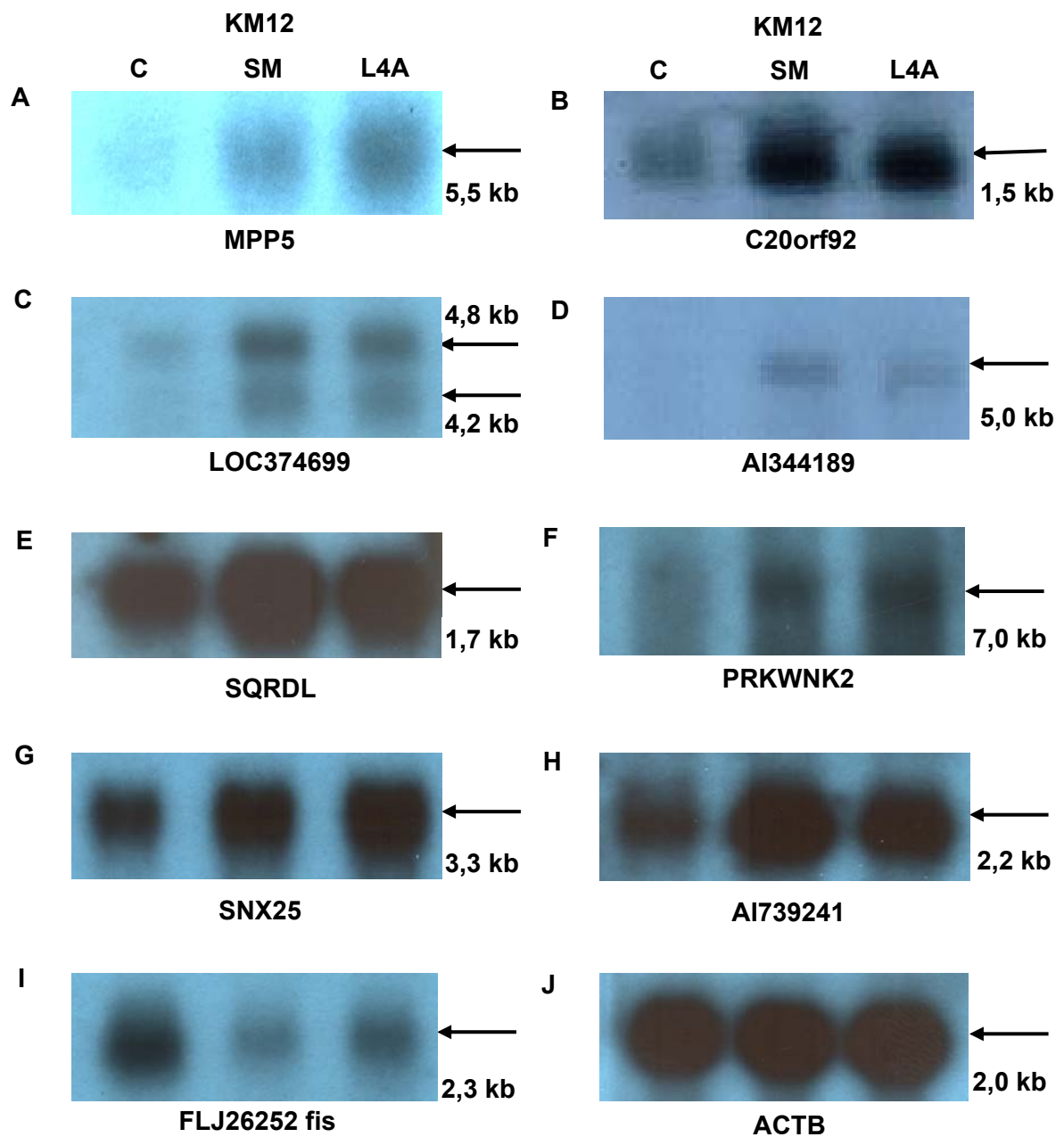


Abbildung 3.3: „Northernblot“-Analyse von ausgewählten deregulierten EST.

Acht der neun analysierten Kandidaten sind in Tabelle 3.1 klassifiziert, MPP5, C20orf92, LOC374699, AI344189, SQRDL, PRKWNK2, SNX25 und AI739241 (A–H) und waren in den metastasierenden Zelllinien KM12SM und KM12L4A induziert. Das EST AI832118/FLJ26252 fis (I) ist in den metastasierenden Zelllinien reprimiert und wird in Tabelle 3.2 aufgeführt. Zur Ladungskontrolle wurden die Blots abschließend „gestrippt“ und mit einer cDNA von ACTB (J) hybridisiert. Die Pfeile weisen auf die spezifischen Hybridisierungssignale in den jeweils angegebenen Größen. Die verwendete RNA stammte aus den Experimenten für die Genchip-Analyse. Jeweils 1 µg aufgetrennte mRNA der Zelllinien KM12C, KM12SM und KM12L4A wurden mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ -markierten, spezifischen Sonden hybridisiert.

EST GenBank Acc-Nr.	UniGene Cluster (03/2001)	UniGene Bezeichnung (03/2001)	Ursprungsgewebe der cDNA-Bibliothek	UniGene Bezeichnung (06/2004)	UniGene Cluster (06/2004)	Volle Länge bekannt ?
AA203294	Hs.13399	clone 25032 mRNA	Fötale Leber und Milz	MPP5: „Membrane Protein, Palmitoylated 5“ („MAGUK p55 Subfamily Member 5“)	Hs.109122	5357 bp
AA309047	Hs.11197	Homo sapiens cDNA, 5' end	Kolonkarzinom Zelllinie (Caco-2)	C20orf92: „Chromosome 20 open reading frame 92“	Hs.408427	1476 bp
AI344053	Hs.115838	Homo sapiens cDNA, 3' end	Kolontumor	LOC374699: LOC374699	Hs.115838	Nein
AI344189	Hs.9842	Homo sapiens cDNA, 3' end	Kolontumor	Homo sapiens transcribed sequences	Hs.9842	Nein
AI804917	Hs.8185	Homo sapiens cDNA, 3' end	Prostata-Normalgewebe	SQRDL: „Sulfide Quinone Reductase Like (yeast)“	Hs.435468	1690 bp
AI832477	Hs.22386	Homo sapiens cDNA, 3' end	Kolon-Normalgewebe	PRKWNK2: „Protein Kinase, Lysine Deficient 2“	Hs.232116	6834 bp
AW008976	Hs.42768	Homo sapiens cDNA, 3' end	Kolon-Normalgewebe	SNX25: „Sorting Nexin 25“	Hs.380726	3237 bp
AI739241	Hs.171480	Homo sapiens cDNA, 3' end	Kolontumor	Homo sapiens transcribed sequences	Hs.171480	Nein
AI832118	Hs.88179	Homo sapiens cDNA, 3' end	Kolontumor	Homo sapiens cDNA FLJ26252 fis	Hs.381430	Nein

Tabelle 3.4: Auflistung der in den metastasierenden Zelllinien KM12SM und KM12L4A deregulierten EST (im Vergleich zur nicht-metastasierenden Zelllinie KM12C) deren differentielle Expression mit der „Northernblot“-Analyse bestätigt wurde.

Die differentielle Expression konnte von 9 EST bestätigt werden. Von vier der neun im Rahmen der Arbeit untersuchten EST sind bis Juni 2004 die Proteinprodukte annotiert worden (fett gedruckt hervorgehoben). Zu fünf EST waren im Juni 2004 noch keine Proteinprodukte bekannt, allerdings veränderte sich teilweise die Bezeichnung bzw. die „UniGene Cluster“-Nummer. Sieben der neun ausgewählten EST wurden ursprünglich aus cDNA-Bibliotheken von Kolongeweben erhalten.

3.2 Expressionsstudien mit ausgewählten EST

3.2.1 „Multiple Tissue Expression“-Array

Es wurden von 5 ausgewählten EST-Sequenzen spezifische Sonden zur Hybridisierung eines humanen „Multiple Tissue Expression“- (MTE-) Array radioaktiv markiert (siehe Kapitel 2.1.7.2). Der MTE-Array enthielt normalisierte Poly(A)-mRNA von 76 verschiedenen humanen Geweben und acht verschiedene Kontroll-RNA und DNA (Abb. 3.4 A, Spalte 12). Auf die Nylonmembranen wurden als Positivkontrollen in die Planquadrate F6-H6 jeweils 1 µg, 0,5 µg und 0,1 µg Poly(A)-mRNA aufgetragen. Diese Kontroll-mRNA wurde entweder aus der Zelllinie KM12SM isoliert, um induzierte EST zu untersuchen oder aus der Zelllinie KM12C, wenn ein reprimiertes EST untersucht werden sollte. Die Sonden wurden wie in Kapitel 2.2.3.1.10.2 beschrieben [α -³²P]dATP-markiert und nach der Methode in Kapitel 2.2.3.1.11 hybridisiert. Die Exposition erfolgte auf einem Röntgenfilm bei -80°C für jeweils 48 h. In Abbildung 3.4 A sind die Positionen der Gewebe auf dem MTE-Array dargestellt.

Das **EST AA309047** zeigte eine ubiquitäre Expression in allen repräsentierten Normalgeweben und eine etwas abgeschwächte Expression in den Leukämie-, Lymphom- und Lungenkarzinom-Zelllinien (Abb. 3.4 B, Spalte 11). Die Expressionshöhe von AA309047 in der kolorektalen Adenokarzinom-Zelllinie SW480 (G10) war vergleichbar zu den kolorektalen Normalgeweben (H5 und A6-C6). Die MTE-Arrays konnten bis zu zweimal „gestrippt“ (siehe Kapitel 2.2.3.1.9.4) und wiederverwendet werden, deshalb waren in den Planquadranten F3-H3 dieses MTE-Arrays zusätzliche Positivkontrollen eines vorhergehenden Versuches aufgetragen.

Das **EST AI344053** (Abb. 3.4 C) wurde ursprünglich aus einem Kolontumor isoliert und zeigte nur sehr schwache Hybridisierungssignale mit RNA aus Magen- (B5) und Plazentagewebe (B8).

Eine für das **EST AI344189** (Abb. 3.4 D) spezifische Sonde hybridisierte am stärksten an isolierte mRNA aus dem Duodenum (C5), dem Magen (B5) und der Leber (A9). Weitere Signale waren nur noch in Uterusgewebe (D8) und in Pankreas (B9) zu erkennen. Das schwache Hybridisierungssignal an *E. coli* DNA (D12) erklärt sich aus der Isolierung der Sonden-cDNA aus Plasmid-DNA von *E. coli* Kulturen.

Eine spezifische Sonde für das **EST AI739241** das ursprünglich aus einem Kolontumor isoliert wurde, erzeugte ein ubiquitäres Expressionsmuster (Abb. 3.4 E).

Das **EST AI832118** war das einzige untersuchte EST, das in den metastasierenden Zelllinien als reprimiert bestimmt wurde. Es wurde zusätzlich für eine Gewebeanalyse mit dem MTE-Array ausgewählt, da die Sequenz in einer „elektronischen Northernblot“-Analyse eine sehr spezifische Expression für Kolon-Tumorgewebe aufwies. Das *in silico* erhaltene Expressionsprofil konnte aber mit dem MTE-Array nur bedingt bestätigt werden. Zwar wurde für das EST AI832118 eine mittelstarke Expression in der kolorektalen Adenokarzinom-Zelllinie SW480 (G10) detektiert, allerdings trat eine schwache bis mittelstarke Expression ebenfalls in allen analysierten Normalgeweben der Eingeweide (Spalten 5 und 6) auf. Die stärkste Expression zeigte AI832118 in den Lymphknoten (F7), während in den unterschiedlichen Geweben des adulten Gehirns keine entsprechenden Transkripte detektierbar waren (Abb. 3.4 F, Spalten 1-3).

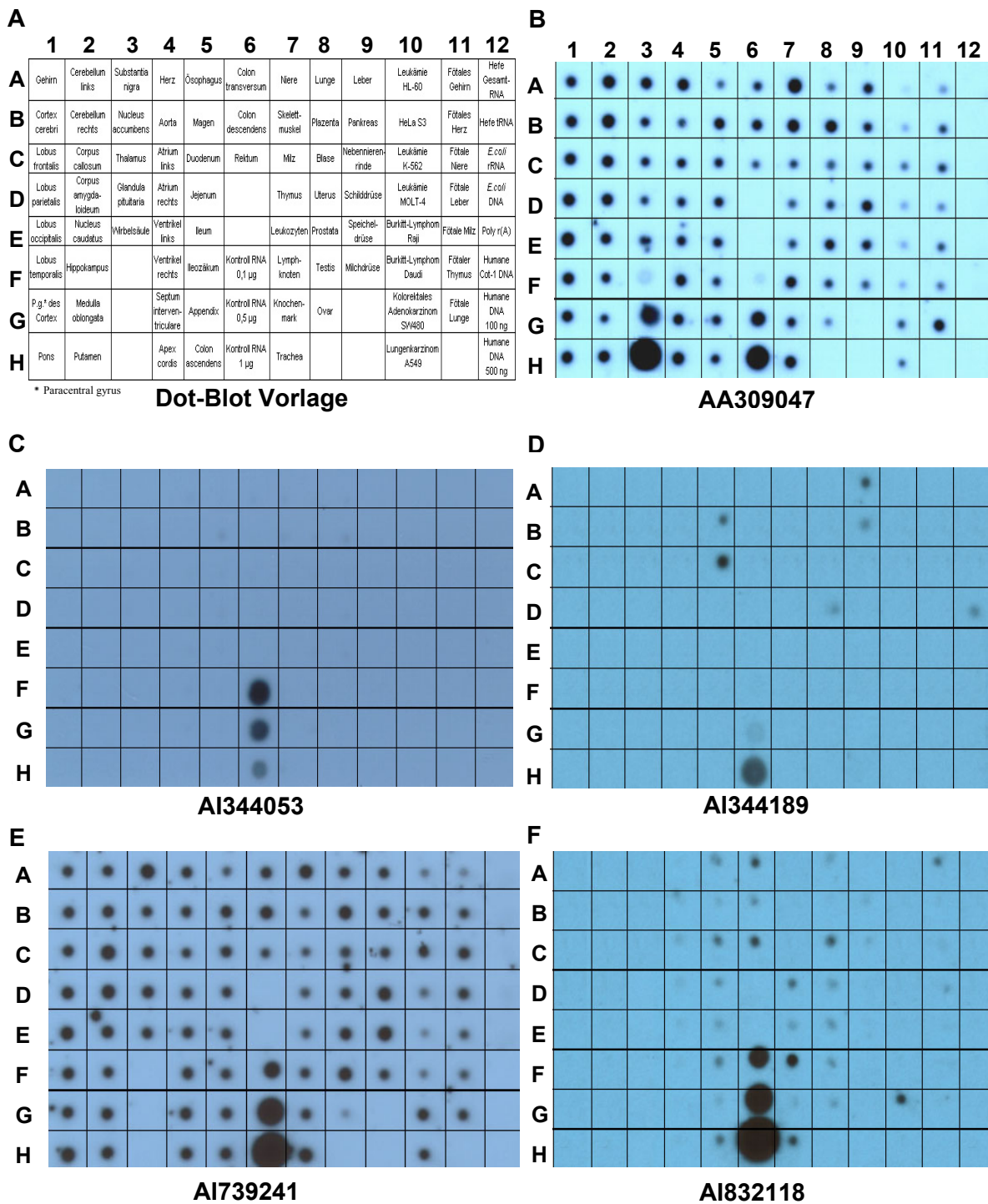


Abbildung 3.4: Expressionsanalyse von deregulierten EST mit einem MTE-Array. Der MTE-Array enthält 76 gewebespezifische Poly(A)-mRNA deren Position in A dargestellt ist. Die Expressionsstärke von vier induzierten EST AA309047 (B), AI344053 (C), AI344189 (D) und AI739241 (E) sowie des reprimierten EST AI832118 (F) wurde in dem großen Spektrum an fötalen und adulten Geweben sowie in einigen Tumor-Zelllinien untersucht. Als Positivkontrollen wurden in die Planquadrate F6-H6 der Arrays B-E jeweils 1 µg, 0,5 µg und 0,1 µg isolierte Poly(A)-mRNA der Zelllinie KM12SM aufgetragen. Für das reprimierte EST AI832118 wurden auf den Array entsprechend jeweils 1 µg, 0,5 µg und 0,1 µg isolierte Poly(A)-mRNA der Zelllinie KM12C als Positivkontrolle aufgetragen (F). In Abb. 3.4 B sind in den Planquadraten F3-H3 des Arrays zusätzliche Positivkontrollen eines vorhergehenden Versuches sichtbar. Die Sonden-cDNA für das EST AI344189 wurde aus Plasmid-DNA von *E. coli* Kulturen isoliert und zeigt ein schwaches Hybridisierungssignal für *E. coli*-DNA (D, Planquadrat D12). Für die Ladungskontrolle wurden die Arrays anschließend „gestrippt“ und mit einer vom Hersteller beigefügten cDNA von Ubiquitin B hybridisiert (siehe Kapitel 3.7.2, Abb. 3.21 B).

3.2.2 „Cancer Gene Screening Total RNA Dot“-Blot

Die Expressionsanalyse in Normalgeweben mit dem MTE-Array wurde für das **EST AI739241** auf die vergleichende Analyse von Primärtumoren und deren korrespondierenden Normalgeweben ausgeweitet. Hierzu wurde der humane „Cancer Gene Screening Total RNA Dot“-Blot verwendet (siehe Kapitel 2.1.7.2), auf dem je 5 µg isolierte Gesamt-RNA aus 48 Paaren von Tumor- und korrespondierenden Normalgeweben nebeneinander aufgetragen waren. Die Position der Gewebe auf dem Blot ist in Abbildung 3.5 A dargestellt, wobei die Spalten mit Normalgeweben gelb unterlegt sind. An den rechten Rand sind als Positivkontrollen 5 µg, 1 µg und 0,5 µg isolierte Gesamt-RNA der Zelllinie KM12SM aufgetragen. Die für das EST spezifische Sonden-cDNA wurde bereits für die „Northernblot“-Analyse verwendet (siehe Kapitel 3.1.2.2, Abb. 3.3 H) und war mittels einer RT-PCR auf isolierte mRNA der Zelllinie KM12SM generiert worden. Die hierfür verwendeten Primer AI739241_for und _rev sind in Kapitel 2.1.11 aufgeführt. Die Hybridisierung des Blots mit der [α - 32 P]dATP-markierten Sonde erfolgte wie in Kapitel 2.2.3.1.11 beschrieben. Zur Signaldetektion wurde ein Röntgenfilm bei -80°C für 48 h exponiert.

Das mit dem MTE-Array erhaltene ubiquitäre Expressionsprofil für die EST-Sequenz AI739241 (siehe Kapitel 3.2.1, Abb. 3.4 E) wurde durch die Hybridisierung des „Cancer Gene Screening“-Blots bestätigt (Abb. 3.5 B). Allerdings waren zum Teil deutliche Unterschiede der Expressionsstärke in Tumorgeweben zu den korrespondierenden Normalgeweben zu erkennen. Interessanterweise wurde in allen kolorektalen Adenokarzinomen (C5-F5) ein erhöhter RNA-Spiegel im Vergleich zum Normalgewebe (C6-F6, fett umrandet) festgestellt.

Der Befund einer Induktion des EST AI739241 in kolorektalen Primärtumoren konnte zuvor mit dem MTE-Array nicht erkannt werden, da dieser kein Tumorgewebe enthielt. Somit erwies sich der „Cancer Gene Screening Total RNA Dot“-Blot als sinnvolle Ergänzung des MTE-Arrays für die Expressionsanalyse eines Gens oder EST.

A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Brain Astrocytoma	Brain Normal	Pharynx /Throat Squamous cell carcinoma	Pharynx /Throat Normal	Duodenum Tumor	Duodenum Normal	Gallbladder Tumor	Gallbladder Normal	Testis Tumor	Testis Normal	Thyroid Follicular Adenocarcinoma	Thyroid Normal
B	Brain Neurolenoma	Brain Normal	Esophagus Squamous cell carcinoma Poorly differentiated	Esophagus Normal	Small Intestine Tumor	Small Intestine Normal	Pancreas Tumor	Pancreas Normal	Ovary Adenocarcinoma	Ovary Normal	Thyroid Follicular Adenoma	Thyroid Normal
C	Brain Meningioma	Brain Normal	Esophagus Squamous cell carcinoma Moderately differentiated	Esophagus Normal	Colon Adenocarcinoma Poorly differentiated	Colon Normal	Parotid Tumor	Parotid Normal	Ovary Thecoma	Ovary Normal	Thyroid Papillary Adenocarcinoma	Thyroid Normal
D	Lung Squamous cell carcinoma Poorly differentiated	Lung Normal	Esophagus Adenocarcinoma	Esophagus Normal	Colon Adenocarcinoma Well differentiated	Colon Normal	Kidney Granular Cell Carcinoma	Kidney Normal	Ovary Teratoma	Ovary Normal	Adrenal Tumor	Adrenal Normal
E	Lung Squamous cell carcinoma Moderately differentiated	Lung Normal	Stomach Squamous cell carcinoma	Stomach Normal	Rectum Adenocarcinoma Poorly differentiated	Rectum Normal	Kidney Clear Cell Carcinoma	Kidney Normal	Uterus Leiomyoma	Uterus Normal	Thymus Tumor	Thymus Normal
F	Lung Adenocarcinoma Poorly differentiated	Lung Normal	Stomach Adenocarcinoma Poorly differentiated	Stomach Normal	Rectum Adenocarcinoma Moderately differentiated	Rectum Normal	Bladder Transitional Cell Carcinoma Grade II	Bladder Normal	Uterus Adenocarcinoma	Uterus Normal	Lymphoma Lymphoma	Lymphoma Normal Lymph Node
G	Lung Adenocarcinoma Moderately differentiated	Lung Normal	Stomach Adenocarcinoma Moderately differentiated	Stomach Normal	Liver Hepatocellular carcinoma Poorly differentiated	Liver Normal	Bladder Transitional Cell Carcinoma Grade III	Bladder Normal	Breast Invasive Ductal Carcinoma	Breast Normal	Non-Hodgkin's Lymphoma Lymphoma	Non-Hodgkin's Lymphoma Normal Lymph Node
H	Lung Alveolar carcinoma	Lung Normal	Stomach Adenocarcinoma Well differentiated	Stomach Normal	Liver Hepatocellular carcinoma Moderately differentiated	Liver Normal	Prostate Tumor	Prostate Normal	Breast Fibroadenoma	Breast Normal	Soft Tissue Malignant Fibrous Histiocytoma	Soft Tissue Normal

B

Dot-Blot Vorlage

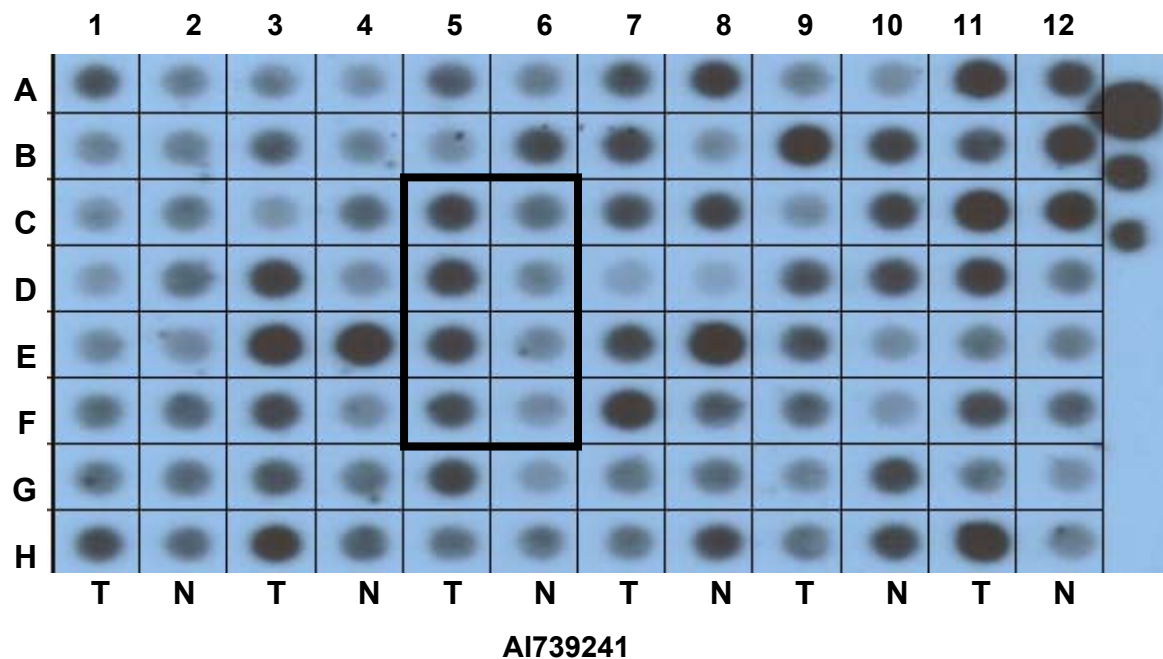


Abbildung 3.5: Erweiterte Expressionsanalyse des induzierten EST AI739241 mit dem „Cancer Gene Screening Total RNA Dot“-Blot.

Der humane „Cancer Gene Screening Total RNA Dot“-Blot enthielt 96 gewebespezifische Gesamt-RNA-Isolate, deren Positionen auf dem Array in A dargestellt sind. Die Expressionsstärke des EST AI739241 (B) wurde in dem großen Spektrum an Primärtumoren und korrespondierenden Normalgeweben untersucht. Als Positivkontrolle wurde auf den rechten Rand des Blots jeweils 5 µg, 1 µg und 0,5 µg isolierte Gesamt-RNA der Zelllinie KM12SM aufgetragen. Die Spalten mit Tumorgeweben (T) und Normalgeweben (N) sind gekennzeichnet. Die Positionen von RNA-Isolaten aus kolorektalem Gewebe sind durch eine Umrandung hervorgehoben.

Für die Ladungskontrolle wurde der Arrays anschließend „gestrippt“ und mit einer vom Hersteller beigefügten cDNA von Ubiquitin B hybridisiert. Es wurden vergleichbare Hybridisierungssignale für alle aufgetragenen RNA erhalten (Abb. nicht gezeigt).

3.3 Genexpressionsanalyse mit dem HCT116-Zellmodell

3.3.1 Deregulierte Gene im HCT116-Zellmodell

Innerhalb der 182 deregulierten Genen und EST im KM12-Zellmodell sollten neue Kandidaten identifiziert werden, die in den Prozess der kolorektalen Metastasierung involviert sind. Um den Kreis der Kandidatengene weiter einzugrenzen, wurde von einem zweiten CRC-Zellmodell ebenfalls ein Genexpressionsprofil mit Oligonukleotid-Mikroarrays erstellt und dieses mit dem zuvor erstellten Expressionsprofil der KM12-Zellen verglichen. Als zweites Zellmodell wurde die nicht-metastasierende Kolon-Primärtumor-Zelllinie HCT116 und deren stark metastasierender Abkömmling HCT116U5.5 verwendet. Hierbei sollte beachtet werden, dass der Zellklon HCT116U5.5 eine stark zur Lunge metastasierende Variante von HCT116-Zellen repräsentierte (siehe Kapitel 2.1.13.2), während die KM12SM- und KM12L4A-Zellen hauptsächlich in die Leber metastasierten.

Von den HCT116- und HCT116U5.5-Zellen wurde die RNA jeweils dreimal isoliert und die daraus synthetisierten cDNA einer *in vitro*-Transkription unterzogen. Daraufhin wurde von jeder erstellten, Biotin-markierten cRNA ein Hybridisierungscocktail hergestellt (siehe Kapitel 2.2.3.1.8.2) und damit jeweils ein HG-U95Av2-Genchip hybridisiert. Zur Bestimmung von differentiell exprimierten Genen und EST wurden die absoluten Genchip-Analysen mit der Primärtumor-Zelllinie HCT116 als Basislinien definiert. Der Fokus der vergleichenden Analysen wurde im Vorfeld auf bereits annotierte Gene gelegt, woraufhin mit dem HCT116-Zellmodell nur der HG-U95Av2-Genchip des HG-U95-Sets hybridisiert wurde. Dieser repräsentierte über 12000 Sequenzen von Genen, deren volle Längen bekannt waren, und von denen (zumeist) bereits Funktionen der Proteinprodukte bekannt waren (siehe Kapitel 2.2.3.1.8.4). Die Auswertung der Genchip-Analyse erfolgte nach den für das KM12-Zellmodell etablierten Kriterien (siehe Kapitel 3.1.1).

Von den 12652 analysierten Genen des Arrays waren 72 (0,6%) in den metastasierenden Zellen dereguliert. Hiervon waren 43 Gene in den HCT116U5.5-Zellen im Vergleich zu den HCT116-Zellen um einen CF von > 2 induziert, 29 Gene waren um einen CF von < -2 reprimiert. Diese Gene wurden mit Hilfe der UniGene-Datenbank annotiert und klassifiziert (Tab. 3.5 und 3.6). Die differentiell exprimierten Gene des HCT116-Zellmodells konnten nach der Funktion oder Lokalisierung ihrer Proteinprodukte in 11 Kategorien gruppiert werden: Immunantwortassoziierte Proteine, Enzyme, Transmembran-Proteine, sezernierte Proteine, Zytoskelett- oder EZM-assoziierte Proteine, Transkription- oder Translation-assoziierte Proteine, Signalmoleküle, Zellzyklus- oder Apoptoseassoziierte Proteine, Transportmoleküle und Proteine anderer Funktion. EST und potentielle ORF wurden gesondert klassifiziert. Es ist zu beachten, dass für diese Analyse lediglich der HG-U95Av2-Genchip hybridisiert wurde, auf dem nur wenige EST-Oligosequenzen synthetisiert waren.

Unigene Cluster	Genbezeichnung	CF
		HCT116U5.5

Immunantwortassoziierte Proteine

Hs.80358	JARID1D: Jumonji, AT rich interactive domain 1D	7,1
Hs.13131	LNK: lymphocyte adaptor protein	2,1

Enzyme

Hs.99120	DDX3Y: DEAD box polypeptide 3, Y-linked	12,1
Hs.390567	FYN: FYN oncogene related to SRC, FGR, YES	7,1
Hs.1519	PRKAR1B: protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta	3,1
Hs.251871	CTPS: CTP synthase	2,7
Hs.512708	TGM2: transglutaminase 2	2,6
Hs.314828	UPP1: uridine phosphorylase 1	2,3
Hs.118722	FUT8: fucosyltransferase 8 (alpha (1,6) fucosyltransferase)	2,2
Hs.355867	MARS: methionine-tRNA synthetase	2,0

Transmembran-Proteine

Hs.351316	TM4SF1: transmembrane 4 superfamily member 1	180,1
Hs.181097	TNFSF4: tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4	109,3
Hs.23582	TACSTD2: tumor-associated calcium signal transducer 2	27,7
Hs.512682	CEACAM1: carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	11,1
Hs.799	DTR: diphtheria toxin receptor	7,7
Hs.193852	ABCC2: ATP-binding cassette, sub-family C, member 2	3,9

Sezernierte Proteine

Hs.279651	MIA: melanoma inhibitory activity	35,2
Hs.79361	KLK6: kallikrein 6 (neurosin, zyme)	4,9
Hs.83450	LAMA3: laminin, alpha 3	4,0
Hs.172816	NRG1: neuregulin 1	3,8
Hs.297681	SERPINA1: serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 1	2,9
Hs.55279	SERPINB5: serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 5	2,6

Zytoskelett- oder EZM-assoziierte Proteine

Hs.446417	KRT6E: keratin 6E	16,7
Hs.435800	VIM: vimentin	5,8
Hs.422550	AIM1: absent in melanoma 1	4,1

Transkription- oder Translationassoziierte Proteine

Hs.180911	RPS4Y: ribosomal protein S4, Y-linked	7,8
Hs.182432	HIST1H2BM: histone 1, H2bm	2,4

Signalmoleküle

Hs.111554	ARL7: ADP-ribosylation factor-like 7	8,7
Hs.141492	RGS20: regulator of G-protein signalling 20	2,8
Hs.153489	ASB1: ankyrin repeat and SOCS box-containing 1	2,1

Zellzyklus- oder Apoptoseassoziierte Proteine

Hs.408658	CCNE2: cyclin E2	4,0
Hs.244723	CCNE1: cyclin E1	3,0
Hs.50649	TP53I3: tumor protein p53 inducible protein 3	2,7
Hs.127799	BIRC3: baculoviral IAP(inhibitor of apoptosis protein) repeat-containing 3	2,1

Transportmoleküle

Hs.19105	TIMM17B: translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog B (yeast)	25,4
Hs.75671	STX1A: syntaxin 1A (brain)	10,2

Unigene Cluster	Genbezeichnung	CF
		HCT116U5.5

Proteine anderer Funktion

Hs.106857	CALB2: calbindin 2, (29kD, calretinin)	7,4
Hs.2288	VSNL1: visinin-like 1	2,1
Hs.446551	MEP50: MEP50 protein	2,1

EST/Potentielle ORF

Hs.443999	Homo sapiens transcribed sequences	2,8
Hs.467866	Homo sapiens cDNA clone IMAGE: 6503168, partial cds	2,5
Hs.145567	AF038169: hypothetical protein	2,1
Hs.206501	LOC57228: hypothetical protein from clone 643	2,1

Tabelle 3.5: Auflistung der in der metastasierenden Zelllinie HCT116U5.5 als induziert (im Vergleich zur nicht-metastasierenden Zelllinie HCT116) bestimmten Gene.

Es wurden 39 Gene ermittelt, die mit einem CF von > 2 induziert waren. Diese Gene wurden nach der UniGene-Datenbank annotiert und nach der Funktion oder Lokalisierung der Proteinprodukte klassifiziert. Eine zusätzliche Klasse fasst die vier induzierten EST/Potentiellen ORF zusammen.

Unigene Cluster	Genbezeichnung	CF
		HCT116U5.5

Enzyme

Hs.3873	PPT1: palmitoyl-protein thioesterase 1	-6,1
Hs.171695	DUSP1: dual specificity phosphatase 1	-5,1
Hs.89663	CYP24A1: cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1	-3,1
Hs.433307	BCKDHA: branched chain keto acid dehydrogenase E1, alpha polypeptide	-2,6
Hs.155247	ALDOC: aldolase C, fructose-bisphosphate	-2,2

Transmembran-Proteine

Hs.443020	PCDH7: BH-protocadherin (brain-heart)	-13,9
Hs.82028	TGFBR2: transforming growth factor, beta receptor II (70-80kD)	-4,7
Hs.419124	MET: met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	-3,1
Hs.62192	F3: coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	-2,9
Hs.503546	FADS1: fatty acid desaturase 1	-2,9
Hs.128087	F2R: coagulation factor II (thrombin) receptor	-2,4

Zytoskelett- oder EZM-assoziierte Proteine

Hs.211573	HSPG2: heparan sulfate proteoglycan 2 (perlecan)	-20,3
Hs.72550	HMMR: hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	-6,1
Hs.122645	LAMB1: laminin, beta 1	-3,4

Transkription- oder Translationassoziierte Proteine

Hs.155017	NRIP1: nuclear receptor interacting protein 1	-19,0
Hs.1395	EGR2: early growth response 2 (Krox-20 (Drosophila) homolog)	-8,7
Hs.361748	NR2F1: nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1	-3,4
Hs.150011	ETV1: ETS translocation variant-1	-3,4
Hs.25647	FOS: v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	-3,2
Hs.74088	EGR3: early growth response 3	-3,0
Hs.400124	JUNB: jun B proto-oncogene	-2,4

Unigene Cluster	Genbezeichnung	CF
		HCT116U5.5

Signalmoleküle

Hs.203862	GNAI1: guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting activity polypeptide	-3,2
Hs.78944	RGS2: regulator of G-protein signalling 2, 24kD	-2,6
Hs.24557	GAF1: gamma-SNAP-associated factor 1	-2,2
Hs.154103	LIM: LIM protein (similar to rat protein kinase C-binding enigma)	-2,1

Zellzyklus- oder Apoptoseassoziierte Proteine

Hs.74122	CASP4: caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	-3,6
----------	-------------------------------------------------------	------

Proteine anderer Funktion

Hs.195825	RBPMS: RNA-binding protein gene with multiple splicing	-9,5
Hs.117848	HBE1: hemoglobin, epsilon 1	-3,7
Hs.279843	MLH3: mutL (<i>E. coli</i>) homolog 3	-2,3

Tabelle 3.6: Auflistung der in der metastasierenden Zelllinie HCT116U5.5 als reprimiert (im Vergleich zur nicht-metastasierenden Zelllinie HCT116) bestimmten Gene.

Insgesamt wurden 29 Gene ermittelt, die mit einem CF von < -2 reprimiert waren. Diese Gene wurden nach der UniGene-Datenbank annotiert und nach der Funktion oder Lokalisierung der Proteinprodukte klassifiziert.

In Tabelle 3.7 ist die Verteilung der induzierten und reprimierten Gene im HCT116-Zellsystem auf die 11 Kategorien (sowie zusätzliche EST/ Potentielle ORF) aufgelistet.

Kategorien	Anzahl an deregulierten Genen	Anzahl an induzierten Genen (CF > 2)	Anzahl an reprimierten Genen (CF < -2)
Immunantwortassoziierte Proteine	2	2	0
Enzyme	13	8	5
Transmembran-Proteine	12	6	6
Sezernierte Proteine	6	6	0
Zytoskelett- oder EZM-assoziierte Proteine	6	3	3
Transkription- oder Translation-assoziierte Proteine	9	2	7
Signalmoleküle	7	3	4
Zellzyklus- oder Apoptose-assoziierte Proteine	5	4	1
Transportmoleküle	2	2	0
Proteine anderer Funktion	6	3	3
EST/Potentielle ORF	4	4	0

Tabelle 3.7: Klassifizierung der Gene, die im HCT116-Zellmodell dereguliert waren, nach der Funktion oder Lokalisierung der Proteinprodukte.

Insgesamt wurden 72 Gene mit Oligonukleotid-Mikroarrays identifiziert, die in der Zelllinie HCT116U5.5 im Vergleich zur HCT116-Zelllinie dereguliert waren. Diese konnten in 11 Kategorien eingeteilt werden. EST und potentielle ORF wurden gesondert gruppiert.

3.4 Vergleich der Expressionsprofile beider Zellmodelle

3.4.1 Schnittmengenanalyse der erstellten Expressionsprofile

Zur Identifizierung von Genen, die in allen metastasierenden Zelllinien differentiell exprimiert waren, wurden die mit den KM12- und HCT116-Zellmodellen erhaltenen Genchip-Datensätze miteinander verglichen. Die Bildung der Schnittmenge aus beiden Analysen resultierte in vier annotierten Genen: HSPG2, RGS2, TACSTD2 und VIM (Abb. 3.6). Allerdings waren Heparansulfat Proteoglykan 2 (HSPG2, Perlecan) und der Regulator für die G-Protein Signaltransduktion 2 (RGS2) in den beiden Analysen kontrovers dereguliert. Eine „Northernblot“-Analyse bestätigte die Induktion von HSPG2 und RGS2 in den metastasierenden Zelllinien KM12SM und KM12L4A (siehe Kapitel 3.1.2.1, Abb. 3.2 I und J) sowie die reprimierte Expression in HCT116U5.5 (Abb. nicht gezeigt), weshalb sie als Kandidatengene nicht weiter in Betracht gezogen wurden.

Interessanterweise waren aber der „Tumor-associated Calcium Signal Transducer 2“ (TACSTD2, Trop-2, GA733-1) und Vimentin (VIM) in allen metastasierenden Zelllinien induziert (Abb. 3.6). TACSTD2 wird in der Literatur zumeist als Trop-2 bezeichnet, deshalb wurde diese Bezeichnung in dieser Arbeit übernommen.

Für Abbildung 3.6 wurden diese 4 Gene unter Anwendung des „Complete Linkage Hierarchical“ Algorithmus „geclustert“ und im TreeView-Programm graphisch dargestellt. Beide Programme waren im Internet frei erhältlich³ und wurden von M. Eisen entwickelt (Eisen *et al.*, 1998).

Change Factor			
KM12 L4A	KM12 SM	HCT116 U5.5	
21,9	28,2	27,7	TACSTD2
4,7	4,0	5,8	VIM
3,9	2,1	-20,3	HSPG2
4,1	3,2	-2,6	RGS2

Abbildung 3.6: Ergebnis der Schnittmengenanalyse aus den erstellten Expressionsprofilen der KM12- und HCT116-Zellmodelle.

Die vier aufgeführten Gene TACSTD2, VIM, HSPG2 und RGS2 wurden in beiden Expressionsprofilen als dereguliert identifiziert, allerdings waren nur TACSTD2 und VIM in allen drei metastasierenden Zelllinien induziert.

12652 Gene wurden gleichzeitig mit dem HG-U95Av2-Genchip auf differentielle Expression in den drei metastasierenden Zelllinien im Vergleich zu den zwei nicht-metastasierenden Kolonkarzinom-Zelllinien untersucht. Dargestellt ist der „Change Factor“ (CF) der metastasierenden Zellen zu den nicht-metastasierenden Zellen eines Zellmodells. Einem positiven CF wurde die Falschfarbe rot und einem negativen CF die Falschfarbe grün zugeordnet.

³ <http://rana.stanford.edu/software>

Zusammenfassend ergab die Schnittmengenanalyse beider Datensätze insgesamt nur zwei deregulierte Gene: Trop-2 und Vimentin. Diese sind in allen stark metastasierenden Kolonkarzinom-Zelllinien deutlich induziert. Somit konnte das Ziel, unter Zuhilfenahme des zweiten Zellmodells HCT116 die Anzahl an Kandidatengenen stark einzuschränken, erreicht werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde der Fokus auf die Analyse einer Korrelation der Expression dieser zwei Gene und der Metastasierung des kolorektalen Karzinoms gelegt.

3.4.1.1 Bestätigung der Trop-2- und Vimentinexpression in den Zelllinien

Die „Northernblot“-Analyse bestätigte den mit der Genchip-Analyse bestimmten, erhöhten mRNA-Spiegel für Trop-2 und Vimentin in den metastasierenden Zelllinien KM12SM, KM12L4A und HCT116U5.5 (Abb. 3.7). Hierzu wurde für Trop-2 eine 204 bp große Sonden-cDNA und für Vimentin eine 200 bp große Sonden-cDNA verwendet, die jeweils spezifisch für den 3'-UTR Bereich von Trop-2 bzw. Vimentin ist. Diese wurden in einer PCR-Reaktion mit den Primerpaaren Trop-2_Northern_for und _rev bzw. Vim_for und _rev (siehe Kapitel 2.1.11) auf cDNA der Zelllinie HCT116U5.5 erhalten.

Mit den AvgDiff-Werten der Genchip-Analyse (siehe Kapitel 2.2.3.1.8.7.1) konnten Aussagen über die Abundanz einer RNA in der Zelle und über die Stärke des erwarteten Hybridisierungssignals in der „Northernblot“-Analyse gemacht werden. Allerdings hängt das Signal in der „Northernblot“-Analyse stark von Faktoren wie Hybridisierungseffizienz, Wasch- und Expositionsdauer ab. Deshalb konnten die AvgDiff-Werte nur einen Anhaltspunkt für die Stärke der Signale bei der „Northernblot“-Analyse geben. Insgesamt konnte mittels einer „Northernblot“-Analyse jeweils die Tendenz einer Deregulierung bestätigt werden, während es häufiger Unterschiede zwischen dem AvgDiff-Wert und der Intensität des „Northernblot“-Signals gab. Die AvgDiff-Werte für Trop-2 (Abb. 3.7 A) korrelierten mit den Bandenintensitäten eines 1,8 kb großen Transkripts in der „Northernblot“-Analyse (Abb. 3.7 C). Es war sowohl mit der Genchip- als auch mit der „Northernblot“-Analyse nur eine sehr schwache Trop-2-Expression in den nicht-metastasierenden Zelllinien KM12C und HCT116 zu beobachten (Abb. 3.7 A, schwarze Balken).

Für Vimentin korrelierten die AvgDiff-Werte allerdings nur sehr bedingt mit den Intensitäten der spezifischen Banden von 1,9 kb Größe. Denn obwohl für Vimentin in den KM12C-Zellen ein AvgDiff-Wert ermittelt wurde, der nur minimal über dem „Hintergrundrauschen“ lag (Abb. 3.7 B), ist in Abbildung 3.7 D eine starke Bande für Vimentin in RNA-Isolaten der Zelllinie KM12C erkennbar. Mit einer Phosphoimager-Software wurden die Bandenintensitäten des „Northernblots“ ermittelt. Die Induktion der Vimentinexpression in den KM12SM-Zellen betrug nach Analyse der Bandenintensitäten nur noch einen Faktor

von 1,4 im Vergleich zu den KM12C-Zellen. Dies lag im wesentlichen an der starken Intensität der KM12C-Bande in der „Northernblot“-Analyse. Zudem waren nach Aussage der Genchip-Analyse die AvgDiff-Werte für Vimentin in den HCT116U5.5-Zellen 2,8 x höher als in den KM12L4A-Zellen. Mit dem Phosphoimager wurde dahingegen eine 1,6 x stärkere Bandenintensität für Vimentin in den KM12L4A-Zellen bestimmt. Somit war die tatsächliche Expression von Vimentin in den HCT116U5.5-Zellen deutlich niedriger als nach der Genchip-Analyse zu erwarten war.

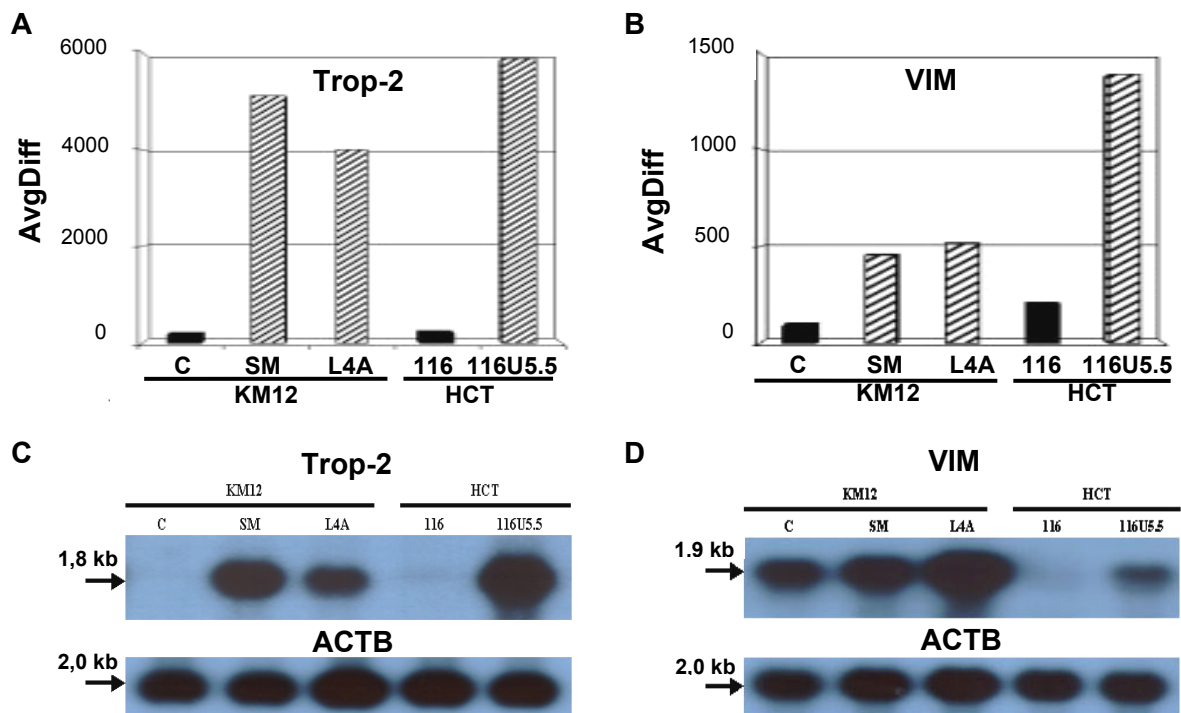


Abbildung 3.7: Expressionsanalyse von Trop-2 und Vimentin in den Zelllinien mit Oligonukleotid-Mikroarrays und mit der „Northernblot“-Analyse.

A, B: Von den metastasierenden (KM12SM, KM12L4A, HCT116U5.5) und nicht-metastasierenden (KM12C, HCT116) Kolonkarzinom-Zelllinien wurden mit Genchips die Expressionsprofile erstellt. Gezeigt sind die AvgDiff-Werte für Trop-2 (A) und Vimentin (B). Der AvgDiff-Wert ist in Kapitel 2.2.3.1.8.7.1 definiert. Nicht-metastasierende Zelllinien sind in schwarzen Balken dargestellt, metastasierende Zelllinien werden durch schwarz-weiß gestreifte Balken repräsentiert.

C, D: „Northernblot“-Analyse der differentiellen Expression von Trop-2 (C) und Vimentin (D) in den Kolonkarzinom-Zelllinien. Für Trop-2 wurde ein spezifisches Transkript von 1,8 kb (Pfeil) und für Vimentin von 1,9 kb (Pfeil) detektiert. Je 10 µg Gesamt-RNA wurden in einem denaturierenden FA-Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer [α - 32 P]dATP-markierten cDNA für Trop-2 oder Vimentin hybridisiert (siehe Kapitel 2.2.3.1.10). Zur internen Kontrolle wurden die Blots abschließend „gestrippt“ und mit einer [α - 32 P]dATP-markierten cDNA von β -Aktin (ACTB) hybridisiert.

3.5 Expressionsanalysen von Trop-2 in kolorektalem Gewebe

3.5.1 Genchip-Analysen von Trop-2 und Vimentin

Im Rahmen des Aufbaus einer Datenbank für Normal- und Krebsgewebe des Kolons mit den HG-U95Av2-Genchips bei der Roche Diagnostics GmbH in Penzberg (Arbeitsgruppe J. Auer) konnte die Expression von Trop-2 und Vimentin gleichzeitig in 24 Kolon-Primärtumorgeweben mit unterschiedlichen Dukes'-Stadien und den korrespondierenden 24 Normalgeweben untersucht werden. Ferner konnten die erstellten Expressionsprofile von 8 Genchips auf die Expression von Trop-2 und Vimentin analysiert werden, die mit cRNA aus Lebermetastasen des Kolons hybridisiert wurden. Zusätzlich waren die Genchipdaten von drei der korrespondierenden Normalgeweben der Leber zugänglich. Die gefrorenen Gewebeproben wurden freundlicherweise von W. Dietmaier und J. Rüschoff (siehe Kapitel 2.1.9) zur Verfügung gestellt und waren in der Gewebekbank der Roche Diagnostics GmbH in Penzberg gelagert. Zu jeder Gewebeprobe waren zusätzliche Daten über Alter, Geschlecht und Krankheitsverlauf des Patienten sowie die Klassifizierung des Tumors und der Metastasenbefall erhältlich.

Eine zuerst erstellte Überblicksanalyse mit allen verfügbaren Daten ergab ein unterschiedliches Expressionsbild für Trop-2 und Vimentin in den Geweben (Abb. 3.8 A und B). In Abbildung 3.8 A erkennt man eine um den Faktor vier ansteigende mittlere AvgDiff für Trop-2 vom Normalgewebe (mittlere AvgDiff von ca. 100, blauer Balken) zum Primärtumor (mittlere AvgDiff von ca. 450, rot-weiß gestreifter Balken). Darüber hinaus war aber die Expression von Trop-2 in den Lebermetastasen im Vergleich zu den Primärtumoren noch einmal um den Faktor vier induziert (mittlere AvgDiff von ca. 1810, gelber Balken).

Insgesamt lagen die durchschnittlichen AvgDiff-Werte für Vimentin (Abb. 3.8 B) circa um den Faktor 10 höher als für Trop-2. Allerdings zeigte Vimentin ein anderes Expressionsmuster in den verschiedenen Gewebestadien als Trop-2. Mit den Primärtumoren (mittlere AvgDiff von ca. 7800) ergaben sich nur halb so große AvgDiff-Werte wie mit den Kolon-Normalgeweben (mittlere AvgDiff von ca. 16500). In den acht untersuchten Lebermetastasen (mittlere AvgDiff von ca. 11200) lag Vimentin wieder im Vergleich zu den Primärtumoren deutlich induziert vor, allerdings blieb die Expressionshöhe um circa ein Drittel unter dem Ausgangswert im Normalgewebe. Mit der Analyse der Zellmodelle war nur die Induktion von Vimentin ausgehend von nicht-metastasierenden Primärtumorzellen hin zu metastasierenden Zellen zu beobachten. Dieses eingeschränkte „Sichtfenster“ konnte nun durch die Untersuchung der Gewebe unter Einbeziehung von Normalgeweben ausgeweitet werden.

Aufgrund des uneinheitlichen Verlaufs der Genexpression von Vimentin in den kolorektalen Gewebe in fortschreitenden Krankheitsstadien wurden weitere Expressionsanalysen auf Trop-2 beschränkt.

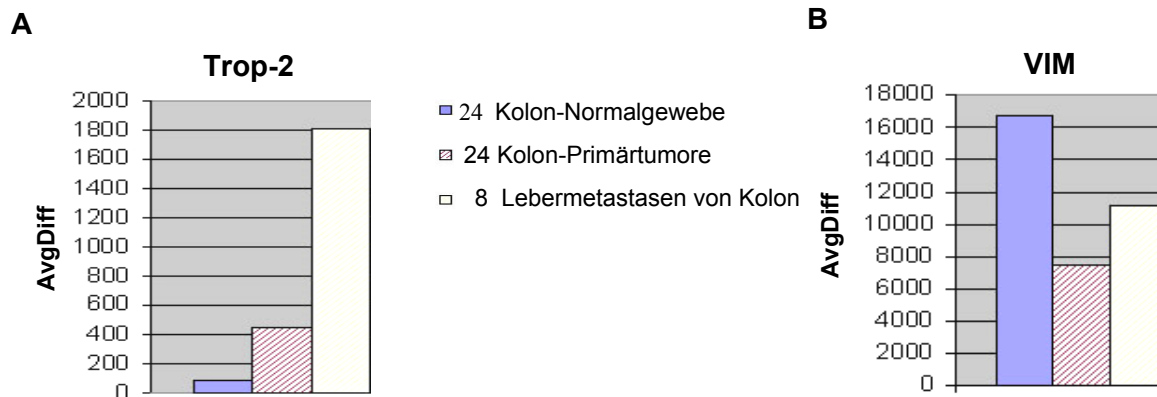


Abbildung 3.8: Trop-2- (A) und Vimentin- (B) mRNA-Spiegel in 56 Geweben aus Kolon. Von 24 Kolon-Normalgeweben, 24 Primärtumoren und 8 Lebermetastasen von Kolon wurden mit Genchips die Expressionsprofile erstellt. Gezeigt sind die AvgDiff-Werte für Trop-2 (A) und Vimentin (B), gemittelt jeweils über alle Gewebe eines diagnostizierten Stadiums. Der AvgDiff-Wert wurde in Kapitel 2.2.3.1.8.7.1 definiert.

Die Detailanalyse der Ergebnisse für Trop-2 in den 59 Geweben bekräftigte die Überblicksanalyse. Während sich die AvgDiff-Werte für Trop-2 in den 24 Normalgeweben (Abb. 3.9, gelbe Balken) vorwiegend im Bereich der Detektionsgrenze für relevante Expressionswerte mit den Genchips bewegten (AvgDiff von ca. 100), lagen die Werte in den korrespondierenden Primärtumoren (Abb. 3.9, blaue Balken) im Durchschnitt höher (AvgDiff von 200-400). Drei der 24 Primärtumorgewebe zeigten eine deutlich abweichende, erhöhte Trop-2-Expression mit AvgDiff-Werten von 1000 bis zu 2000. Von den Lebermetastasen (Abb. 3.9, rote Balken) wiesen 5 der 8 untersuchten Gewebe eine AvgDiff für Trop-2 von mindestens 1000 auf, und lagen damit deutlich höher als der Durchschnitt der untersuchten Normalgewebe und Primärtumore. Einzelne Lebermetastasen erreichten Werte für die AvgDiff, die im Bereich der analysierten metastasierenden Zelllinien lagen (Abb. 3.9, rot/schwarz gestreifte Balken). Drei der acht Lebermetastasen hatten eine vergleichsweise niedrige Expression von Trop-2 (AvgDiff von 300–600), die aber immer noch deutlich über dem Durchschnitt der Normalgewebe lag. Von drei der Lebermetastasen (markiert durch einen Stern in Abb. 3.9), konnte die Expression von Trop-2 auch in den korrespondierenden Normalgeweben der Leber bestimmt werden (Abb. 3.9, grüne Balken). Deren deutlich niedrigere Trop-2-Expression bewies, dass die hohen AvgDiff-Werte für Trop-2 in den Lebermetastasen nicht durch zusätzlich isolierte RNA aus dem die Läsion umgebenden Leber-Normalgewebe erhalten wurde.

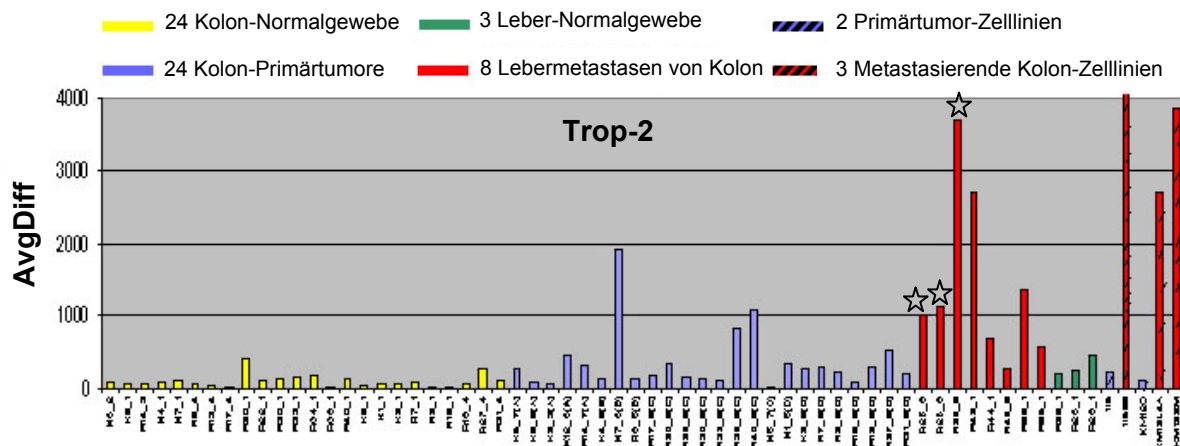


Abbildung 3.9: Trop-2-mRNA-Spiegel in 56 gesunden- und Tumorgeweben aus Colon, 3 Leber-Normalgeweben sowie zum Vergleich in den 5 Zelllinien.

Von allen Geweben wurde mit Genchips das Expressionsprofil erstellt. Gezeigt sind die AvgDiff-Werte für Trop-2 in den Geweben. Der AvgDiff-Wert wurde in Kapitel 2.2.3.1.8.7.1 definiert. Das Leber-Normalgewebe wurde den gleichen Patienten entnommen, denen auch die mit Sternen gekennzeichneten Lebermetastasen entfernt wurden.

3.5.2 Bestätigung der Trop-2-Expression in kolorektalem Gewebe mit RT-PCR

3.5.2.1 Etablierung der semiquantitativen RT-PCR-Analyse für Trop-2

Zur Bestätigung der Daten für Trop-2 aus der Genchip-Analyse mit den kolorektalen Geweben wurde die semiquantitative RT-PCR unter Verwendung des LightCycler Systems gewählt. Für eine verlässliche Quantifizierung mit der RT-PCR war zuerst die Wahl der Primer und die Optimierung der Reaktionsbedingungen von großer Bedeutung. Diese Bedingungen wurden anhand von cDNA der Zelllinien ausgetestet. Nach einem zusätzlichen DNase-Verdau wurde jede isolierte RNA der Zelllinien revers transkribiert und je 2 µl der erhaltenen cDNA in die PCR eingesetzt. Die Detektion der amplifizierten DNA erfolgte mit dem Farbstoff SYBR Green I und die Auswertung wurde mit der „Second Derivative Maximum“-Methode wie in Kapitel 2.2.3.2.1.4.3 beschrieben durchgeführt. Abbildung 3.10 A zeigt den Verlauf der optimierten PCR mit cDNA aus den Zelllinien mit spezifischen Primern für den Bereich des 3'-UTR von Trop-2 (Trop-2_Northern_for und Trop-2_Northern_rev). Der PCR-Verlauf wird als halblogarithmische Darstellung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zyklenzahl gezeigt. Die PCR-Produkte wurden nach 50 PCR-Zyklen gelelektrophoretisch analysiert und ergaben das erwartete Amplifikat von 204 bp. Die in den Zelllinien mittels RT-PCR identifizierte Deregulierung von Trop-2 bestätigte die vorhergehenden „Northernblot“- und Genchip-Analysen und somit die Auswahl der PCR-Bedingungen. Mit Hilfe des in Abbildung 3.10 A dargestellten Diagramms wurde der Zeitpunkt bestimmt, nachdem eine PCR-Reaktion abgebrochen

werden konnte, um die differentielle Expression von Trop-2 in den Zelllinien anhand der PCR-Amplifikate zu visualisieren (gestrichelte Linie). Nach 23 Zyklen war die PCR auf cDNA der metastasierenden Zelllinien HCT116U5.5, KM12SM und KM12L4A bereits in der log-linearen Amplifikationsphase. Dahingegen lagen die PCR-Verlaufskurven mit cDNA der nicht-metastasierenden Zelllinien nach 23 Zyklen noch innerhalb der Hintergrundfluoreszenz. Für Abbildung 3.10 B wurden die PCR-Amplifikate, nachdem die PCR-Reaktion nach 23 Zyklen abgebrochen wurde, in einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid visualisiert. Für Abbildung 3.10 B wurden die PCR-Amplifikate, nachdem die PCR-Reaktion nach 23 Zyklen abgebrochen wurde, in einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid visualisiert.

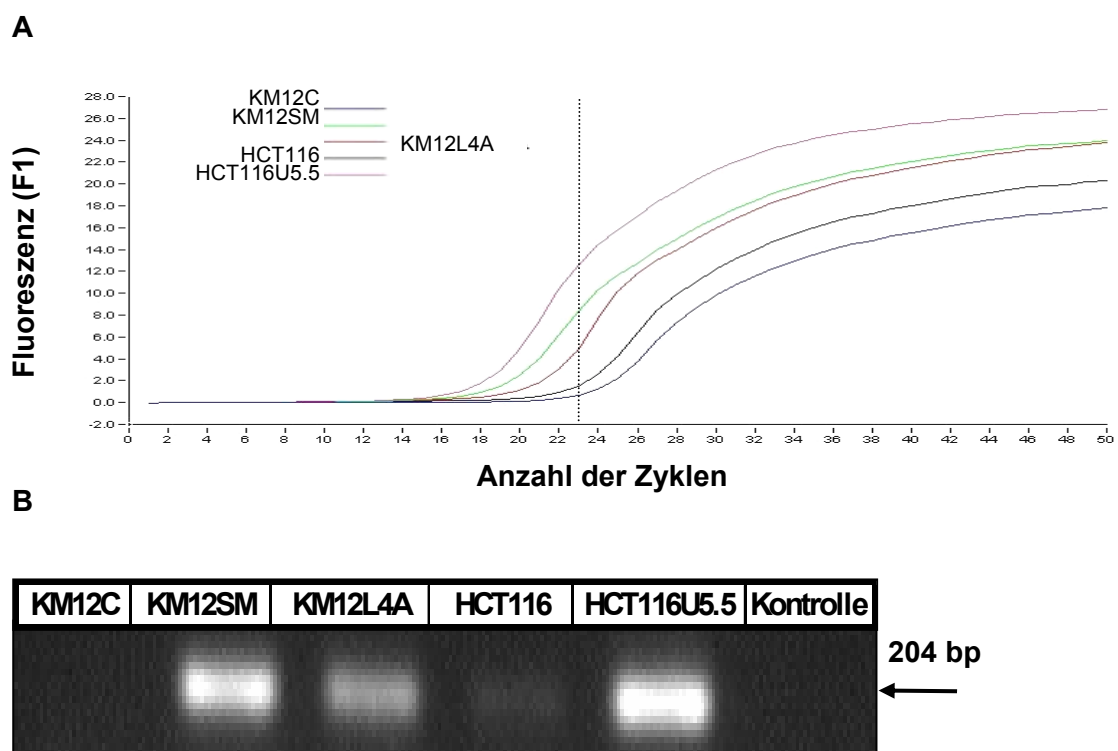


Abbildung 3.10: Trop-2-mRNA-Quantifizierung in den Zelllinien mittels RT-PCR.

A: Darstellung des PCR-Verlaufs am LightCycler Gerät mit 2 μ l cDNA der Zelllinien KM12C, KM12SM, KM12L4A, HCT116 und HCT116U5.5. Die Fluoreszenz ist halblogarithmisch in Abhängigkeit von der Zyklenzahl dargestellt. Zellen, die eine höhere Anzahl an Trop-2-Transkripten enthalten erreichen unter den gewählten PCR-Bedingungen früher die log-lineare Region. Die Anzahl der für das Erreichen des Kreuzungspunktes benötigten Zyklen ist somit geringer.

Das Protokoll für die PCR-Reaktion ist in Tabelle 2.4 (siehe Kapitel 2.2.3.2.1.4.3.1) aufgeführt. Die gestrichelte Linie markiert den Kurvenverlauf der PCR-Reaktion nach 23 Zyklen.

B: Visualisierung einer PCR-Abbruchreaktion mit 2 μ l cDNA der aufgeführten Zelllinien nach 23 Zyklen. Die PCR-Amplifikate wurden nach 23 Zyklen in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid unter einer UV-Lampe visualisiert. Man erhielt nur ein spezifisches PCR-Produkt mit 204 Basenpaaren (Pfeil). Als Negativkontrolle wurde in einen PCR-Ansatz Wasser an Stelle von cDNA eingesetzt.

3.5.2.2 Identifizierung von Calnexin zur Normalisierung der RT-PCR

Nach der Optimierung der RT-PCR Bedingungen für Trop-2 musste ein in allen Geweben nicht-dereguliertes Vergleichsgen als interne Referenz zur Normalisierung der PCR-Ergebnisse identifiziert werden. Dieser Schritt war äußerst wichtig, um eventuelle methodische Faktoren wie Variationen in Ausgangsmaterial und Ausgangsmenge sowie in der Effizienz der reversen Transkription auszugleichen. Zur Identifizierung von nicht-deregulierten Genen in den 24 Kolon-Primärtumoren, 8 Lebermetastasen und den 5 Zelllinien konnten ebenfalls die Daten aus der Roche-internen Genchip-Datenbank für Kolon verwendet werden. Es wurden in der Analyse zwei Gene vergleichbar homogen in allen untersuchten Geweben exprimiert. Das war zum einen das kodierende Gen für das „Amyloid beta precursor“-Protein (APP) und zum anderen Calnexin. Transkripte des Gens APP wurden von Saha *et al.* (2001) bereits zur Normalisierung von Echtzeit-PCR-Analysen mit kolorektalen Normal-, Adenom-, Primärtumor- und Metastasengeweben verwendet, da die Expression von APP in den aufgeführten Geweben zuvor als nicht-dereguliert bestimmt wurde. In der vorliegenden Arbeit lag aber der Fokus auf vergleichbaren Kopienzahlen in Lebermetastasen und Kolon-Primärtumoren. Deshalb wurde das Gen für das Chaperon Calnexin, ein integrales Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums (Tjoelker *et al.*, 1994) zur Normalisierung verwendet, da für Calnexin der maximale Unterschied in der AvgDiff zwischen zwei Geweben mit 1,7 (10437/6080) kleiner war als bei APP (3,9). Die AvgDiff-Werte der Maximalunterschiede für Calnexin sind in Abbildung 3.11 angegeben.

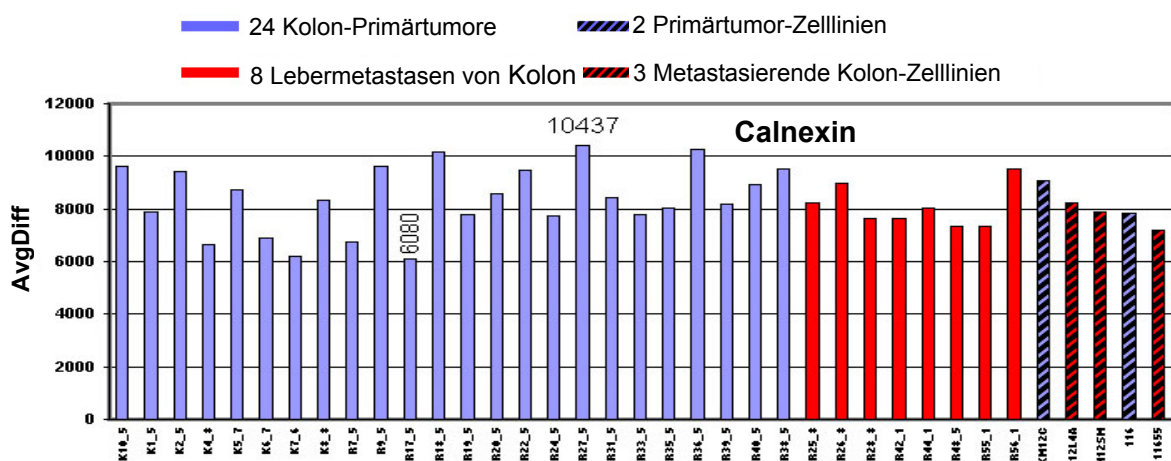


Abbildung 3.11: Analyse der Calnexinexpression in Kolon-Primärtumorgeweben und Lebermetastasen sowie in Zelllinien mit Oligonukleotid-Mikroarrays.

Der höchste- (10437) und niedrigste (6080) AvgDiff-Wert für Calnexin in allen untersuchten Proben ist angegeben.

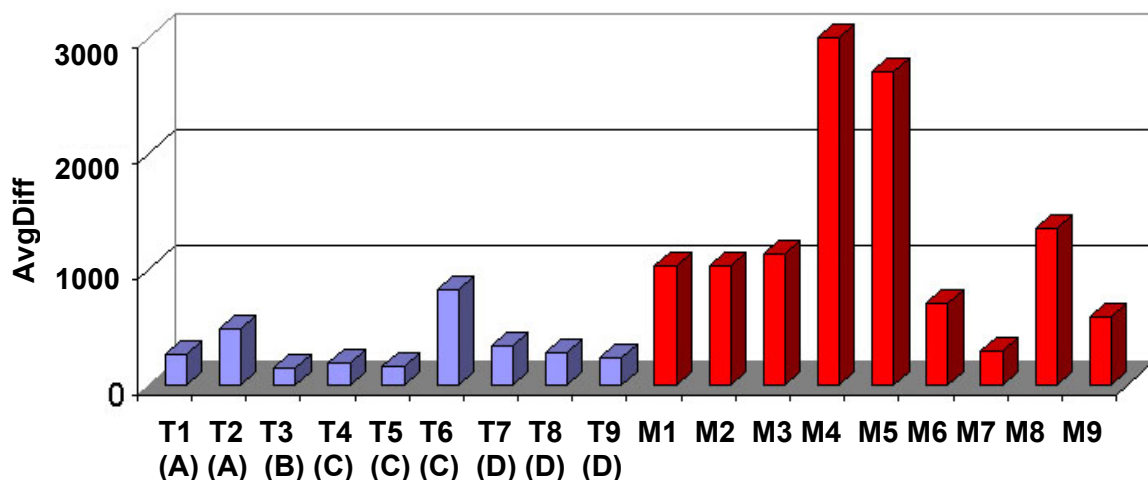
Nach der Etablierung eines Primerpaars (CANX_LC_for + _rev) wurde für Calnexin eine Standardkurve erstellt. Hierzu wurde von cDNA der Zelllinie KM12SM folgende Verdünnungsreihe in Wasser erstellt: cDNA unverdünnt, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 und 1:1000. Von jeweils 2 µl jeder cDNA-Verdünnung wurde mit dem Primerpaar eine PCR-Reaktion durchgeführt und durch Auftragen der Kreuzungspunkte (siehe Kapitel 2.2.3.2.1.4.3) gegen den Logarithmus der Konzentration die lineare Regressionskurve erhalten. In der nachfolgenden semiquantitativen Analyse der Trop-2-Konzentration in den Geweben wurde jeweils der Wert des Kreuzungspunktes einer Probe unbekannter Trop-2-Konzentration in eine Konzentration konvertiert, die sich aus importierten Daten der Calnexin-Standardkurve ableitete.

3.5.2.3 Expression von Trop-2 in nicht-korrespondierenden kolorektalen Geweben

Die vorliegende Arbeit beschränkte sich auf die Bestätigung der Genchip-Analysen von Tumorgeweben, da primär der Prozess der Metastasierung von Tumoren des Kolons untersucht werden sollte. Dazu wurde von 18 ausgesuchten Geweben (9 kolorektale Primärtumore und 9 Lebermetastasen) die isolierte mRNA freundlicherweise von H. Schindler (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) zur Verfügung gestellt. Somit konnte für die RT-PCR die gleiche RNA eingesetzt werden wie für die Experimente der Genchip-Analyse. Herkunft und Klassifizierung der Gewebe sind in Kapitel 2.1.9 aufgeführt. Die RT-PCR-Analyse mit den 18 Geweben wurde mit den Genchip-Ergebnissen verglichen (Abb. 3.12). Die AvgDiff-Werte der Genchip-Analyse für die 9 Kolon-Primärtumore und Lebermetastasen sind in Abbildung 3.12 A vergleichend dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass die 9 Metastasen von individuellen Patienten entfernt wurden und nicht mit den Primärtumoren korrespondierten (siehe Kapitel 2.1.9). Die Primärtumore wurden so ausgewählt, dass sie unterschiedliche Dukes'-Stadien repräsentierten. Die ersten 3 kolorektalen Primärtumore T1-T3 bildeten als Dukes' A oder B klassifiziert keine Metastasen, wohingegen die nächsten 3 Primärtumore T4-T6 als Dukes' C klassifiziert in der Lage waren, regionale Lymphknoten zu befallen. Die 3 Primärtumore T7-T9 wurden dem Dukes' D-Stadium zugeordnet und bildeten Fernmetastasen in viszerale Organe. Eine Korrelation der Expression von Trop-2 mit dem Metastasierungspotential der kolorektalen Primärtumore war allerdings nicht zu erkennen. Die Primärtumore exprimierten mit Ausnahme von Tumor 6 nur sehr geringe Mengen an Trop-2. Dahingegen war ein erhöhter Spiegel an Trop-2-mRNA in sieben der neun untersuchten Lebermetastasen (78%) im Vergleich zu den Primärtumoren mit beiden Analysemethoden klar ersichtlich. Zwei der sieben untersuchten Lebermetastasen (M7 und M9) zeigten nur eine sehr geringe Expression von Trop-2. In Abbildung 3.12 B sind die Ergebnisse der semiquantitativen

RT-PCR-Analyse von Trop-2 in Duplikaten dargestellt. Hierzu wurde jede RNA zweimal revers transkribiert und die beiden erhaltenen cDNA einer Probe in zwei unabhängigen PCR-Läufen bezüglich der Expression von Trop-2 analysiert. Die auf Calnexin normalisierten Ergebnisse für die relative Expression von Trop-2 in den Geweben bestätigte die vorherige Genchip-Analyse. Lediglich die Expression von Trop-2 in der Lebermetastase M1 wurde mit der RT-PCR deutlich höher bestimmt als in der Genchip-Analyse.

A



B

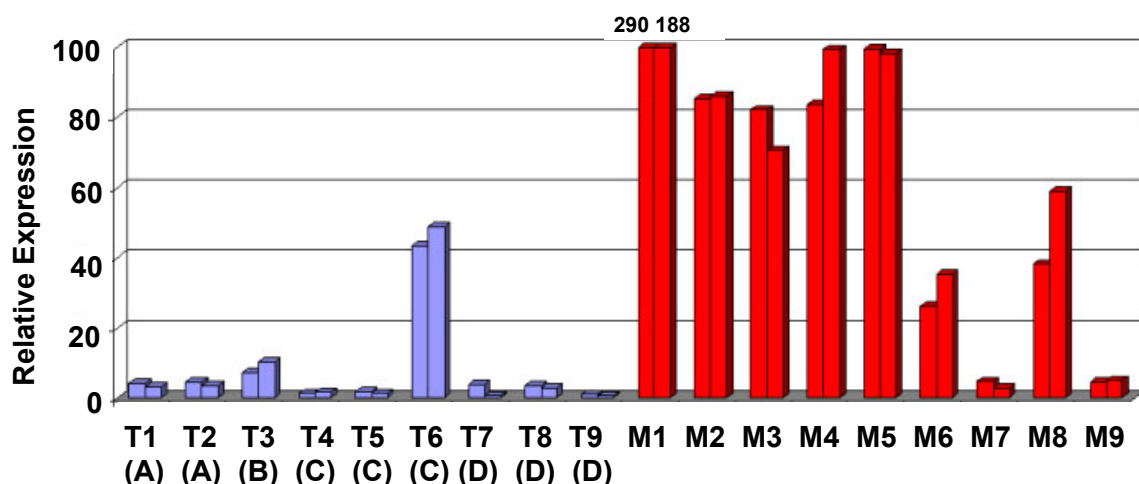


Abbildung 3.12: Analyse der Expression von Trop-2 in ausgewählten Kolon-Primärtumorgeweben und Lebermetastasen.

A: Expressionsanalyse der Gewebe mit Oligonukleotid-Mikroarrays.

B: Semiquantitative RT-PCR-Analyse der Gewebe. Die Ergebnisse wurden auf die Calnexin-Expression in den Geweben normalisiert und sind als Duplikate von zwei unabhängigen Versuchen dargestellt.

T = Kolon-Primärtumorgewebe, M = Lebermetastasengewebe, Klassifizierte Dukes'-Stadien der Primärtumore sind in Klammern angegeben.

Die unterschiedliche Anzahl an Transkripten von Trop-2 in den Zellen der Gewebeproben wurde zusätzlich anhand einer PCR-Abbruchreaktion analysiert. Hierzu wurde eine PCR-Reaktion mit cDNA der drei Primärtumoren (T1-T3) und der drei Metastasen (M1-M3) nach 26 Zyklen gestoppt. In Abbildung 3.13 sind die unter UV-Licht visualisierten Banden der PCR-Produkte von 204 bp in einem Agarosegel dargestellt. In den Metastasen wurde nach 26 Amplifikationsrunden deutlich mehr Trop-2-spezifische DNA amplifiziert als in den Primärtumoren (Abb. 3.13 A), während für Calnexin alle Banden in etwa die gleiche Intensität besaßen (Abb. 3.13 B).

Zum Test auf Kontamination der Proben mit genomischer DNA wurde abschließend noch eine Schmelzkurvenanalyse mit je 1 µg von jeder isolierten RNA als PCR-Vorlage verwendet. Alle Proben wurden frei von genomischer DNA getestet (Daten nicht gezeigt).

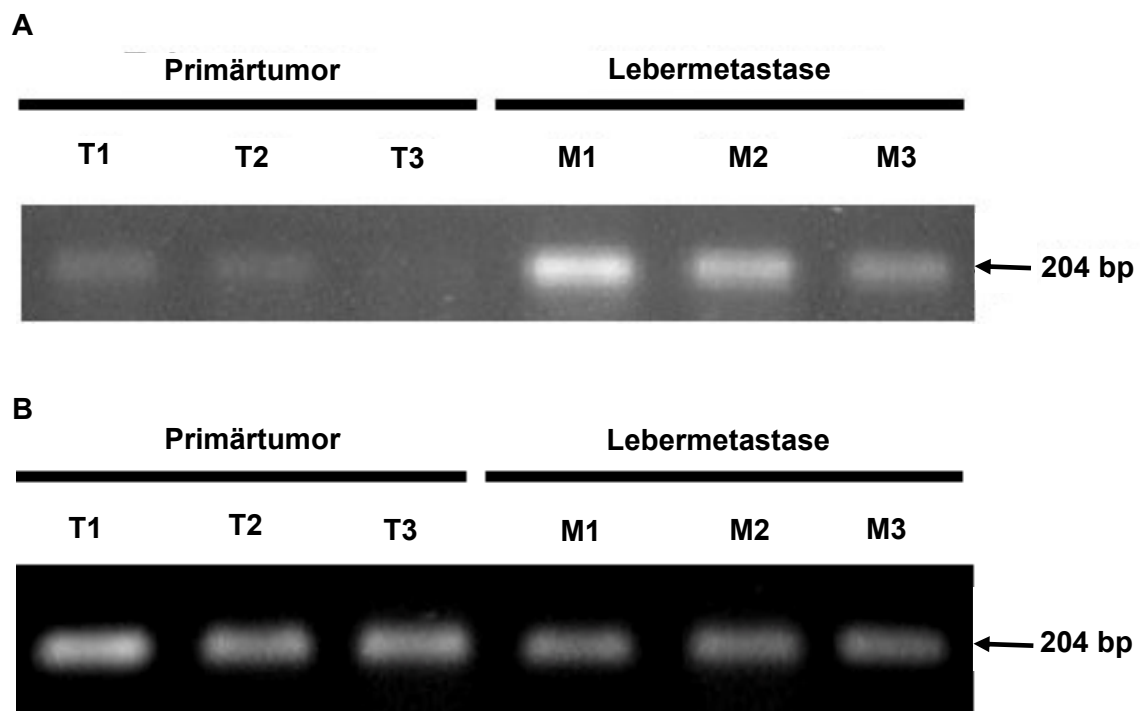


Abbildung 3.13: Visualisierung einer PCR-Abbruchreaktion nach 26 Zyklen von Trop-2 und Calnexin mit cDNA von 3 Kolon-Primärtumoren und 3 Lebermetastasen.

A: PCR-Abbruchreaktion mit Trop-2-spezifischen Primern und je 2 µl cDNA der aufgeführten Gewebe nach 26 Zyklen. Man erhielt mit allen Proben nur ein spezifisches PCR-Produkt für Trop-2 mit 204 Basenpaaren (Pfeil), allerdings wurde mit der cDNA aus allen drei Lebermetastasen deutlich mehr Produkt erhalten.

B: PCR-Abbruchreaktion mit Calnexin-spezifischen Primern und je 2 µl cDNA der aufgeführten Gewebe nach 26 Zyklen. Man erhielt mit allen Proben nur ein spezifisches Calnexin PCR-Produkt mit 204 Basenpaaren (Pfeil) in vergleichbaren Mengen.

Die PCR-Amplifikate wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid unter einer UV-Lampe visualisiert.

3.5.2.4 Expression von Trop-2 in korrespondierenden kolorektalen Geweben

Als nächster Schritt wurde die Expression von Trop-2 in drei korrespondierenden Paaren bestehend aus einem kolorektalen Primärtumor und einer Lebermetastase analysiert. Hierzu wurden Paraffinschnitte mit Formalin-fixiertem Gewebe freundlicherweise von W. Dietmaier zur Verfügung gestellt. Nach Isolierung der RNA aus den Geweben (siehe Kapitel 2.2.3.1.4) wurde die durchschnittliche Größe der durch die Fixierung stark fragmentierten RNA in einem denaturierenden FA-Agarosegel auf ca. 100–250 bp abgeschätzt. Somit mussten neue Primerpaare für die RT-PCR-Reaktionen verwendet werden, die ein Amplifikat von < 100 bp generierten. Die neu-etablierten Primer für Calnexin, CANX_LC_FA_for + _rev, amplifizierten ein 83 bp großes Produkt. Der bereits für die Generierung von Sonden-DNA für die „Northernblot“-Analyse und ebenfalls für die bisherigen Analysen mit dem LightCycler System verwendete Trop-2-spezifische reverse Primer Trop-2_Northern_rev ergab in Kombination mit einem neuen „vorwärts“-Primer Trop-2_LC_FA_for ein 71 bp großes PCR-Amplifikat aus dem Bereich des 3'-UTR von Trop-2.

In Abbildung 3.14 A ist die auf Calnexin normalisierte relative Expression von Trop-2 für jedes analysierte Gewebe in Duplikaten dargestellt. Hierzu wurde die isolierte RNA zweimal von je 3 Paraffinschnitten eines Gewebes vereinigt. Von beiden „RNA-Pools“ eines Gewebes wurden je 1 µg revers transkribiert und die beiden erhaltenen cDNA einer Probe in zwei unabhängigen PCR-Läufen analysiert. Aus der Grafik 3.14 A geht hervor, dass Trop-2 in allen drei korrespondierenden Lebermetastasen im Vergleich zum Primärtumor des gleichen Patienten induziert vorlag. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls durch eine PCR-Abbruchreaktion nach 28 Zyklen für Trop-2 und Calnexin mit cDNA aller 6 Gewebe bestätigt (Abb. 3.14 B und C).

Zum Test auf Kontamination der Proben mit genomischer DNA wurde abschließend noch eine Schmelzkurvenanalyse mit je 1 µg jeder isolierten RNA als PCR-Vorlage durchgeführt. Alle Proben wurden frei von genomischer DNA getestet (Daten nicht gezeigt).

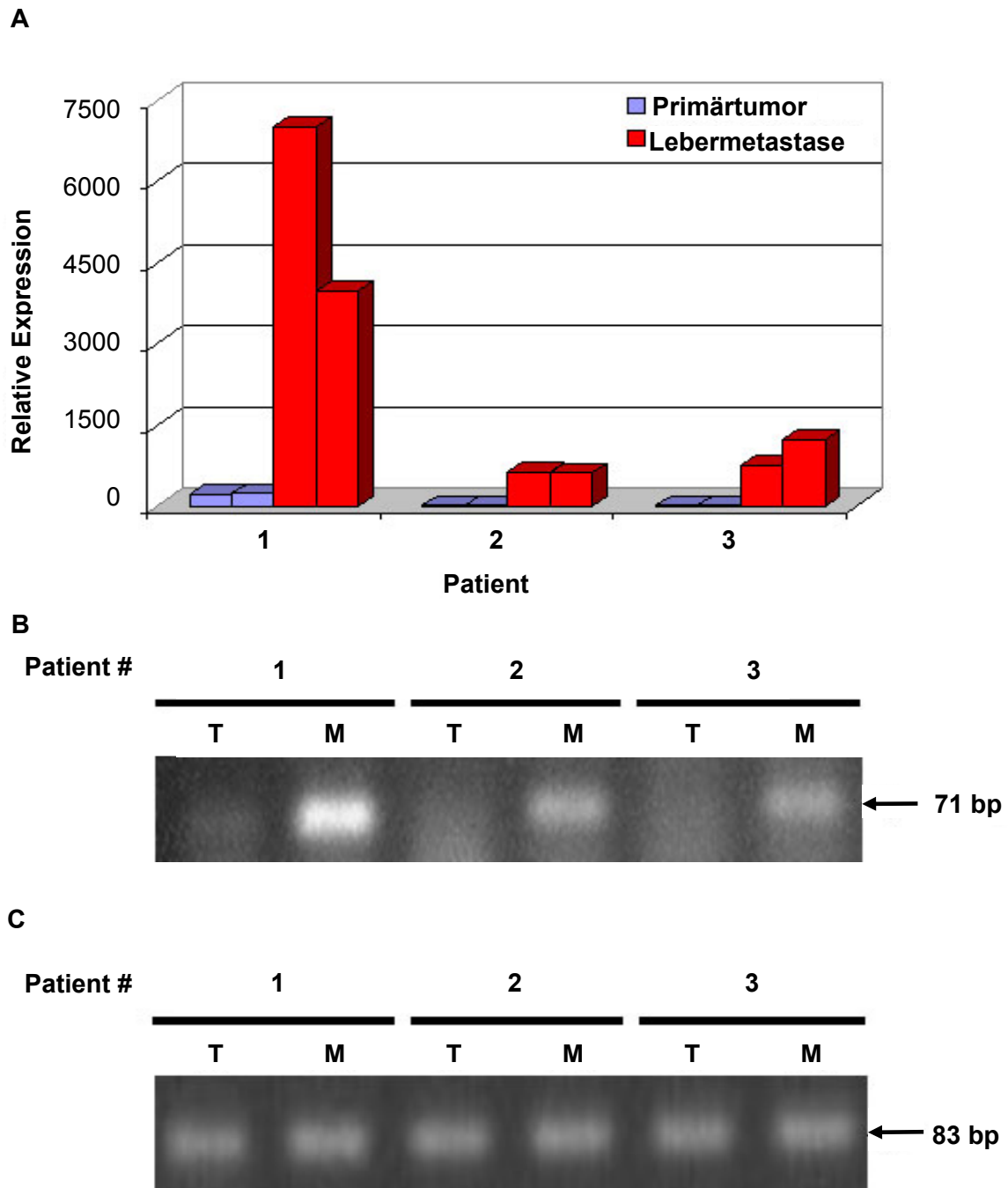


Abbildung 3.14: Analyse der Expression von Trop-2 in drei Paaren von korrespondierenden Kolon-Primärtumorgeweben und Lebermetastasen.

A: Semiquantitative RT-PCR-Analyse der Gewebe. Die Ergebnisse wurden auf die Calnexin-Expression in den Geweben normalisiert und sind als Duplikate von zwei unabhängigen Versuchen dargestellt.

B: PCR-Abbruchreaktion mit Trop-2-spezifischen Primern und je 2 µl cDNA der aufgeführten Gewebe nach 28 Zyklen. Man erhielt nur ein spezifisches PCR-Produkt für Trop-2 mit 71 Basenpaaren (Pfeil), dass nach 28 Zyklen nur noch in den Lebermetastasen detektierbar war.

C: PCR-Abbruchreaktion mit Calnexin-spezifischen Primern und je 2 µl cDNA der aufgeführten Gewebe nach 28 Zyklen. Man erhielt mit allen Proben nur ein spezifisches PCR-Produkt für Calnexin mit 83 Basenpaaren (Pfeil) in vergleichbaren Mengen.

Die PCR-Amplifikate wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid unter einer UV-Lampe visualisiert. T = Kolon-Primärtumorgewebe, M = Lebermetastasengewebe.

3.6 Proteinexpression von Trop-2 in kolorektalen Zelllinien und Geweben

3.6.1 Proteinexpression von Trop-2 in kolorektalen Zelllinien

3.6.1.1 „Westernblot“-Analyse

Die Proteinexpression von Trop-2 wurde in den Zelllinien KM12C, KM12SM, KM12L4A, HCT116 und HCT116U5.5 mit Hilfe eines spezifischen polyklonalen Antikörpers (AF650) und eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers analysiert. Hierzu wurden zunächst jeweils 80 µg Gesamtproteinextrakte mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und immunodetektiert (siehe Kapitel 2.2.3.3.3 und 2.2.3.3.4). Vergleichbar zur „Northernblot“-Analyse zeigten die metastasierenden Zellen eine erhöhte Proteinexpression von Trop-2, wobei das Trop-2-Protein mit den Analysebedingungen in den nicht-metastasierenden Zellen (KM12C, HCT116) nicht nachweisbar war. Allerdings war die Expressionshöhe für Trop-2 in der „Westernblot“-Analyse, insbesondere für die Zelllinien KM12SM und KM12L4A deutlich geringer als auf RNA-Ebene. Es konnten mittels SDS-PAGE drei Trop-2-Isoformen von 50 kD, 48 kD und 46 kD aufgetrennt werden. Abbildung 3.15 A zeigt einen repräsentativen Immunblot mit den Zelllinien, der anschließend mit einem Antikörper gegen β -Aktin (ACTB) zur Ladungskontrolle ein weiteres Mal immunodetektiert wurde (Abb. 3.15 B).

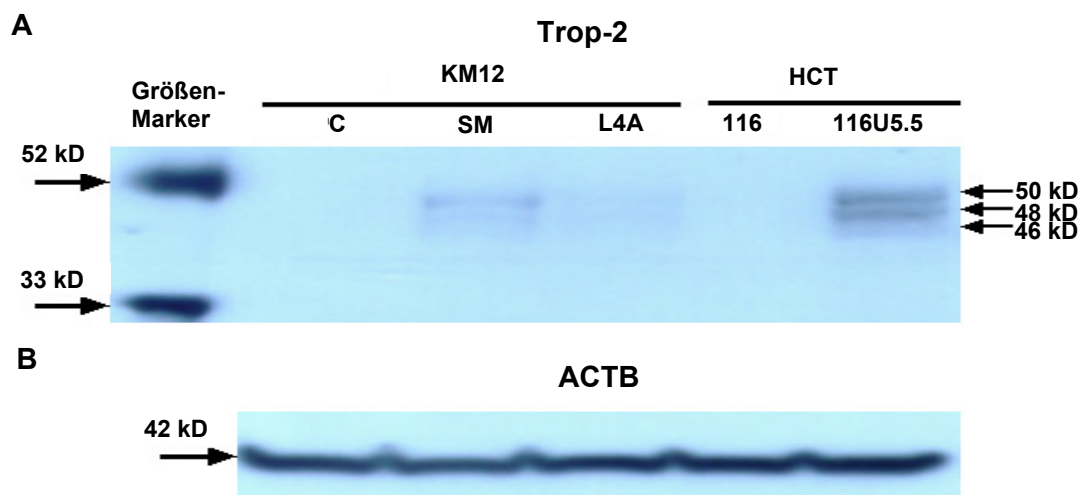


Abbildung 3.15: Proteinexpression von Trop-2 in den Zellmodellen KM12 und HCT116.

Die Expression des Trop-2-Proteins wurde in einer „Westernblot“-Analyse mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (AF650) in Kombination mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen (A). Dabei wurden zuerst gleiche Gesamtproteinmengen (80 µg), die mittels BCA-Proteinbestimmung ermittelt wurden, mit einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die rechten Pfeile deuten auf die drei unterschiedlichen Isoformen von Trop-2 mit Größen von 50 kD, 48 kD und 46 kD. In der ersten Spur ist der Größenstandard dargestellt. Die linken Pfeile zeigen auf die Position der 52 kD- und 33 kD-Bande des Größenstandards.

Der Trop-2-spezifische Antikörper wurde nach der Exposition von der Membran gewaschen, anschließend wurde mit einem für β -Aktin- (ACTB-) spezifischen Antikörper eine Proteinladungskontrolle durchgeführt (B).

3.6.1.2 Immunfluoreszenz-Analyse

Die Spezifität des polyklonalen Antikörpers gegen Trop-2 (AF650) wurde in der Arbeitsgruppe von S. Alberti mittels FACS-Analysen bestätigt. Hierzu wurden Mausfibroblastenzellen (L-Zellen) verwendet, die stabil mit Trop-2-transfiziert waren. In dem Zusammenhang wurden ebenfalls die KM12- und HCT116-Zellen mit dem FACS analysiert. Die FACS-Analysen bestätigten eine erhöhte Proteinexpression von Trop-2 in Zellen aller metastasierenden Zelllinien. Zusätzlich war in der FACS-Analyse ein differenziertes Expressionsmuster in den zwei Zellmodellen erkennbar. Während die HCT116U5.5-Zellen homogen Trop-2 exprimierten, war die Expression in den KM12SM- und KM12L4A-Zellen heterogen, da nur wenige der untersuchten Zellen Trop-2 exprimierten. Allerdings exprimierten diese wenigen Zellen das Protein dann sehr stark (Daten nicht gezeigt).

Diese Beobachtungen bestätigten die Ergebnisse, die zuvor durch eine Immunfärbung der Zellen mit CY3 erhalten wurden. Hierzu wurde der oben erwähnte Trop-2-spezifische Antikörper in Kombination mit einem sekundären CY3-gekoppelten Antikörper verwendet. Die Zellkerne wurden anschließend mit DAPI gegengefärbt. Die Fluoreszenzsignale der gebundenen Antikörper wurden mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop analysiert und repräsentative Ausschnitte fotografiert. Mit dem verwendeten Bildverarbeitungsprogramm war es möglich, mehrere Einzelbilder des gleichen Ausschnitts, die mit Licht verschiedener Wellenlängen angeregt wurden, übereinanderzulegen. Den Fluoreszenzsignalen der Fluorochrome wurden die Falschfarben blau für DAPI und rot für CY3 zugeordnet und die Markierungen anschließend in einem Bild dargestellt.

In Abbildung 3.16 A und C sind Zellen der nicht-metastasierenden Zelllinien HCT116 und KM12C dargestellt. Diese lassen außer einer schwachen Autofluoreszenz als Hintergrund keine Trop-2-spezifische CY3-Färbung erkennen. Die überlagerten Bilder mit den stark metastasierenden Zellen erhärteten die Ergebnisse, die mit dem Immunblot und der FACS-Analyse erhalten wurden. Die HCT116U5.5-Zellen zeigten eine starke membranständige Färbung für Trop-2, die homogen in allen Zellen auftrat (Abb. 3.16 B). Die Zellen am linken Rand in Abbildung 3.16 B lagen außerhalb der Fokussierungsebene und erscheinen deshalb schwächer fluoreszierend. Ein deutlich abweichendes Bild erhielt man mit den metastasierenden Zellen des KM12-Zellmodells. In Abbildung 3.16 D erkennt man, dass Trop-2 in KM12SM nur von wenigen einzelnen Zellen stark exprimiert wurde. Das gleiche heterogene Expressionsmuster wurde mit den KM12L4A-Zellen beobachtet (Abb. 3.16 E und F), wodurch die nur schwachen Gesamtsignale des Immunblots erklärt werden konnten. Auffällig war, dass die Färbung an den Zell-Zell-Kontaktstellen oft besonders intensiv auftrat (Abb. 3.16 E).

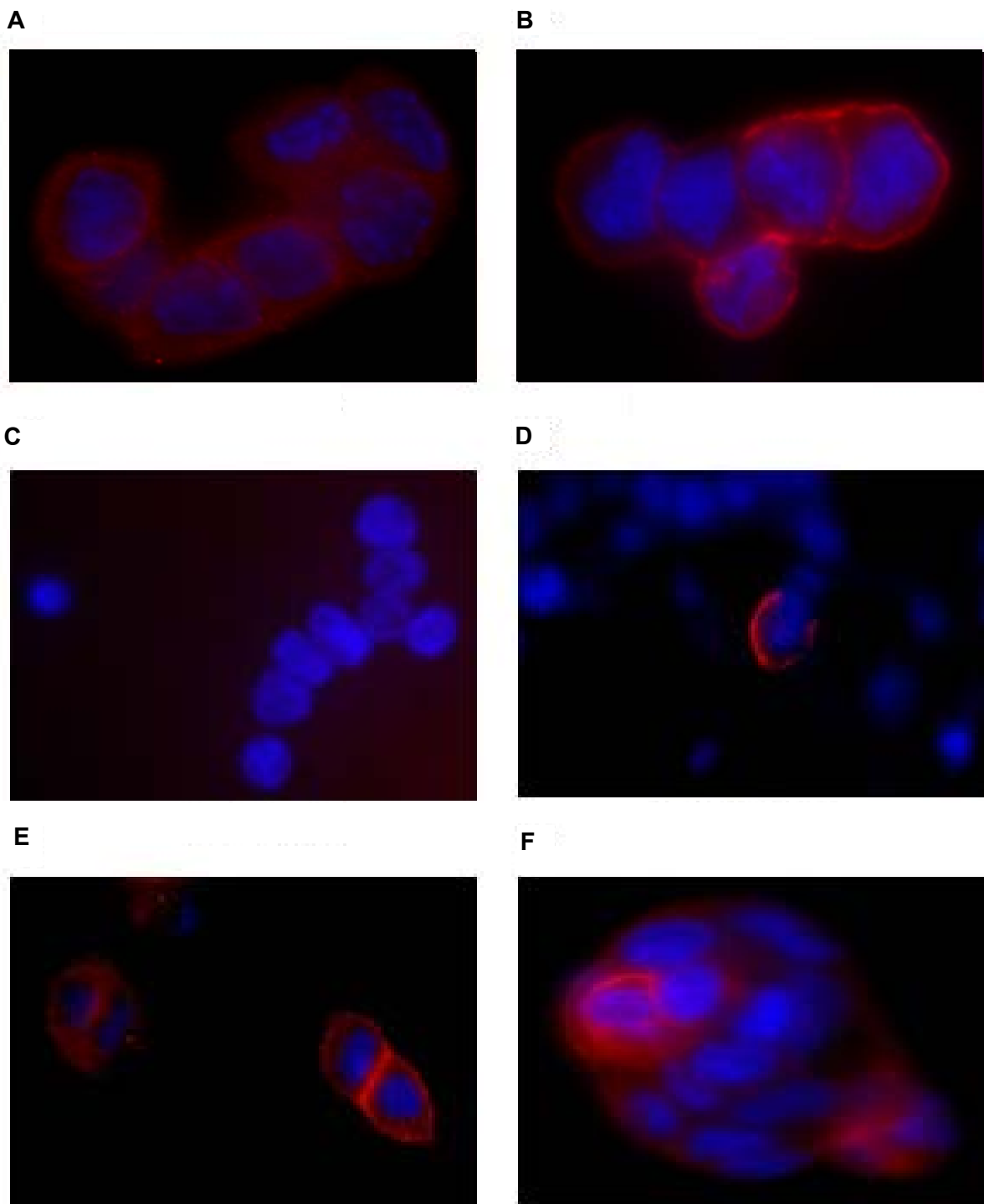


Abbildung 3.16: Immunfluoreszenz-Analyse der Proteinexpression von Trop-2 in den Zellen der KM12- und HCT116-Zellmodelle.

A und B: Proteinexpression von Trop-2 in den HCT116- (A) und HCT116U.5-Zellen (B).

C, D, E und F: Proteinexpression von Trop-2 in den KM12C- (C), KM12SM- (D) und KM12L4A-Zellen (E und F).

In auf Deckgläsern fixierten und permeabilisierten Zellen wurde die Proteinexpression von Trop-2 mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (AF650) in Kombination mit einem CY3-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Den Fluoreszenzsignalen für CY3 wurde die Falschfarbe rot, für DAPI blau zugeordnet.

3.6.1.3 Immunhistochemische-Analyse mit „künstlichem Gewebe“ aus Einzelzellen

Um den Trop-2-spezifischen Antikörper, der für alle bisherigen Analysen verwendet wurde, ebenfalls für immunhistochemische Analysen von Geweben einsetzen zu können, waren zahlreiche Optimierungsschritte bezüglich der Demaskierung des Antigens sowie der verwendeten Endkonzentrationen des Antikörpers und weiterer Detektionsreagenzien erforderlich. Deshalb wurden aus Einzelzellen der Zelllinien HCT116 und HCT116U5.5 „künstliche Gewebe“ hergestellt, um eine ausreichende Menge an Formalin-fixierten Test-Paraffinschnitten mit bekannter Expression von Trop-2 zu erhalten. Bei dem „künstlichen Gewebe“ handelte es sich um Einzelzellen, die in einer hohen Zelldichte mit Plasmin/Thrombin vernetzt wurden und anschließend wie entnommenes Frischgewebe sofort Formalin-fixiert und weiterbehandelt wurden. Von den erhaltenen Paraffinblöcken konnten Schnitte auf entsprechend vorbehandelte SuperFrostPlus-Objektträger aufgezogen und für immunhistochemische Analysen verwendet werden. Folgende variable Parameter mussten für die Optimierung des Protokolls der immunhistochemischen Analyse standardisiert werden: Demaskierung des Trop-2-Antigens für 20 min in einem Dampfgerät mit einem basischen Puffer von pH 10, Verwendung einer 1:200 Verdünnung des polyklonalen Trop-2-spezifischen Antikörpers und Einwirkzeit des Chromogens DAB stets für exakt 20 Sekunden.

In Abbildung 3.17 ist das Resultat der optimierten immunhistochemischen Trop-2-Färbung von „künstlichen Geweben“ der Zellen HCT116 (A) und HCT116U5.5 (B) gezeigt. Die braunen membranständigen Färbungen zeigten die Bindungen des Trop-2-spezifischen Antikörpers, die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin blau gegengefärbt. Das erhaltene Bild unterstrich die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalyse (Abb. 3.16 A und B) und verdeutlichte die homogene Expression von Trop-2 in der Membran der stark metastasierenden HCT116U5.5-Zellen (Abb. 3.17 B). Aufgrund der höheren Zelldichte in den „künstlichen Geweben“ im Vergleich zum Zellrasen der Immunfluoreszenzanalyse konnte man erkennen, dass auch vereinzelte Zellen der nicht-metastasierenden Zelllinie HCT116 Trop-2 exprimierten (Abb. 3.17 A, durch Pfeile markiert).

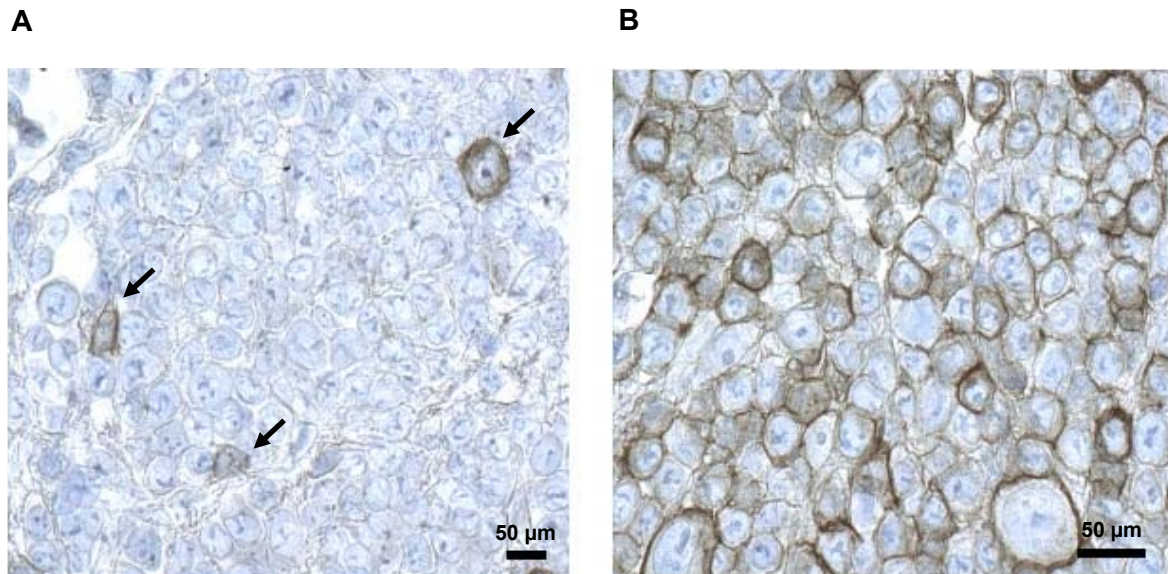


Abbildung 3.17: Immunhistochemische-Analyse der Proteinexpression von Trop-2 in „künstlichen Geweben“ aus Einzelzellen des HCT116-Zellmodells.

A und B: Proteinexpression von Trop-2 in den HCT116- (A) und HCT116U.5-Zellen (B).

Formalin-fixierte Paraffinschnitte der HCT116-Zellen wurden zunächst mit einem Trop-2-spezifischen Antikörper und anschließend mit einem biotinylierten sekundären Antikörper markiert. An den Sekundärantikörper wurde HRP-konjugiertes Streptavidin gekoppelt und durch die braune Farbreaktion des Farbstoffes DAB die Expression von Trop-2 visualisiert. Die Zellkerne wurden anschließend mit Hämatoxylin blau gefärbt. Die Pfeile in Abb. A markieren Trop-2-positive Zellen der Zelllinie HCT116.

3.6.2 Proteinexpression von Trop-2 in kolorektalem Gewebe

3.6.2.1 Immunhistochemische-Analyse

Als nächster Schritt sollte die Trop-2-Expression in kolorektalem Gewebe untersucht werden. Hierzu wurden Paraffinschnitte mit Formalin-fixiertem Gewebe auf SuperFrost-Plus-Objektträgern von W. Dietmaier zur Verfügung gestellt. Die korrespondierenden Gewebeschnitte von vier an metastasierenden Kolontumoren erkrankten Patienten wurden zuvor von W. Dietmaier histologisch klassifiziert (Tab. 3.8). Bei zwei Patienten wurden Lymphknotenmetastasen, bei den anderen beiden Patienten Lebermetastasen des Kolon-Primärtumors diagnostiziert. Von jedem Patient standen je drei Leerschnitte von Normal-, Primärtumor- und Metastasengewebe zur Verfügung. Somit konnten von jedem Gewebe zwei immunhistochemische Analysen mit dem Trop-2-spezifischen Antikörper und, zur besseren Identifizierung der Gewebestrukturen, je eine Hämatoxylin-Eosin-Doppelfärbung durchgeführt werden.

Die Klassifizierung der Färbungsintensitäten für Trop-2 nach der immunhistochemischen Markierung der Gewebe erfolgte am Institut für Pathologie der Universität Regensburg unter Anleitung des Pathologen M. Woenckhaus (Tab. 3.8).

In Abbildung 3.18 sind repräsentative Bilder der immunhistochemisch untersuchten Lebermetastasen zusammen mit Ausschnittsbildern der entsprechenden Kolon-Primärtumore und Normalgewebe von zwei Patienten dargestellt. Die Immunfärbung zeigte keine oder eine nur sehr schwache Expression von Trop-2 im Kolon-Normalepithel (Abb. 3.18 A und D), eine schwache oder mäßig starke Membranfärbung in den Primärtumoren (Abb. 3.18 B und E), sowie eine signifikant höhere Anzahl an immunreaktiven Zellen in den metastatischen Läsionen (Abb. 3.18 C und F). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit den Geweben der von Lymphknotenmetastasen befallenen beiden anderen Patienten erhalten (Tab. 3.8, Abb. nicht gezeigt). Die immunhistochemische Färbung war subzellulär auf die Plasmamembran beschränkt. Dies stand in Übereinstimmung mit den Immunfluoreszenz- und immunhistochemischen Analysen von den Zelllinien sowie zu früheren Untersuchungen, die Trop-2 als ein transmembranes Protein identifizierten (Fornaro *et al.*, 1995).

Patient #	Gewebe	Histologischer Befund	Trop-2-Intensität
1	Kolon-Normalgewebe		+
	Primärtumor	Adenokarzinom	++
	Lebermetastase		+++
2	Normalgewebe des terminalen Ileums		+
	Primärtumor	Adenokarzinom/ minuziös/ Siegelringtyp	+
	Lymphknotenmetastase		+++
3	Kolon-Normalgewebe		-
	Primärtumor	Adenokarzinom	+
	Lymphknotenmetastase		+++
4	Kolon-Normalgewebe		-
	Primärtumor	Adenokarzinom	+
	Lebermetastase		++++

Klassifizierung der Färbungsintensitäten

"-" = keine Färbung erkennbar
 "+" = sehr schwache Färbung (zumeist als zytoplasmatischer „Schleier“)
 "++" = schwache Färbung, aber membranständig
 "+++" = starke Membranfärbung
 "++++" = sehr starke Membranfärbung

Tabelle 3.8: Zusammenfassung der immunhistochemischen Trop-2-Analyse von korrespondierendem Kolongewebe aus vier Patienten.

Von jedem der vier Patienten wurden jeweils zwei Gewebeschnitte des Kolon-Normalgewebes, des Kolon-Primärtumors und der Metastase mit einem Trop-2-spezifischen Antikörper immunmarkiert und die Intensität der Färbung des Schnittes wie angegeben klassifiziert.

Bei den Patienten 1 und 4 entwickelte das jeweilige Adenokarzinom Metastasen in der Leber, bei den Patienten 2 und 3 waren Lymphknoten von Metastasen befallen.

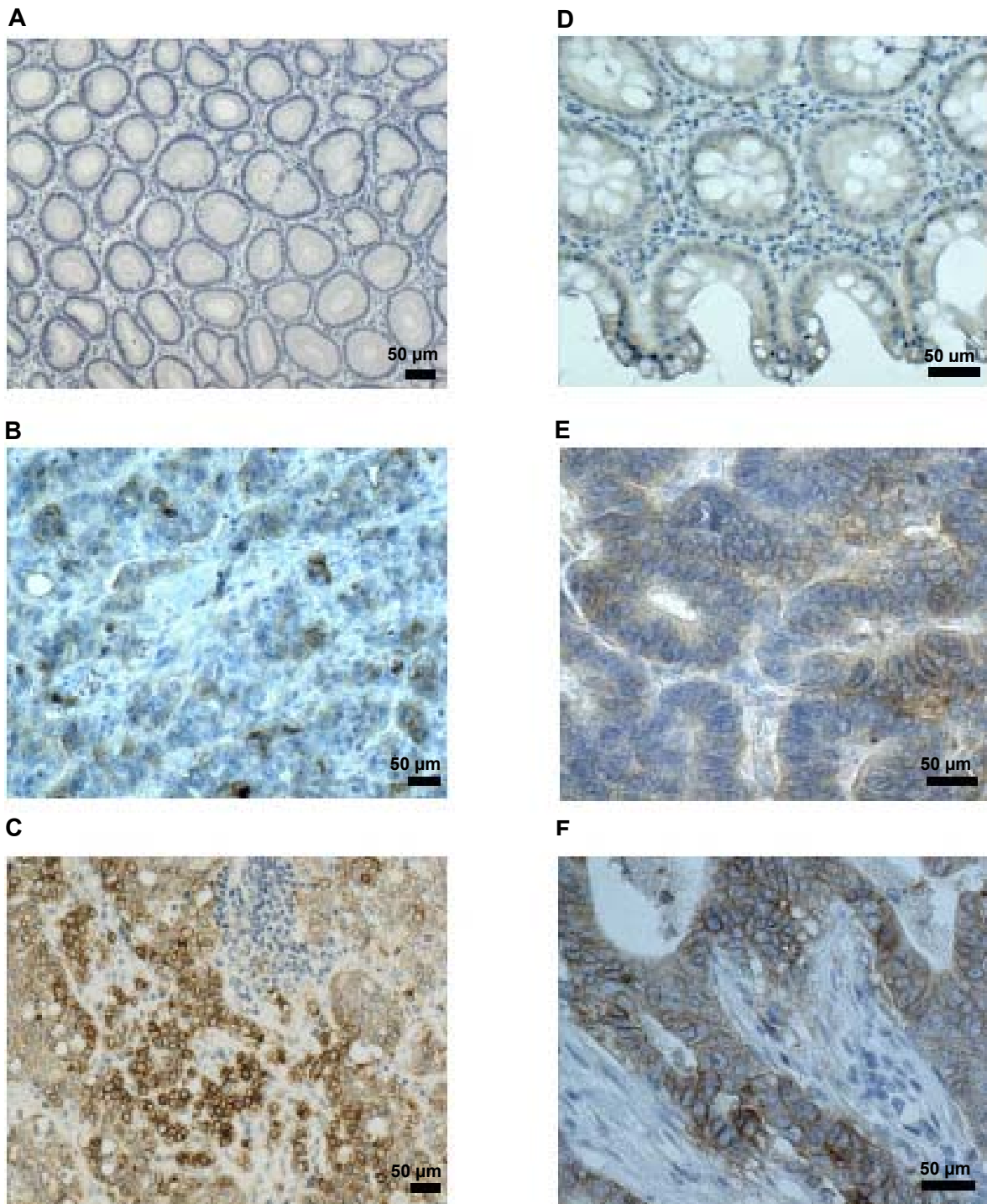


Abbildung 3.18: Immunhistochemische-Analyse für Trop-2 in korrespondierenden Kolon-Normalgeweben, Kolon-Primärtumorgeweben und Lebermetastasengeweben.

A, B, C und D, E, F sind jeweils korrespondierende Gewebe des Patienten #1 (A, B, C) und des Patienten #4 (D, E, F, siehe Tab. 3.8).

A und D: Normale Schleimhaut des Kolons.

B und E: Kolon-Primärtumore.

C und F: Lebermetastasen.

Formalin-fixierte Paraffinschnitte der einzelnen Gewebe wurden zunächst mit einem Trop-2-spezifischen Antikörper und anschließend mit einem biotinylierten sekundären Antikörper markiert. An den Sekundärantikörper wurde HRP-konjugiertes Streptavidin gekoppelt und durch die braune Farbreaktion des Farbstoffes DAB die Trop-2-Expression visualisiert. Die Zellkerne wurden anschließend mit Hämatoxylin blau gegengefärbt.

3.7 Erweiterte Expressionsanalyse von Trop-2 und Trop-1 (Ep-CAM)

3.7.1 Expression von Ep-CAM in kolorektalen Zelllinien und Geweben

Aufgrund der hohen Homologie von *TROP1* und *TROP2* (wird sich im weiteren Verlauf dieser Arbeit explizit auf die kodierenden Gensequenzen von Trop-2 und Trop-1 bezogen, so werden diese entsprechend der Literatur kursiv und in Großbuchstaben geschrieben) wurde ebenfalls die RNA- und Proteinexpression von Ep-CAM („Epithelial Cellular Adhesion Molecule“, Trop-1, TACSTD1) detaillierter untersucht.

In der Genchip-Analyse lagen die AvgDiff-Werte für Ep-CAM in allen Zelllinien nahe beieinander (Abb. 3.20, die letzten 5 schraffierten Balken).

Die „Northernblot“-Analyse mit einer 800 bp langen, für den 3'-UTR-Bereich von Ep-CAM spezifischen, cDNA bestätigte den vergleichsweise hohen und konstanten mRNA-Spiegel von Ep-CAM (Größe: 1,5 kb) in allen Zelllinien (Abb. 3.19 A). Es war keine Kreuzhybridisierung der Ep-CAM-spezifischen Sonde mit der 1,8 kb großen mRNA von Trop-2 erkennbar. Ein Immunblot mit je 20 µg Gesamtproteinlysaten der fünf Zelllinien und einem monoklonalen Antikörper gegen Ep-CAM zeigte, dass Ep-CAM auch auf Proteinebene nicht dereguliert war (Abb. 3.19 B). Allerdings war die Proteinexpression von Ep-CAM in den HCT116-Zellen deutlich niedriger als in den KM12-Zellen.

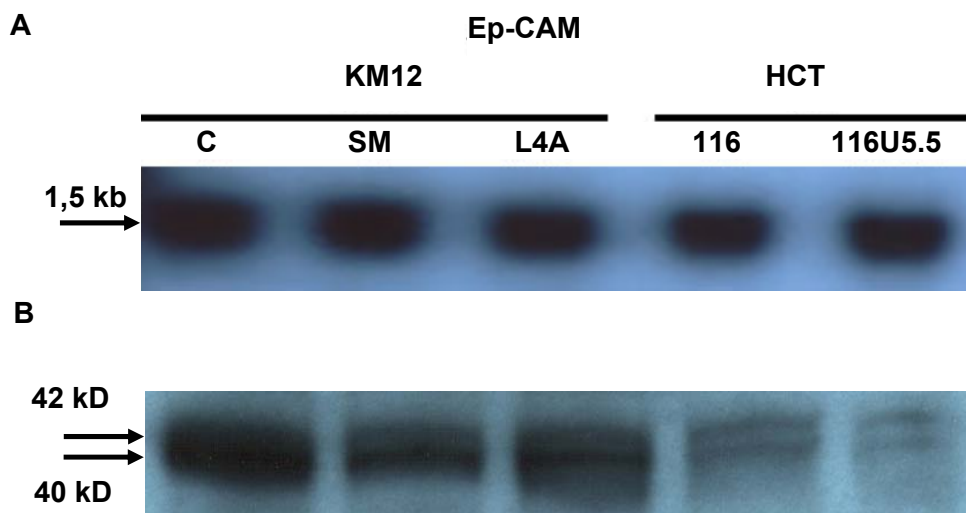


Abbildung 3.19: Expression von Ep-CAM in den Zellen der KM12- und HCT116-Zellmodelle.

A: „Northernblot“-Analyse von Ep-CAM in den Kolonkarzinom-Zelllinien. Je 10 µg Gesamt-RNA wurden in einem denaturierenden FA-Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ -markierten Sonde für Ep-CAM hybridisiert. Es wurde ein Ep-CAM-spezifisches Transkript von 1,5 kb detektiert (Pfeil).

B: „Westernblot“-Analyse. Die Expression des Ep-CAM-Proteins wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (Klon AUA1) in Kombination mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper in den Kolonkarzinom-Zelllinien nachgewiesen. Hierzu wurden zuerst gleiche Gesamtproteinmengen (20 µg), die mittels BCA-Proteinbestimmung ermittelt wurden, durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Es wurden zwei unterschiedliche Isoformen von Ep-CAM mit Größen von 42 kD und 40 kD detektiert (Pfeile).

Unter Zuhilfenahme der Genchip-Expressions-Datenbank für Kolongewebe (siehe Kapitel 3.5.1) konnte auch die Ep-CAM-Expression gleichzeitig in den 24 Kolon-Normalgeweben, 24 Kolon-Primärtumorgeweben, 8 Lebermetastasen und drei Leber-Normalgeweben analysiert werden (Abb. 3.20). Durchschnittlich war die Expression von Ep-CAM deutlich höher als die von Trop-2 (Faktor ca. 10-100), aber es war kein spezifisches Muster einer Deregulation von Ep-CAM in den kolorektalen Geweben ersichtlich.

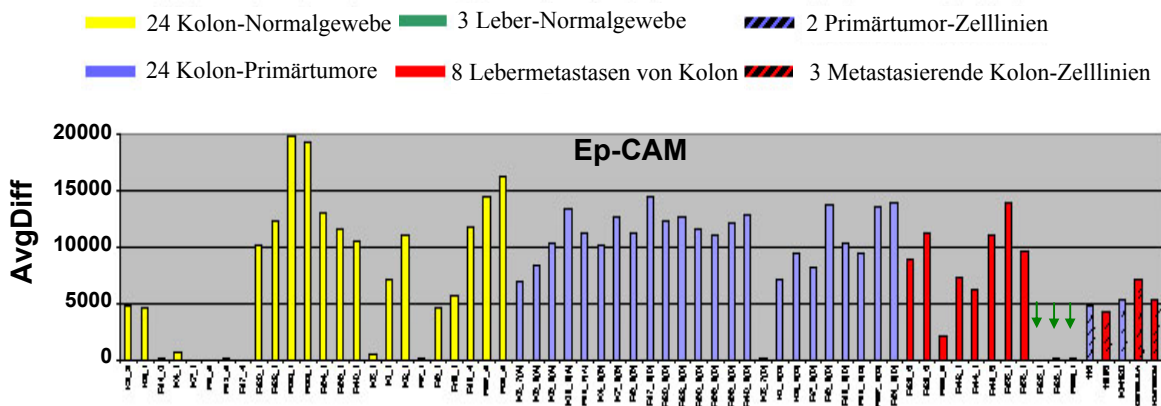


Abbildung 3.20: Ep-CAM-mRNA-Spiegel in 56 Normal- und Tumorgeweben aus Kolon, 3 Leber-Normalgeweben sowie zum Vergleich in den Kolonkarzinom-Zelllinien.

Von allen Geweben wurde mit Genchips das Expressionsprofil erstellt. Gezeigt sind die AvgDiff-Werte für Ep-CAM. Der AvgDiff-Wert wurde in Kapitel 2.2.3.1.8.7.1 definiert. Die Positionen der 3 Leber-Normalgewebe im Balkendiagramm sind durch grüne Pfeile markiert.

3.7.2 Expressionsanalyse von Trop-2 und Ep-CAM mit einem MTE-Array

Zur vergleichenden Untersuchung der Expressionsmuster von Trop-2 und Ep-CAM in einer Vielzahl von humanen Geweben wurde ein „Multiple Tissue Expression“-Array verwendet. Auf diesem war die mRNA von 57 verschiedenen, adulten Normalgeweben an definierter Position aufgebracht (Abb. 3.21 A). Zusätzlich enthielt der Array noch isolierte mRNA aus fötalem Gewebe und aus verschiedenen Zelllinien. Als Positivkontrollen wurden in die Planquadrate F6, G6 und H6 jeweils 1 µg, 0,5 µg und 0,1 µg isolierte mRNA der Zelllinie KM12SM aufgetragen. Für die Hybridisierung wurden die gleichen spezifischen Sonden-cDNA für Trop-2 (204 bp) oder Ep-CAM (800 bp) verwendet wie für die „Northernblot“-Analysen mit den Zelllinien in Kapitel 3.4.1.1 bzw. 3.7.1. Eine dem Array beigefügte cDNA von humanen Ubiquitin B (UBB) wurde als Ladungskontrolle verwendet. Nach der Markierung der jeweiligen Sonde mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ wurde diese über Nacht hybridisiert und der Array für 16 h bei -80°C auf einen Röntgenfilm exponiert.

Anschließend wurde die radioaktiv-markierte Sonden-cDNA durch „Strippen“ (siehe Kapitel 2.2.3.1.10.4) wieder entfernt und der MTE-Array konnte erneut hybridisiert werden. Die abschließende Hybridisierung mit der cDNA von Ubiquitin B bestätigte gleiche Mengen an mRNA auf der Nylonmembran (Abb. 3.21 B).

Im Überblick zeigte das Expressionsmuster von Trop-2 und Ep-CAM eine negative Korrelation in der Expression beider Gene. Normalgewebe, die Ep-CAM stark exprimierten (z.B. Kolon), zeigten eine nur sehr schwache Expression von Trop-2 und umgekehrt (z.B. Ösophagus).

Im Detail wurde Trop-2 (Abb. 3.21 C) in Ösophagus- (A5), Luftröhren- (H7), Nieren- (A7), Prostata- (E8) und Lungen-Normalgewebe (A8) als stark exprimiert identifiziert. Eine etwas schwächere Expression war in Speicheldrüsen- (E9) und Blasen-Normalgewebe (C8) zu erkennen. Sehr schwache Hybridisierungssignale für Trop-2 wurden mit adultem Pankreas-Normalgewebe (B9), sowie mit fötalem Nieren- (C11) und Lungengewebe (G11) erhalten.

Dahingegen wurden starke Hybridisierungssignale für Ep-CAM (Abb. 3.21 D) überwiegend in kolorektalem Normalgewebe (H5, A6-C6), sowie in Zwölffingerdarm- (C5), Schilddrüsen- (D9) und Ileozäkalem-Normalgewebe (F5) erhalten.

Sowohl die Ep-CAM- als auch die Trop-2-spezifische cDNA hybridisierte relativ stark an isolierte mRNA aus Nieren-Normalgewebe (A7) und deutlich schwächer an mRNA der kolorektalen Adenokarzinom-Zelllinie SW480 (G10). Zusätzlich war die Expression von Ep-CAM-mRNA in adultem Pankreas- (B9) und in fötalem Nierengewebe (C11) signifikant stärker als von Trop-2. Im Gegensatz dazu waren die mRNA-Spiegel von Ep-CAM in Prostata- (E8) und Lungen-Normalgewebe (A8) deutlich niedriger als von Trop-2.

Eine unspezifische Bindung von Sonden-cDNA an die 8 Kontroll-RNA oder Kontroll-DNA wurde nicht festgestellt (Spalte 12).

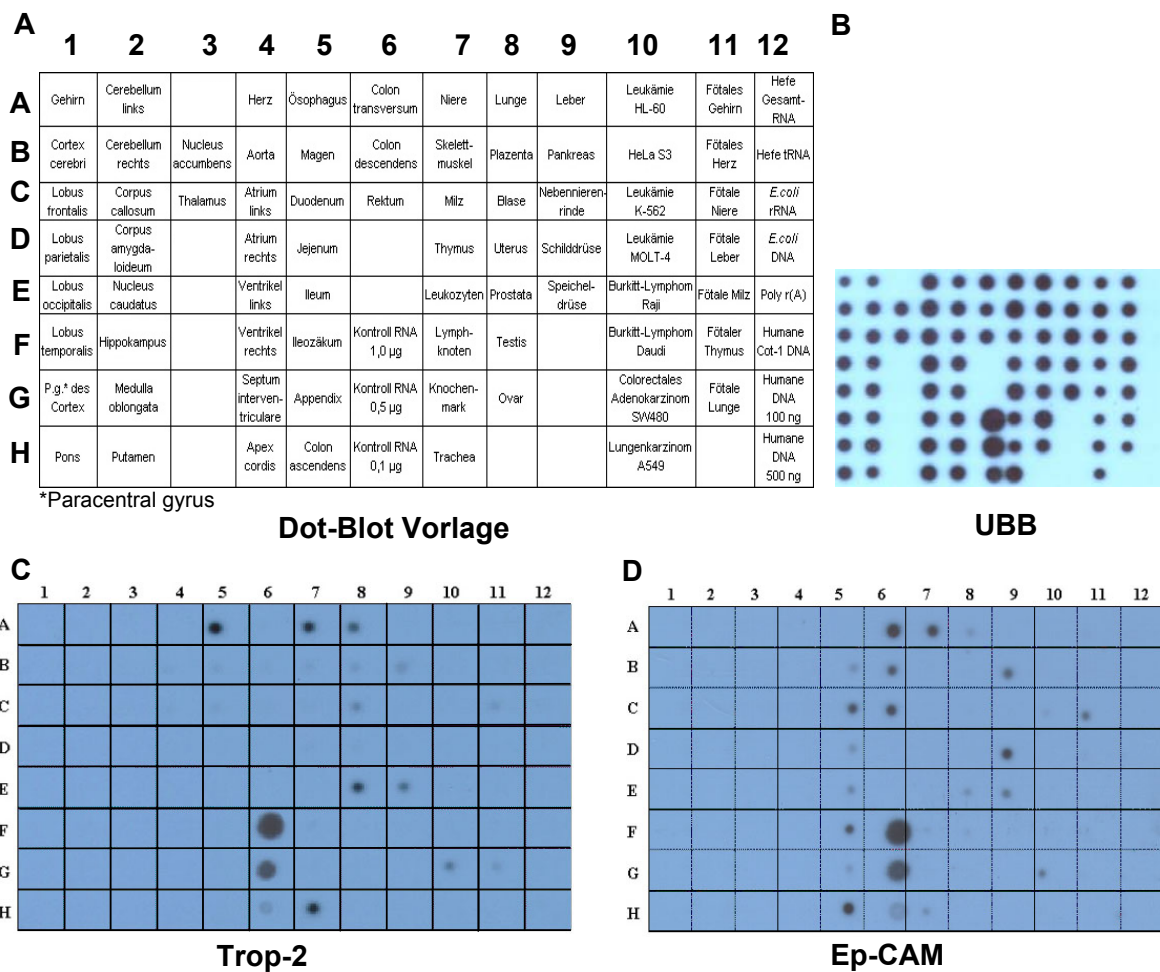


Abbildung 3.21: Expressionsanalyse von Trop-2 und Ep-CAM mit einem „Multiple Tissue Expression“-Array.

Die Expressionsstärke von Trop-2 (C) und Ep-CAM (D) wurde in einem großen Spektrum an fötalen und adulten Geweben sowie in einigen Tumor-Zelllinien untersucht. Der MTE-Array enthält 72 gewebespezifische Poly(A)-mRNA, deren Position in A dargestellt ist. Als Positivkontrollen wurden in die Planquadrate F6-H6 des Arrays jeweils 1 µg, 0,5 µg und 0,1 µg Poly(A)-mRNA der Zelllinie KM12SM aufgetragen. Für die Ladungskontrolle wurde der Array abschließend wieder „gestripped“ und mit einer vom Hersteller beigelegten cDNA von Ubiquitin B (UBB) rehybridisiert (B).

3.7.3 Expressionsanalyse von Trop-2 und Ep-CAM mit einem „Cancer Profiling“-Array

Die Expressionsanalyse von Trop-2- und Ep-CAM-mRNA in Geweben wurde mit einem „Cancer Profiling“-Array wesentlich erweitert. Auf diesem Array war die cDNA aus Primärtumor- und korrespondierendem Normalgewebe von insgesamt 241 Patienten aufgetragen. Somit erlaubte der „Cancer Profiling“-Array die gleichzeitige Analyse von insgesamt 13 verschiedenen Tumorarten (Abbildung 3.22). Für die Hybridisierung wurden

die gleichen spezifischen Sonden-cDNA wie für den MTE-Array (siehe Kapitel 3.7.2) verwendet. Die cDNA für Trop-2 und Ep-CAM wurden mit [α - 32 P]dATP markiert und über Nacht hybridisiert. Der Array wurde jeweils für 16 h bei -80°C auf einen Röntgenfilm exponiert. Anschließend wurde die radioaktiv-markierte Sonden-cDNA durch „Strippen“ (siehe Kapitel 2.2.3.1.10.4) wieder entfernt und der MTE-Array konnte erneut hybridisiert werden. Die abschließende Hybridisierung mit einer vom Hersteller beigefügten cDNA von Ubiquitin B bestätigte den Auftrag von normalisierten Mengen an cDNA auf die Nylonmembran (Abb. 3.22 C).

Auf dem Array waren einige cDNA-Sets aus Normalgeweben, Primärtumoren und zusätzlich aus den korrespondierenden Metastasen aufgetragen. Die Positionen der aufgetragenen cDNA aus Metastasengewebe sind in Abbildung 3.22 A und B durch Pfeile markiert. In drei der vier auf dem Array repräsentierten Metastasen von Kolon (Abb. 3.22 A, 14O, 14V und 14X) konnten stärkere Hybridisierungssignale für Trop-2 als im korrespondierenden Kolon-Primärtumor- (14P, 14W und 14Y) und Kolon-Normalgewebe (13O, 13V und 13X) detektiert werden. Für Ep-CAM dagegen wurden in den vier Metastasen des Kolons (Abb. 3.22 B, 14O, 14T, 14V und 14X) eher niedrigere mRNA-Spiegel als in den korrespondierenden Primärtumor- und Normalgeweben detektiert. Übereinstimmend mit den zuvor dargestellten Resultaten wurden keine oder nur sehr geringe Hybridisierungssignale für Trop-2 mit cDNA von normalem kolorektalen Gewebe erhalten (Abb. 3.22 A, Spalten 13, 15 und 35). Wenige stärkere Hybridisierungssignale für Trop-2 wurden mit cDNA von kolorektalem Primärtumorgewebe erhalten (Spalten 14, 16 und 36). Die kolorektale Expression von Ep-CAM war dagegen nicht dereguliert, mit hohen mRNA-Spiegeln in den meisten der untersuchten Normal- und Primärtumorgeweben.

Im Gegensatz zu Ep-CAM konnten starke Signale für Trop-2 in cDNA aus Brust- (Spalten 1-4) und Prostatagewebe (Spalten 39 und 40) beobachtet werden, allerdings ohne erkennbare Unterschiede zwischen Normal- und Primärtumorgewebe. Die cDNA aus Nierengewebe zeigte mit beiden Sonden ein überwiegend schwächeres Hybridisierungssignal in den Normalgeweben. In der cDNA aus Uterus- (Spalten 7-10) und Ovargeweben (Spalten 23 und 24) waren sowohl Trop-2- als auch Ep-CAM-mRNA-Spiegel in den kanzerogenen Geweben vorwiegend erhöht.

Interessanterweise zeigten 12 der 21 untersuchten Bronchialkarzinome, davon 4 der 7 Adenokarzinome und 8 der 12 Plattenepithelkarzinome, stark erhöhte mRNA-Spiegel von Trop-2 (Abb. 3.22 A, Spalte 28). Ebenso waren 5 der 6 repräsentierten Schilddrüsenkarzinome stark positiv für Trop-2 (Spalte 40 A-E), während mit den korrespondierenden Normalgeweben keine Hybridisierungssignale erhalten wurden (Spalte 39 A-E).

Eine unspezifische Bindung von Sonden-cDNA an Kontroll-RNA und/oder Kontroll-DNA auf dem Array wurde nicht festgestellt (Spalte 48).

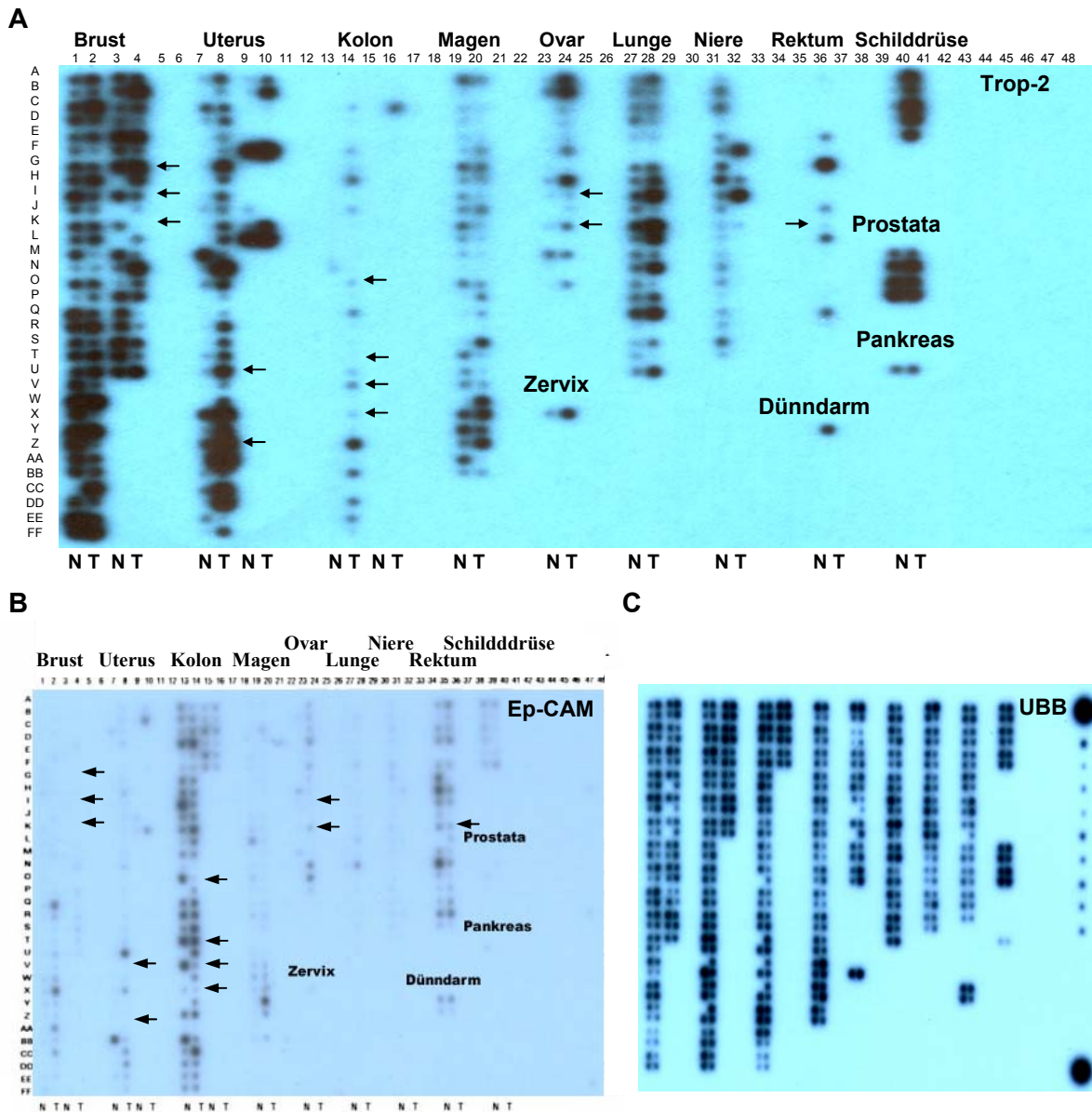


Abbildung 3.22: Expressionsanalyse von Trop-2 und Ep-CAM mit einem humanen „Cancer Profiling“-Array.

Der Array, der mit cDNA von 241 Tumor- und korrespondierenden Normalgeweben von verschiedenen Patienten beladen war, wurde mit [α - 32 P]dATP-markierter Trop-2 (A) oder Ep-CAM (B) Sonden-cDNA hybridisiert. 12 der Sets enthielten noch eine zusätzliche dritte Probe eines Metastasengewebes (Pfeile). 9 Zelllinien und Kontrollen waren in der letzten Spalte aufgetragen (48).

Position der Gewebe auf dem Array: **1A-4U:** Brustgewebe, **7A-10L:** Uterusgewebe, **13A-16F:** Kolongewebe, **19A-20BB:** Magengewebe, **23A-24P:** Ovargewebe, **23X-24X:** Zervixgewebe, **27A-28U:** Lungengewebe, **31A-32T:** Nierengewebe, **35A-36S:** Rektumgewebe, **35Y-36Z:** Dünndarmgewebe, **39A-40F:** Schilddrüsengewebe, **39M-40P:** Prostatagewebe, **39U-40U:** Pankreasgewebe. Position von humanen Tumor-Zelllinien: **48D:** HeLa, **48F:** Burkitt's Lymphom, Daudi, **48H:** Chronische myeloische Leukämie, K562, **48J:** Promyelozytenleukämie, HL-60, **48L:** Melanom, G361, **48N:** Lungenkarzinom, A549, **48P:** Lymphoblastenleukämie, MOLT-4, **48R:** Kolorektales Adenokarzinom, SW480, **48T:** Burkitt's Lymphom, Raji.

Zum Test auf gleiche Beladung an cDNA wurde der Array abschließend „gestriped“ und mit einer [α - 32 P]dATP-markierten humanen cDNA von Ubiquitin B (UBB) hybridisiert (C).

N = Normalgewebe, T = Tumorgewebe.

3.7.4 Proteinexpression von Trop-2 in Lungen- und Schilddrüsengeweben

Im vorhergehenden Kapitel 3.7.3 wurden erstmalig erhöhte Trop-2-mRNA-Spiegel in Lungen- und Schilddrüsentumorgewebe beschrieben. Um diesen ersten Befund zu erhärten, wurde die Expressionsanalyse von Trop-2 auf die immunhistochemische Analyse von Lungen- und Schilddrüsentumorgewebe erweitert. Hierzu wurde ein Multi-tumor-Gewebearray (MA1) und ein dazugehöriger zweiter Array (MAN1), auf dem die korrespondierenden Normalgewebe aufgetragen waren, (siehe Kapitel 2.1.7.3) verwendet. Unter anderem enthielten die zwei Arrays Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Schnitte von zehn Lungenprimärtumoren und den zehn korrespondierenden Normalgeweben. Die Krebsgewebe wurden als zwei ausdifferenzierte Adenokarzinome, zwei großzellige Karzinome und sechs bronchogene Plattenepithelkarzinome [„Squamous Cell Carcinoma“ (SCC)] diagnostiziert. Zusätzlich enthielten die Arrays zehn Papillenkarcinome und die korrespondierenden Normalgewebeschnitte von Schilddrüsen. Je zwei Objektträger (OT) eines Arrays wurden immunhistochemisch mit einem Trop-2-spezifischen Antikörper markiert und mit je einem OT wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Doppelfärbung durchgeführt. Die Klassifizierung der Färbungsintensitäten für Trop-2 nach der immunhistochemischen Markierung der Gewebe erfolgte am Institut für Pathologie der Universität Regensburg unter Anleitung des Pathologen M. Woenckhaus. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse sind in Tabelle 3.9 zusammengefasst.

Im Gegensatz zu den Lungen-Normalgeweben, die keine Anfärbung erkennen ließen, wurde in sieben der zehn Krebsgeweben eine starke membranständige Färbung mit dem Trop-2-spezifischen Antikörper erhalten (Abb. 3.23 C, D und F). In zwei weiteren Lungenkarzinomen konnten noch ca. 5-10% der Zellen als immunpositiv klassifiziert werden.

Neun der zehn analysierten Schilddrüsen-Normalgewebe, die hauptsächlich Schilddrüsenfollikel repräsentierten, zeigten keine Immunreaktion mit dem Trop-2-spezifischen Antikörper. Interessanterweise waren aber neun der zehn dazu korrespondierenden Gewebeschnitte aus Papillenkarcinomen immunpositiv für Trop-2 (Abb. 3.23 C, D und F).

Somit konnte die erhöhte Expression von Trop-2 in Karzinomgewebe von Lunge und Schilddrüse auch auf Proteinebene bestätigt werden. Wie in den Metastasen von kolorektalen Karzinomen exprimierten auch in diesen Geweben nur die Epithelzellen das Trop-2-Protein. Die Trop-2-Expression in den Epithelzellen war ausschließlich membranständig, wie die Detailaufnahmen in Abbildung 3.23 E und F zeigen.

Nr.	Lunge				Schilddrüse			
	Trop-2-Immunreaktivität		Diagnose	TNM	Trop-2-Immunreaktivität		Diagnose	TNM
Normal	Tumor	Normal			Tumor			
1	-	+	Adenokarzinom	T2N1M0	-	+	Papillenkarzinom	T2N0M0
2	-	-	Großzelliges Karzinom	T2N1M0	-	++	Papillenkarzinom	T4N1aM0
3	-	+++	Bronchogenes SCC	T2N1M0	+	+++	Anaplastisches Karzinom	T4N1aMX
4	-	+++	Bronchogenes SCC	T2N1M0	-	+++	Papillenkarzinom	T4N1aM0
5	-	+++	Bronchogenes SCC	T4N1M0	-	+++	Papillenkarzinom	T4N1aM0
6	-	+++	Adenokarzinom	T2N1M0	+++*	+++	Papillenkarzinom	T4N1M0
7	-	+++	Bronchogenes SCC	T2N1M0	-	+++	Papillenkarzinom	T2N0M0
8	-	+++	Bronchogenes SCC	T3N1M0	-	+	Papillenkarzinom	T4N1M0
9	-	++	Bronchogenes SCC	T2N1M0	-	+++	Papillenkarzinom	T4NXM0
10	-	+	Bronchogenes SCC	T2N1M0	-	-	Papillenkarzinom	T4N1M0

Tabelle 3.9: Expression von Trop-2 in Lungen- und Schilddrüsenkarzinomen sowie den korrespondierenden Normalgeweben.

Die immunhistochemische Färbung wurde mit einem Multitumor-Gewebearray (MA1) und einem Normalgewebe-Array (MAN1) wie in Kapitel 2.2.2.4 beschrieben durchgeführt. Die Lungen-Normalgewebe stammten aus den Lungenalveolen, die Lungentumore wurden alle als nicht-kleinzellige Karzinome diagnostiziert. Die Schilddrüsentumore wurden als Papillenkarzinome diagnostiziert mit Ausnahme von Probe Nummer 3 (Anaplastisches Karzinom). Der Stern kennzeichnet ein Papillenkarzinom in der Gewebeprobe Nummer 6.

SCC = „Squamous Cell Carcinoma“. Klassifizierung: "-" keine immunpositiven Zellen, "+" 5-10%, "++" 10-50%, "+++" mehr als 50% immunpositive Zellen.

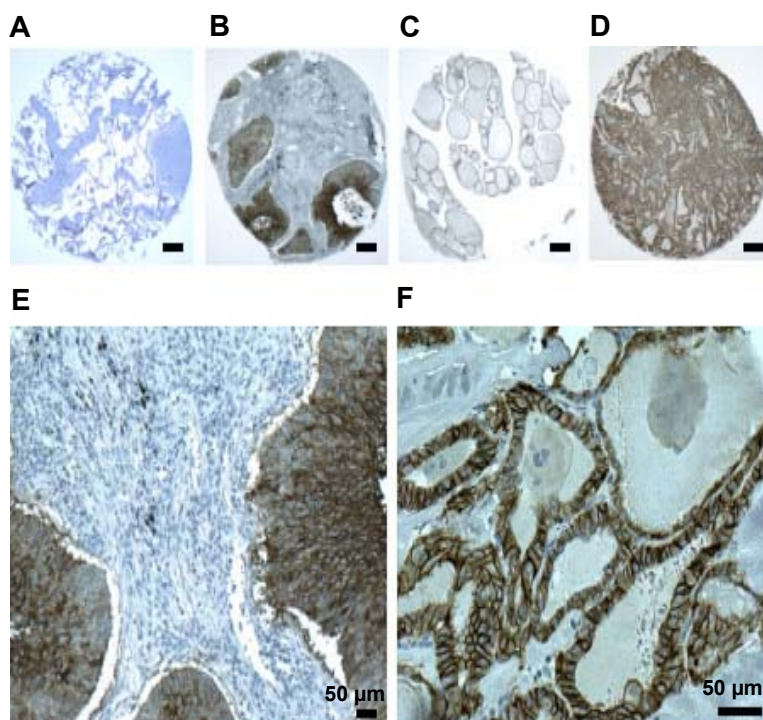


Abbildung 3.23: Repräsentative Bilder für die immunhistochemische Analyse von Trop-2 in Lungen- und Schilddrüsenkarzinomen, sowie den korrespondierenden Normalgeweben.

A: Normale Lungenalveolen.
B und E: Plattenepithelkarzinom in der Lunge.

C: Normale Schilddrüsenfollikel.
D und F: Papillenkarzinom in der Schilddrüse.

Die immunhistochemische Färbung wurde mit einem Multitumor-Gewebearray (MA1) und einem Normalgewebe-Array (MAN1) wie in 2.2.2.4 beschrieben durchgeführt.

Der Längenstandard in Abb. A-D entspricht 250 µm.

3.8 Etablierung eines zellulären Systems zur funktionellen Analyse von Trop-2

3.8.1 Stabile Transfektion von KM12C-Zellen mit Trop-2

Die Zelllinie KM12C eignete sich zusammen mit ihren Abkömmlingen KM12SM und KM12L4A als ein zelluläres Modellsystem für nicht-invasive Primärtumore des Kolons und dem abgeleiteten invasiven Phänotyp. Vergleichende *in vitro*-Analysen mit dem Zellmodell resultierten bereits zuvor in einer Reihe von wichtigen Erkenntnissen über die molekularen Ereignisse, die zum metastasierenden Phänotyp des kolorektalen Karzinoms führen (Li *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1996; Avizienyte *et al.*, 2002). In den vorhergehenden Kapiteln konnte gezeigt werden, dass sowohl das Transkript des *TROP2*-Gens als auch das translatierte Trop-2-Proteinprodukt ausschließlich in den invasiven Zelllinien nachweisbar war.

Daraus resultierte die Frage, ob die transgene Expression von Trop-2 in der nicht-invasiven Zelllinie KM12C eine Veränderung der Zelleigenschaften hin zum invasiven Phänotyp verursachen kann. Damit könnte der Expression von Trop-2 eine funktionelle Bedeutung für die Metastasierung von Karzinomzellen des Kolons zugesprochen werden.

3.8.1.1 Konstruktion eines Expressionsvektors für Trop-2

Die gleichen mRNA-Isolate der Zelllinien KM12SM und KM12L4A, von denen in der „Northernblot“-Analyse ein hoher Trop-2-mRNA-Spiegel nachgewiesen werden konnte, wurden zunächst mit Oligo-p(dT)₁₅-Primern revers transkribiert. Daraufhin sollte mit den erhaltenen cDNA und entsprechenden Primern die kodierende Region des *TROP2*-Gens amplifiziert werden. Die Amplifikation des kompletten Trop-2-ORF mit 972 bp gelang allerdings weder mit den erstellten cDNA, noch mit DNA-Isolaten aus den Zellen. Test-PCR zeigten, dass alle verwendeten Primer an die Sequenzen des 3'-UTR der erstellten Trop-2-cDNA hybridisieren konnten. Allerdings konnte keine adäquate Primerbindungsstelle im 5'-UTR und im Bereich des Startkodons identifiziert werden. Eine Sequenzanalyse ergab einen GC-Gehalt von 71% im gesamten untersuchten 5'-UTR von 616 bp und von 77% in den 100 bp unmittelbar vor dem Startkodon. Zusätzlich enthielt die kodierende Sequenz 38 G- oder C-Nukleotide innerhalb der ersten 45 Basen (84,5 %). Eine weitere Schwierigkeit bestand in der hohen Homologie der *TROP2*-Sequenz in der Region des Start- und Stopkodons zu einer DNA-Sequenz im ORF des Gens für das „Smooth Muscle Cell Associated Protein-1“ (SMAP-1). Die unspezifischen Amplifikate von *SMAP1* hatten eine Größe von 962 bp, weshalb eine gelelektrophoretische Auftrennung und visuelle Unterscheidung von Trop-2-ORF- und SMAP-1-PCR-Produkten erschwert war. Die Schwierigkeiten bezüglich der Amplifikation der *SMAP1*-Gensequenz konnten

mit einem Plasmid, das einen genomischen Klon von *TROP2* (AC: X77753) aus einer cDNA-Bank enthielt, gelöst werden. In dem freundlicherweise von S. Alberti zur Verfügung gestellten pBJI-neo Expressionsvektor war die kodierende Region von *TROP2* zusammen mit flankierenden Sequenzen kloniert.

Der pBJI-neo-Trop-2-Vektor wurde als PCR-Vorlage verwendet um mit spezifischen Primern ein Amplifikat des ORF von Trop-2 zu erhalten. Direkt flankierend an den ORF wurden zusätzlich mit den eingesetzten Primern Trop-2_*Nhe* I_for und Trop-2_*Bam* HI_rev Schnittstellen für *Nhe* I und *Bam* HI generiert. Aufgrund des bereits erwähnten hohen GC-Gehaltes im 5'-UTR und im Bereich des *TROP2*-Startkodons wurde dazu ein modifiziertes PCR-Protokoll mit 5% DMSO und 1,5 M Betain (Baskaran *et al.*, 1996) und einer Anlagerungstemperatur von 75°C verwendet (siehe Kapitel 2.2.3.2.1.3). In Abbildung 3.24 ist anhand einer Auftrennung der PCR-Produkte in einem Agarosegel gezeigt, dass die Zugabe von DMSO zu einem Standard-PCR-Ansatz (Spur 2), im Vergleich zur PCR ohne DMSO (Spur 4) die Synthese eines kürzeren Amplifikats von ca. 850 bp erleichterte. Erst durch zusätzlichen Einsatz des Aminosäureanaloges Betain wurde die Schmelztemperatur der GC-reichen DNA ausreichend gesenkt. Damit war eine Anlagerung des „vorwärts“-Primers an die spezifische Sequenz in der Region des Startkodons von *TROP2* möglich (Spur 3) und es konnte zusätzlich das gewünschte 985 bp große PCR-Produkt erhalten werden. Durch Verwendung von Betain ohne DMSO konnte das 985 bp große Amplifikat nicht erhalten werden (Abb. nicht gezeigt).

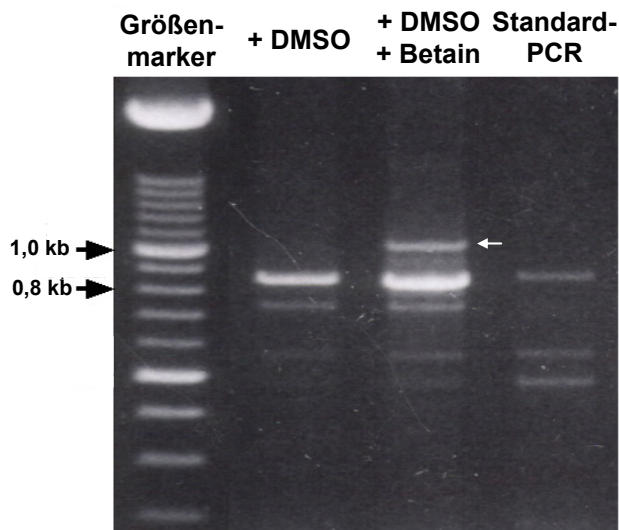


Abbildung 3.24: PCR-Amplifizierung des offenen Leserahmens von *TROP2* aus einem genomischen Klon.

Ein Trop-2-spezifisches PCR-Produkt von 985 bp wurde nur durch Zugabe von 5% DMSO und 1,5 M Betain in eine Standard-PCR-Reaktion erhalten. Die entsprechende Bande wird in Spur 3 durch einen weißen Pfeil angedeutet.

Die Amplifikate wurden in einem 1,5%igen Agarosegel für 90 min bei 70 V aufgetrennt. In jede Spur wurden 30 µl der PCR-Produkte aufgetragen. Die 1,0 kb und 0,8 kb Banden des Größenmarkers in Spur 1 sind durch Pfeile markiert.

Das 985 bp große Amplifikat der kodierenden Sequenz von Trop-2 wurde über die eingefügten *Nhe* I und *Bam* HI Restriktionsschnittstellen in die multiple Klonierungsstelle des Expressionsvektors pcDNA3.1/Hygro (+) ligiert. Hierbei wurde die kodierende Sequenz des *TROP2*-Gens unter die Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors gebracht. Der Trop-2-Expressionsvektor wird weiterhin als pcDNA3.1_Trop-2 bezeichnet.

Die Sequenzierung der Insertion bei der Firma Medigenomix (Martinsried) mit zwei überlappenden Trop-2-spezifischen Primern (Trop-2_Seq_for und Trop-2_Seq_rev) bestätigte das korrekte Einfügen in den Vektor. Gleichzeitig wurde somit bestätigt, dass keine PCR-generierten Punktmutationen in der Sequenz vorhanden war (Vektorkarte und Sequenz der Expressionskassette für Trop-2 sind im Anhang aufgeführt).

3.8.1.2 Herstellung und Selektion stabiler Trop-2-Transfektanten

Die FACS-Analyse einer transienten Transfektion von KM12C-Zellen mit dem Kontrollvektor pCI-neo-GFP und der Liposomenformulierung Lipofectamine 2000 identifizierte eine ausreichend gute Transfektionseffizienz von 18%. Daraufhin wurden KM12C-Zellen mit dem Trop-2-Expressionsvektor, pcDNA3.1_Trop-2, wie in Kapitel 2.2.1.6 beschrieben transfiziert. Zusätzlich wurden KM12C-Zellen mit dem Leervektor pcDNA3.1/Hygro (+) transfiziert und somit in Selektionsmedium mit 100 µg/ml Hygromycin stabile Leervektor- (*mock*-) Klone etabliert, die kein Trop-2 exprimierten. Die optimale Hygromycinkonzentration von 100 µg/ml für die Selektion von stabil transfizierten Klonen wurde zuvor mit einem MTT-Test ermittelt. Nach circa 4 Wochen im Selektionsmedium wurden mit Hilfe von Klonierungszyklindern einzelne Kolonien isoliert und in 96-Lochplatten überführt. Die Expansion der isolierten Einzelklone erwies sich für die mit dem pcDNA3.1_Trop-2-Expressionsvektor transfizierten Zellen als schwierig. Es wurden zuerst circa 250 separate Zellkolonien (> 1000 Zellen) isoliert, die aber alle nicht zu größeren Zellzahlen propagiert werden konnten, sondern bereits nach wenigen Tagen abstarben. Die Zugabe eines Antioxidantiencocktails zur Reduktion des oxidativen Stresses bei niedriger Zelldichte, die nach der Überführung in 96-Lochplatten entsteht, ergab keine wesentliche Verbesserung. Erst die Zugabe von 50% an konditioniertem Medium zum Selektionsmedium (unter Angleichung der Hygromycinkonzentration) führte zur Expansion von 5 stabil Leervektor-transfizierten Klonen und von insgesamt 28 Klonen, die mit dem pcDNA3.1_Trop-2-Vektor transfiziert wurden.

Von jedem der expandierten Zellklone wurde nach 3 Tagen die Gesamt-RNA isoliert und die Expression von Trop-2 mit 10 µg RNA in einer „Northernblot“-Analyse untersucht. Es exprimierten 7 der 28 untersuchten Zellklone die mit dem Vektor pcDNA3.1_Trop-2 transfiziert wurden, ein Trop-2-spezifisches Transkript von 1,2 kb (Abb. 3.25). Das natürlich vorkommende Transkript von 1,8 kb wurde anhand eines RNA-Isolats der Zelllinie KM12SM als Kontrolle aufgetragen (Abb. 3.25, Spur 1). Zwei Klone exprimierten noch ein weiteres längeres RNA-Molekül von 3,5 kb (Klon 1 und 9). In allen fünf untersuchten Zellklonen, die nur mit dem Leervektor pcDNA3.1/Hygro (+) transfiziert wurden (pcDNA3.1_*mock*), waren keine Trop-2-spezifischen Transkripte nachweisbar.

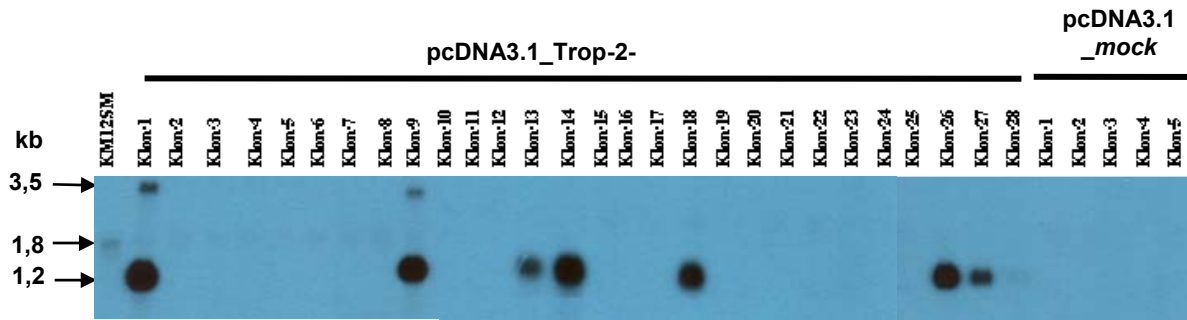


Abbildung 3.25: „Northernblot“-Analyse der Trop-2-mRNA-Spiegel in isolierten Zellklonen nach Transfektion der Zelllinie KM12C mit dem pcDNA3.1_Trop-2-Expressionsvektor oder dem Leervektor als *mock*-Kontrolle.

Insgesamt exprimierten 7 der 28 analysierten Klone ein spezifisches Transkript für Trop-2 von 1,2 kb. In den 5 analysierten Leervektorkontrollen war kein Trop-2-Transkript nachweisbar. Isolierte RNA der Zelllinie KM12SM wurde in Spur 1 zur Kontrolle aufgetragen und ergab das erwartete Hybridisierungssignal von 1,8 kb (Pfeil). Zwei Klone exprimierten ein zusätzliches Transkript von 3,5 kb (Pfeil).

Je 10 µg isolierte Gesamt-RNA wurden in einem denaturierenden FA-Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer [α - 32 P]dATP-markierten Sonde für Trop-2 hybridisiert (siehe Kapitel 2.2.3.1.10). Zur besseren Übersicht sind in der Abbildung drei individuelle Membranen nebeneinander dargestellt.

Von den sieben Zellklonen, die nach der Transfektion mit dem pcDNA3.1_Trop-2-Vektor ein Trop-2-spezifisches Transkript exprimierten (Abb. 3.25), wurden Gesamtproteinlysate hergestellt und mittels einem Immunblot die Translation der Trop-2-mRNA in den Zellklonen überprüft (Abb. 3.26). Von den sieben untersuchten Zellklonen wiesen drei Klone (Klon 9, 14 und 26) eine induzierte Proteinexpression von Trop-2 mit zwei Isoformen von 50 kD und 48 kD auf. Das Auftreten dieser zwei Isoformen wurde bereits in den metastasierenden Zelllinien beobachtet (siehe Kapitel 3.6.1.1, Abb. 3.15). In den zwei untersuchten Leervektor-transfizierten Klonen wurde kein Trop-2-Protein detektiert. Der Zellklon 9 mit einer starken Trop-2-Proteinexpression konnte allerdings zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr weiter kultiviert werden.

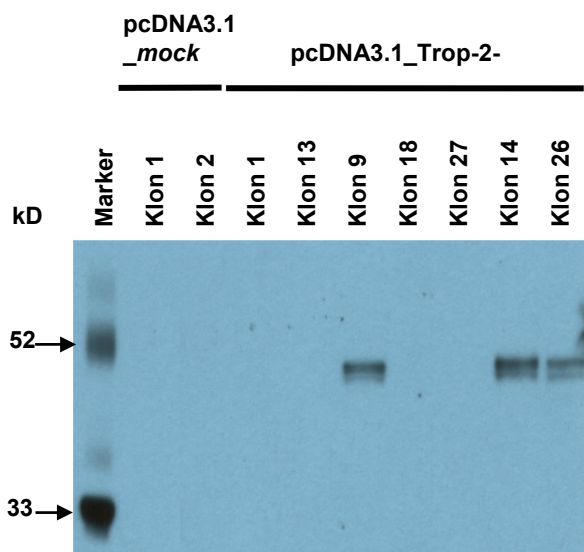


Abbildung 3.26: Proteinexpression von Trop-2 in isolierten Zellklonen nach Transfektion der Zelllinie KM12C mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1_Trop-2 oder dem Leervektor als *mock*-Kontrolle.

In 3 der insgesamt 7 analysierten Transfektanten konnte eine Proteinexpression von Trop-2 identifiziert werden.

Die Expression des Trop-2-Proteins wurde in der „Westernblot“-Analyse mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (AF650) in Kombination mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Hierfür wurden zuerst gleiche Gesamtproteinmengen (10 µg), die mittels einer BCA-Proteinbestimmung ermittelt wurden, durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Pfeile deuten auf die 33 kD und 52 kD Banden des Größenmarkers (Spur 1).

Mittels einer semiquantitativen RT-PCR-Analyse am LightCycler unter Verwendung der Primer Trop-2_Seq_for und Trop-2_Seq_rev konnte die relative Expression von Trop-2 in den Transfektanten auf RNA-Ebene abgeschätzt werden. Hierzu wurde der Faktor bestimmt, mit dem Trop-2 in den Transfektanten stärker exprimiert vorlag als in den KM12C-Zellen, die zur Transfektion verwendet wurden. Dies ergab folgende Reihenfolge: pcDNA3.1_Trop-2-Klon 14 (Faktor 2192) > pcDNA3.1_Trop-2-Klon 26 (Faktor 530) > pcDNA3.1_mock-Klon 1 (Faktor 1,2) > pcDNA3.1_mock-Klon 2 (Faktor 1,1).

3.8.2 Nachweis von Trop-2 in den Transfektanten durch Immunfluoreszenz- und FACS-Analysen

Die korrekte zelluläre Lokalisation von Trop-2 in den transgenen Zelllinien wurde anschließend zuerst durch eine Immunfluoreszenz-Analyse überprüft. Die Trop-2-transfizierten Zellen zeigten eine deutliche membranständige Expression von Trop-2. In Abbildung 3.27 sind repräsentative Trop-2-CY3-markierte Zellen sowie die mit DAPI-gefärbten Zellkerne gezeigt. Ein Einzelbild der Trop-2-CY3-Färbung des mit dem pcDNA3.1_Trop-2-Vektor stabil transfizierten Zellklons 14 ist in Abbildung 3.27 A und das Einzelbild der DAPI-Gegenfärbung ist in Abbildung 3.27 B dargestellt. In der Immunfluoreszenz-Analyse mit den entsprechenden Leervektorkontrollen wurde lediglich eine schwache Autofluoreszenz der Zellen detektiert und es waren keine spezifischen Signale für Trop-2 zu erkennen (Abb. nicht gezeigt).

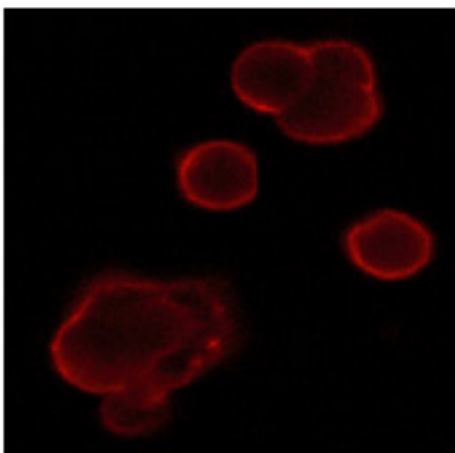
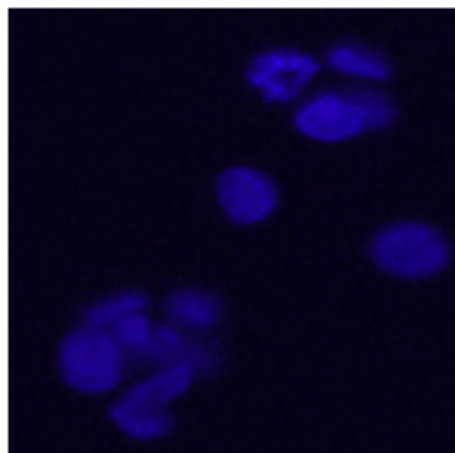
A**B**

Abbildung 3.27: Immunfluoreszenz-Analyse der Trop-2-Proteinexpression in den Transfektanten. A, B: Das CY3-Einzelbild der Proteinexpression von Trop-2 in der Transfektante pcDNA3.1_Trop-2-Klon 14 (A) zeigt, dass das Protein auf der Zellmembran lokalisiert ist. Das entsprechende Einzelbild der DAPI-Kernfärbung ist in Abb. B gezeigt.

Von auf Deckgläsern fixierten und permeabilisierten Zellen wurde die Trop-2-Expression mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (AF650) in Kombination mit einem CY3-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Den Fluoreszenzsignalen für CY3 wurde die Falschfarbe rot, für DAPI blau zugeordnet.

Zusätzlich wurde untersucht ob eine Expression von Trop-2 in den Transfektanten auch über einen längeren Zeitraum gewährleistet ist. Hierzu wurden die Klone pcDNA3.1_Trop-2-Klon 14 und Klon 26 sowie zwei Leervektorkontrollen vier Wochen mit Selektionsmedium in Kultur gehalten und anschließend die Proteinexpression von Trop-2 am FACScan Durchflusszytometer überprüft.

In Abbildung 3.28 A ist die starke Oberflächenexpression von Trop-2 in Zellen der transfizierten Zelllinie pcDNA3.1_Trop-2-Klon 26 nach vier Wochen Zellkultur zu erkennen. Zum Vergleich ist das Histogramm mit der Leervektor-Transfektante pcDNA3.1_mock 1 in Abbildung 3.28 B dargestellt, das keine Trop-2-Expression erkennen lässt. Der zweite Klon pcDNA3.1_Trop-2-Klon 14 exprimierte ebenfalls nach einem Zeitraum von vier Wochen noch deutlich das Trop-2-Protein (Daten nicht gezeigt).

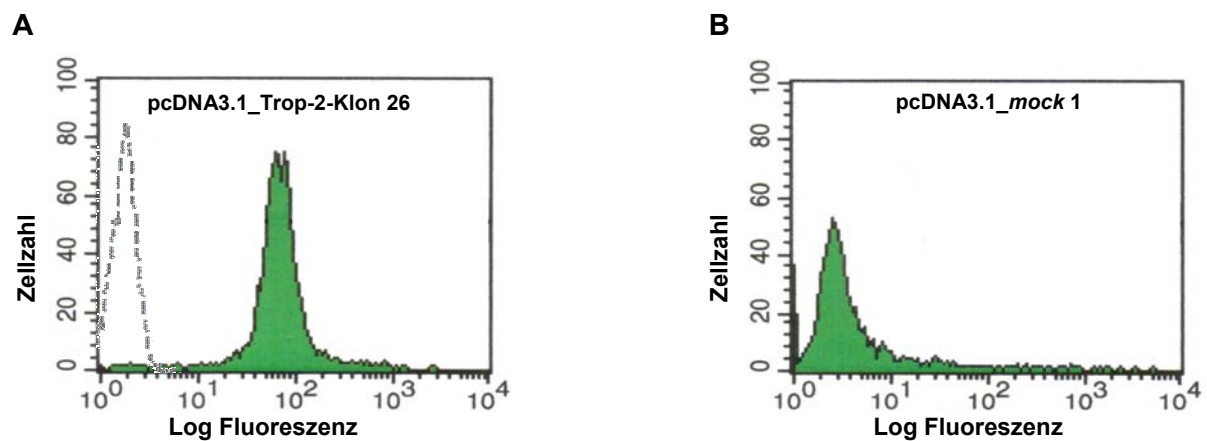


Abbildung 3.28: FACS-Analyse zur Bestimmung der Oberflächenexpression von Trop-2 in einer exemplarischen Transfektante nach 28 Tagen.

A und B: Trop-2-Expression in der Zelllinie pcDNA3.1_Trop-2-Klon 26 nach 28 Tagen in Zellkultur (A), sowie in der Leervektor-Transfektante pcDNA3.1_mock 1 (B).

1×10^6 -Zellen wurden mit Hilfe eines Trop-2-spezifischen Antikörpers (AF650) in Kombination mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Je Probe wurden anschließend 1×10^4 -Zellen analysiert. In den Histogrammen ist die Zellzahl gegen den Logarithmus der Fluoreszenzintensität aufgetragen. Gezeigt ist jeweils ein Histogramm von drei Experimenten. Als Negativkontrolle diente die Inkubation ohne 1. Antikörper (FITC-Kontrolle, in Abb. 3.28 A gestrichelt dargestellt).

3.9 Zellbiologische Untersuchungen mit den Trop-2-Transfektanten

3.9.1 Untersuchungen zur Motilität der KM12-Zellen und Transfektanten

3.9.1.1 Invasionsstest

Die Verwendung von modifizierten „Boyden-Kammern“ ist eine klassische *in vitro*-Methode zur Untersuchung der Tumordinvasion (Albini *et al.*, 1987). Hierbei wurde ein mit 8 µm großen Poren durchsetzter Filtereinsatz von einer dünnen Matrigelschicht bedeckt. Das Matrigel kann als eine *in vitro*-rekonstituierte Basalmembran angesehen werden und besteht im wesentlichen aus deren Hauptkomponenten wie Laminin, Entaktin, Kollagen IV und Heparansulfat-Proteoglykan. Die Matrigelschicht hindert nicht-invasive Zellen daran, durch den Filtereinsatz zu wandern. Im Gegensatz dazu exprimieren invasive Zellen geeignete Enzyme, um die Bestandteile der Basalmembran zu degradieren und sind somit in der Lage den Filtereinsatz zu durchwandern.

Es wurden je 1×10^5 -Einzelzellen in Medium mit 5% FKS auf den Matrigel-beschichteten Filtereinsatz gegeben. Anschließend wurden mit dem Farbstoff MTT alle Zellen quantifiziert, die sich nach 72 h Inkubation im unteren Kompartiment mit 20% FKS als Chemoattraktant befanden. Der Prozentsatz an invadierten Zellen zur Gesamtzellzahl wurde nach der Gleichung 2.4 (siehe Kapitel 2.2.1.11) errechnet. In Abbildung 3.29 werden die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten als Balkendiagramm gezeigt. Die stark metastasierenden Zelllinien KM12SM (21,4%, roter Balken) und KM12L4A (19,5%, grüner Balken) zeigten beinahe doppelt so viele invasive Zellen wie die nicht-metastasierende Zelllinie KM12C (10,9%, blaue Balken). Die mit dem Leervektor-transfizierten *mock*-Zellklone (pcDNA3.1_ *mock* 1: 10,4% und *mock* 2: 11,1%, blau-schwarz schraffierte Balken) zeigten ein der Wildtyp-Zelllinie KM12C vergleichbares Invasionsvermögen durch die Matrigelschicht. Keine signifikanten Veränderungen im Invasionspotential im Vergleich zu den Leervektor-Transfektanten wurde mit den zwei untersuchten Trop-2-transfizierten Zellklonen (pcDNA3.1_Trop-2-Klon 14: 11,2% und Klon 26: 12,2%, Abb. 3.29, gelbe Balken) erhalten.

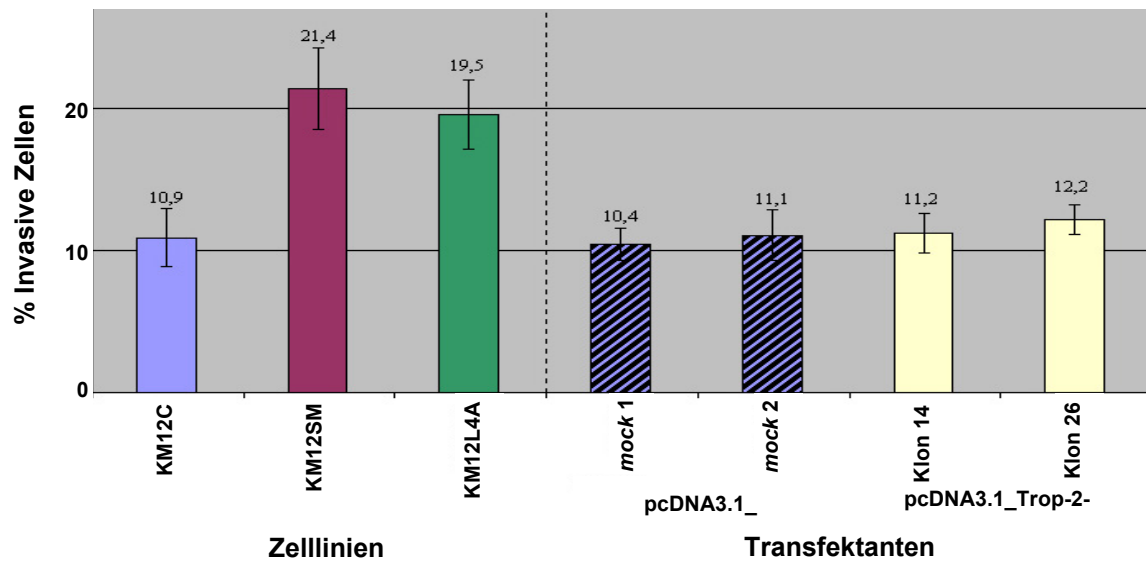


Abbildung 3.29: *In vitro*-Invasionstest zur Bestimmung der Invasionsfähigkeit von Zellen des KM12-Zellmodells und der Transfektanten.

Die stark metastasierenden Zelllinien KM12SM (roter Balken) und KM12L4A (grüner Balken) zeigten ein erhöhtes invasives Potential im Vergleich zu den nicht-metastasierenden KM12C-Zellen (blauer Balken). Keine Veränderungen im invasiven Potential konnte in den Trop-2-transfizierten Zellklonen 14 und 26 (gelbe Balken) im Vergleich zu den Leervektorkontrollen (blau-schwarz schraffierte Balken) identifiziert werden.

Mittels der MTT-Konversion wurde der Prozentsatz an Zellen ermittelt, die in 72 h durch einen mit Matrigel beschichteten Filtereinsatz gewandert waren. Gezeigt sind die prozentualen Anteile von invasiven Zellen zur Gesamtzahl der eingesetzten Zellen (1×10^5). Untersucht wurden die Zelllinien KM12C, KM12SM und KM12L4A, Zellen der Leervektor-Transfektanten pcDNA3.1_mock 1 und 2 sowie die stabil Trop-2-transfizierten Zelllinien pcDNA3.1_Trop-2-Klon 14 und Klon 26. Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.9.1.2 Migrationstest

Für den Verlauf der Invasion von metastasierenden Zellen ist eine veränderte Regulation von enzymatischen Prozessen entscheidend. Um Metastasen in entfernt liegenden Organen ausbilden zu können, ist aber zusätzlich eine erhöhte Motilität der Zellen notwendig, die mittels eines *in vitro*-Migrationstests untersucht wurde. Der Testansatz erfolgte analog zum vorhergehenden Invasionstest, indem je 1×10^5 -Einzelzellen in Medium mit 5% FKS auf den mit 8 μm großen Poren durchsetzten Filtereinsatz (ohne Matrigelschicht) gegeben wurden. Mit dem Farbstoff MTT wurden die Zellen quantifiziert, die sich nach 72 h Inkubation im unteren Kompartiment mit 20% FKS als Chemoattraktant befanden. Zusätzlich wurde als Vergleich mit der MTT-Konversion die Gesamtzahl der Zellen nach 72 h in beiden Kompartimenten bestimmt. Der Prozentsatz migrierter Zellen an der Gesamtzellzahl wurde nach der Gleichung 2.4 (siehe Kapitel 2.2.1.11) errechnet.

Abbildung 3.30 zeigt das Ergebnis von drei unabhängigen Wiederholungen des Migrationstests als Balkendiagramm. Die lokomotorische Fähigkeit der stark

metastasierenden Zellen KM12SM (23,4%, roter Balken) und KM12L4A (22,9%, grüner Balken) durch die Membran zu wandern war im Vergleich zu den Zellen der nicht-metastasierenden Zelllinie KM12C (19,6%, blauer Balken) nur minimal erhöht. Die Leervektor-transfizierten Zellklone (pcDNA3.1_ *mock* 1: 19,5% und *mock* 2: 21,6%, blau-schwarz schraffierte Balken) zeigten im Vergleich zur nicht-transfizierten Zelllinie KM12C kein verändertes Migrationsvermögen durch die Poren des Filtereinsatzes. Es wurde aber ein deutlich erhöhtes Migrationspotential in den Trop-2-Transfektanten (pcDNA3.1_Trop-2-Klon 14: 32,7% und Klon 26: 37,8%, gelbe Balken) festgestellt. Daraus ließ sich eine prozentuale Erhöhung der Anzahl an migrierten Zellen im unteren Kompartiment der „Boyden-Kammer“ von 51%-94% in den Trop-2-Transfektanten im Vergleich zu den Leervektor-Transfektanten errechnen.

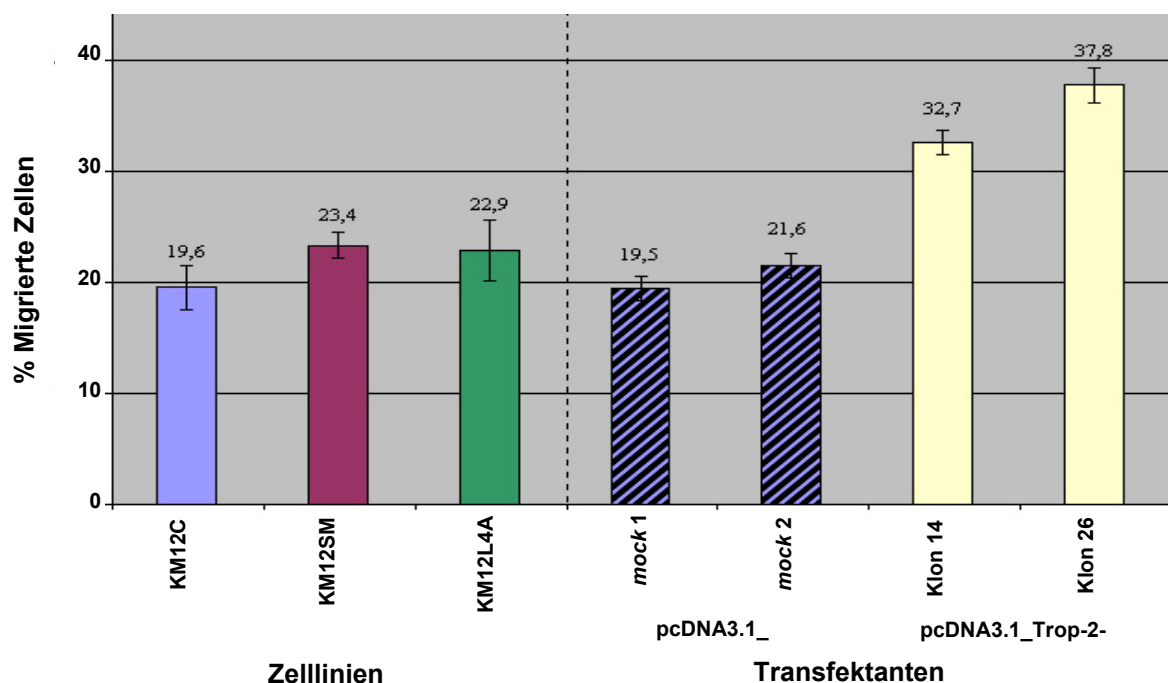


Abbildung 3.30: *In vitro*-Migrationstest zur Bestimmung der Motilität von Zellen des KM12-Zellmodells und der Transfektanten.

Die stark metastasierenden Zelllinien KM12SM (roter Balken) und KM12L4A (grüner Balken) zeigten ein nur geringfügig erhöhtes Migrationsverhalten im Vergleich zu den nicht-metastasierenden KM12C-Zellen (blauer Balken). Dahingegen konnte ein deutlich erhöhtes Migrationspotential in den Trop-2-transfizierten Zellklonen 14 und 26 (gelbe Balken) im Vergleich zu den Leervektorkontrollen (blau-schwarz schraffierte Balken) beobachtet werden.

Mit der MTT-Konversion wurde der Prozentsatz an Zellen ermittelt, die in 72 h durch einen Filtereinsatz mit 8 µm großen Poren gewandert waren. Gezeigt sind die prozentualen Anteile von migrierten Zellen an der Gesamtzahl der eingesetzten Zellen (1×10^5). Untersucht wurden die Zelllinien KM12C, KM12SM und KM12L4A, Zellen der Leervektor-Transfektanten pcDNA3.1_ *mock* 1 und *mock* 2 sowie die stabil Trop-2-transfizierten Zelllinien pcDNA3.1_Trop-2-Klon 14 und Klon 26. Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.9.2 Bestimmung der Zelladhäsion an Substrate der extrazellulären Matrix

Obwohl die Zusammensetzung der EZM für unterschiedliche Gewebe spezifisch ist, enthält sie doch für gewöhnlich immer bestimmte Komponenten wie Kollagene, Laminine, Fibronectin und Vitronectin. Mit dem Zelladhäsions-Assay sollte für Trop-2 eine mögliche Funktion als Mediator von Zell-Matrix-Interaktionen untersucht werden. Hierzu wurden 96-Lochplatten entweder mit Kollagen I, Kollagen IV, Laminin, Fibronectin oder Vitronectin beschichtet. In jede mit einer EZM-Komponente beschichteten Vertiefung wurden 1×10^5 fluoreszenzmarkierte Zellen gegeben. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden nach einer Inkubation für 90 min durch vorsichtige Waschschriffe entfernt. Die adhärenenten Zellen wurden relativ zur Gesamtzahl der ausgesäten Zellen an einem Fluoreszenz-Messgerät bei 485 nm quantifiziert (siehe Gleichung 2.3, Kapitel 2.2.1.10.2). In Abbildung 3.31 wird der Prozentsatz an adhärenenten Zellen als Mittelwert von drei unabhängigen Wiederholungen des Zelladhäsionstests mit den KM12-Zelllinien sowie den Leervektor- und Trop-2-Transfektanten gezeigt.

Es wurde erstmalig eine signifikant erhöhte Adhäsion von Zellen der beiden metastasierenden Zelllinien KM12SM und KM12L4A an alle fünf untersuchten Substrate der EZM im Vergleich zur nicht-metastasierenden Zelllinie KM12C beobachtet. Durchschnittlich konnten sich ca. 20% der 1×10^5 eingesetzten KM12C-Zellen binnen 90 min an die untersuchten Substrate anheften. Zellen der spontan-metastasierenden Zelllinie KM12SM zeigten das höchste Adhäsionsvermögen an allen fünf Substraten. Dabei konnten sich die KM12SM-Zellen mit 39,4% am besten an Vitronectin anlagern (Abb. 3.31, violetter Balken) und am schlechtesten an Laminin (Abb. 3.31, gelber Balken) mit immer noch 28,8%. Dies bedeutet eine Erhöhung der Adhäsionsfähigkeit von KM12SM-Zellen um 78% für Vitronectin und von 61% für Laminin im Vergleich zu den KM12C-Zellen. Von den KM12L4A-Zellen adhärenenten binnen 90 min im Schnitt circa 30% der Zellen an die immobilisierten Substrate der EZM. Die Ausnahme war auch hier Laminin an das sich nur 22,7% der Zellen binden konnten.

Das Adhäsionsvermögen der Leervektor-transfizierten Zellen, pcDNA3.1_*mock* 1 und *mock* 2, glich im wesentlichen dem der Wildtyp KM12C-Zellen, mit Ausnahme eines leicht erhöhten Prozentsatzes für Kollagen I (25,6% in pcDNA3.1_*mock* 1 > 25,0% in pcDNA3.1_*mock* 2 > 20,3% in KM12C). Die beiden stabil Trop-2-transfizierten Zellklone pcDNA3.1_Trop-2-Klon 14 und Klon 26 wiesen keine deutlich veränderten Adhäsionsspezifitäten für eines der EZM-Substrate im Vergleich zu den Leervektorkontrollen auf. Insgesamt erschien das durchschnittliche Adhäsionsvermögen der Trop-2-Transfektanten etwas erniedrigt gegenüber den Leervektorkontrollen, allerdings waren die Unterschiede zu marginal um eine eindeutige Aussage treffen zu können.

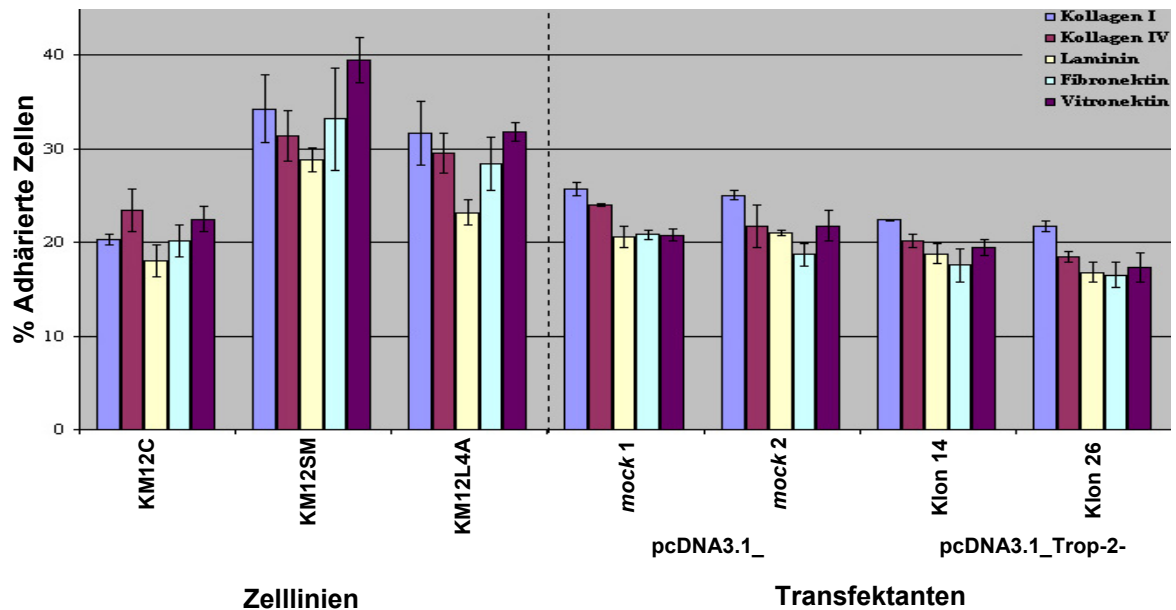


Abbildung 3.31: Adhäsionstest von Zellen des KM12-Zellmodells und der stabil transfizierten *mock*- bzw. Trop-2-Zellklone an verschiedene Substrate der EZM.

Die stark metastasierenden Zelllinien KM12SM und KM12L4A zeigten ein deutlich erhöhtes Adhäsionsvermögen an die 5 untersuchten Komponenten der EZM im Vergleich zu den nicht-metastasierenden KM12C-Zellen. Keine Veränderungen im Adhäsionsvermögen konnte dahingegen in den stabil Trop-2-transfizierten Zellklonen 14 und 26 im Vergleich zu den Leervektor-kontrollen identifiziert werden.

Fluoreszenzmarkierte Zellen der Zelllinien KM12C, KM12SM und KM12L4A, der Leervektor-transfizierten Klone pcDNA3.1_ *mock* 1 und *mock* 2 sowie der stabil Trop-2-transfizierten Zelllinien pcDNA3.1_Trop-2-Klon 14 und Klon 26 wurden auf mit EZM-Substraten beschichteten 96-Lochplatten ausgesät. Nach 90 min Inkubation wurden die nicht-adhärierten Zellen entfernt und die Fluoreszenz der adhären Zellen bei 485 nm gemessen. Gezeigt sind die prozentualen Anteile von adhären Zellen an der Gesamtzahl der eingesetzten Zellen (1×10^5). Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Getestet wurde auf das Adhäsionsvermögen an die EZM-Komponenten Kollagen I und IV, Laminin, Fibronektin und Vitronektin.

3.10 Identifizierung von Trop-2-regulierten Genen

3.10.1 Analyse der Proteinexpression von Cyclin D1 in Trop-2-Transfektanten

In den metastasierenden Zellen KM12SM und KM12L4A wurde erst kürzlich ein um den Faktor 1,5 erhöhter Proteinspiegel von Cyclin D1 im Vergleich zu den nicht-metastasierenden Zellen KM12C beschrieben (Herynk *et al.*, 2003). Deshalb sollte als nächster Schritt in den Zelllinien und Transfektanten die Möglichkeit einer Korrelation zwischen der erhöhten Cyclin D1- (CCND1) und Trop-2-Expression untersucht werden. Hierfür wurden zuerst jeweils 10 µg Gesamtproteinextrakte durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde mittels einer „Westernblot“-Analyse die Proteinexpression von Cyclin D1 nach der konstitutiven Trop-2-Expression in den stabil transfizierten KM12C-Zellen sowie als Kontrolle in den KM12-Zellen bestimmt. Die

Immunmarkierung erfolgte mit Hilfe eines spezifischen polyklonalen Antikörpers (M-20) und eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers.

Die Zelllinien KM12SM und KM12L4A zeigten beide im Vergleich zu KM12C-Zellen eine Induktion des Cyclin D1-Proteins um den Faktor 3,3 (Abb. 3.32 A). Die „Westernblot“-Analyse identifizierte das Cyclin D1-Protein mit der erwarteten Größe von 33 kD.

Die „Westernblot“-Analyse zeigte ebenfalls in den Trop-2-Transfektanten eine Erhöhung des Proteinspiegels von Cyclin D1. Dieser wurde anhand einer Quantifizierungs-Software (LumiAnalyst) um den Faktor 1,5 höher als in den Leervektorkontrollen bestimmt (Abb. 3.32 B).

Der Unterschied in der Cyclin D1-Expression war, wie die Markierung des Immunblots mit einem für β -Aktin-spezifischen Antikörper (Klon JLA20) zeigt, nicht auf ungleiche Gesamtproteinmengen zurückzuführen.

Der erhöhte Cyclin D1-Proteinspiegel resultierte in keinem veränderten Proliferationsverhalten der Trop-2-transfizierten Zellklone. Sowohl von den Leervektorkontrollen als auch von den Trop-2-exprimierenden Transfektanten wurden Zellteilungsdaten von genau 24 Stunden ermittelt (Daten nicht gezeigt).

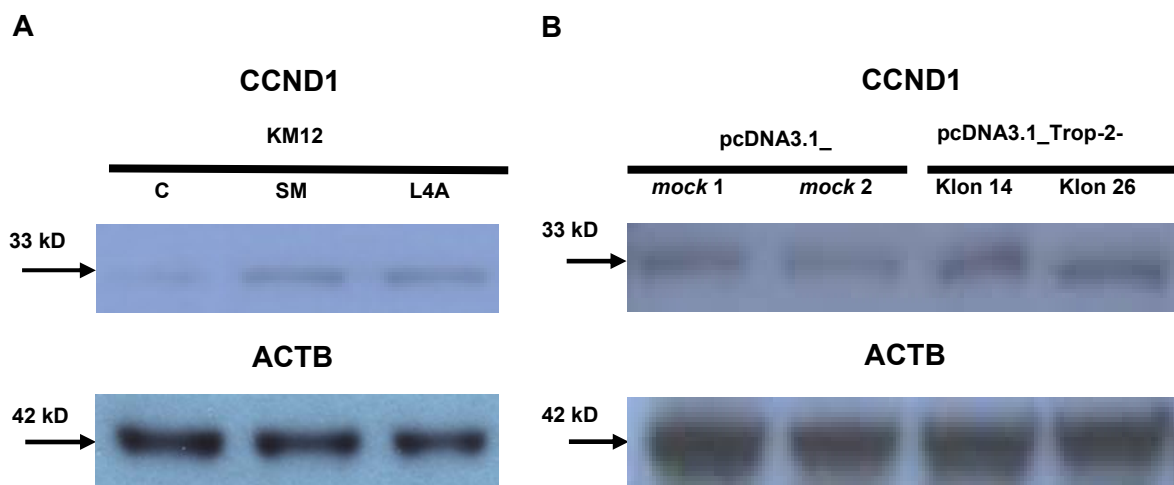


Abbildung 3.32: Proteinexpression von Cyclin D1 in dem KM12-Zellmodell und den stabil transfizierten *mock*- bzw. Trop-2-Zellklonen.

A: Expression des Cyclin D1-Proteins in der nicht-metastasierenden Zelllinie KM12C und den metastasierenden Zelllinien KM12SM und KM12L4A.

B: Expression des Cyclin D1-Proteins in den Leervektorkontrollen, pcDNA3.1_*mock* 1 und *mock* 2 sowie in den stabil Trop-2-transfizierten Zellen pcDNA3.1_Trop-2-Klon 14 und Klon 26.

Die Expression des Cyclin D1-Proteins wurde in einer „Westernblot“-Analyse mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (M-20) in Kombination mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Hierfür wurden zuerst gleiche Gesamtproteinmengen (10 μ g), die mittels BCA-Proteinbestimmung ermittelt wurden, durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Der Antikörper gegen Cyclin D1 wurde nach der Exposition von der Membran gewaschen und anschließend wurde mit einem spezifischen Antikörper für β -Aktin (ACTB) eine Proteinladungskontrolle durchgeführt.

Die Positionen der Banden für Cyclin D1 (33 kD) und ACTB (42 kD) sind jeweils durch einen Pfeil angezeigt.

3.10.2 Analyse der Proteinexpression von β -Catenin in Trop-2-Transfektanten

Es sollte nachfolgend untersucht werden, ob der erhöhte Proteinspiegel von Cyclin D1 nach konstitutiver Trop-2-Expression in KM12C-Zellen mit einer Erhöhung der Expression von β -Catenin- (CTNNB1: „Catenin Beta 1“) korrelierte. Hierfür wurden zuerst je 10 μ g Gesamtproteinextrakte der KM12-Zelllinien sowie der Transfektanten durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde in einer „Westernblot“-Analyse die Proteinexpression von β -Catenin mit einem monoklonalen Maus-Immunglobulin (Klon 14) gegen β -Catenin und einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper bestimmt. Der resultierende Immunblot ist in Abbildung 3.33 gezeigt.

Es wurden mittels SDS-PAGE zwei Isoformen von β -Catenin in der erwarteten Größe von 92 kD aufgetrennt. Bei einer weiteren, nicht-deregulierten Doppelbande im Größenbereich von 102 kD handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine Kreuzhybridisierung mit α -Catenin. Die Größe beider Doppelbanden konnte durch einen 98 kD Größenmarker eindeutig identifiziert werden, der genau zwischen den beiden Doppelbanden lag (Abb. nicht gezeigt). Der Proteinspiegel von β -Catenin war in den stark metastasierenden Zellen KM12SM um den Faktor 2,0 bzw. um den Faktor 2,4 in KM12L4A im Vergleich zu den nicht-metastasierenden KM12C-Zellen erhöht (Abb. 3.33).

Bemerkenswert war, dass eine Deregulation von β -Catenin ebenfalls in den Transfektanten beobachtet werden konnte. Der Immunblot in Abbildung 3.33 zeigt die Erhöhung des Proteinspiegels von β -Catenin in den Trop-2-Transfektanten im Vergleich zu den Leervektorkontrollen. Die durchschnittliche Signalintensität wurde mit den Transfektanten anhand einer Quantifizierungs-Software (LumiAnalyst) um den Faktor 1,5 höher als in den Leervektorkontrollen bestimmt.

Dass der Unterschied in der β -Cateninexpression nicht aus dem Auftrennen ungleicher Proteinmengen resultierte zeigt die Markierung des Immunblots mit einem für β -Aktin- (ACTB-) spezifischen Antikörper (Klon JLA20).

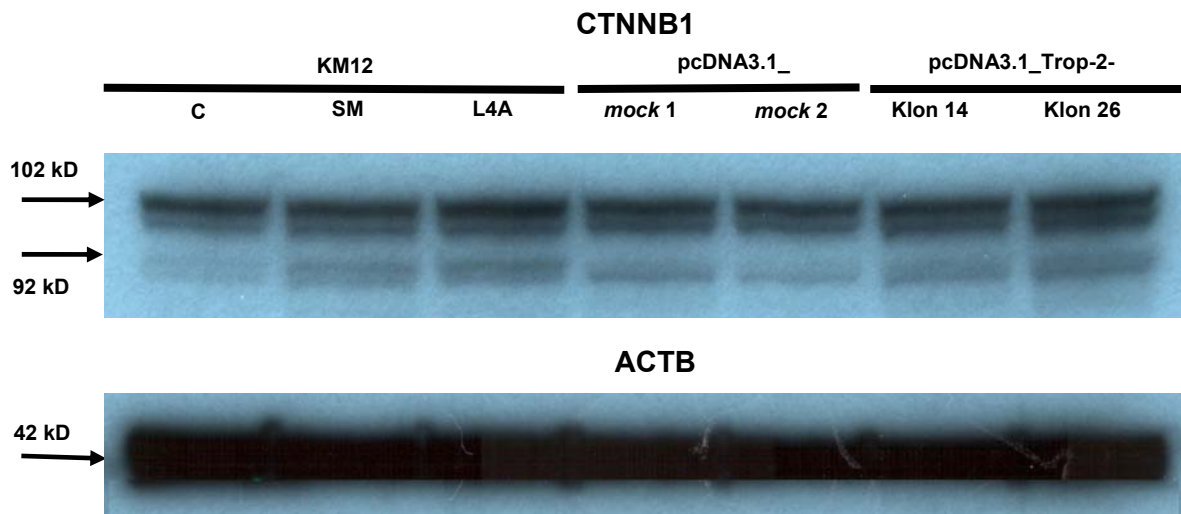


Abbildung 3.33: Proteinexpression von β -Catenin in dem KM12-Kolon-Zellmodell und den stabil transfizierten *mock*- bzw. Trop-2-Zellklonen.

Die Expression des β -Cateninproteins wurde in einer „Westernblot“-Analyse mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (Klon 14) in Kombination mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Hierfür wurden zuerst gleiche Gesamtproteinmengen (10 μ g), die mittels BCA-Proteinbestimmung ermittelt wurden, durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gesamtproteinlysate wurden von der nicht-metastasierenden Zelllinie KM12C, den metastasierenden Zelllinien KM12SM und KM12L4A, den Leervektorkontrollen, pcDNA3.1_*mock* 1 und *mock* 2 sowie den stabil Trop-2-transfizierten Zellen pcDNA3.1_Trop-2-Klon 14 und Klon 26 isoliert. Der spezifische Antikörper für β -Catenin wurde nach der Exposition von der Membran gewaschen und anschließend wurde mit einem β -Aktin- (ACTB-) spezifischen Antikörper eine Proteinladungskontrolle durchgeführt.

Die Position der Doppelbande für die zwei Isoformen von β -Catenin ist bei 92 kD durch einen Pfeil angezeigt. Eine zusätzliche nicht-deregulierte Doppelbande wurde bei 102 kD erhalten. Die Position der Bande für ACTB (42 kD) ist im unteren Bild durch einen Pfeil markiert.

4 Diskussion

Nachdem das humane Genomprojekt im wesentlichen abgeschlossen war (McPherson *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001), wurde ein verstärktes Augenmerk auf die Bestimmung der biologischen Relevanz und der funktionellen Eigenschaften der ~ 35000 humanen Gene gelegt. Für die Abfolge von genetischen Veränderungen, die in einer kolorektalen Karzinogenese resultieren, konnte bereits frühzeitig ein detailliertes Modell aufgestellt werden (Fearon und Vogelstein, 1990; Arends, 2000). Dahingegen sind die komplexen molekularen Mechanismen, die ausgehend von gutartigen kolorektalen Karzinomzellen zu der Ausbildung eines malignen Phänotyps führen, noch wenig verstanden. Ein Schwerpunkt der aktuellen Forschung am kolorektalen Krebs besteht deshalb in der Identifikation von Genen, die in der Progression zum malignen kolorektalen Karzinom eine Rolle spielen. Mit Hilfe von DNA-Mikroarrays und anderen Hochdurchsatzmethoden konnten spezifische Genexpressionsmuster identifiziert werden, die eine deutliche Abgrenzung der humanen Kolon-Primärtumoren von den Metastasen erlaubten (Parle-McDermott *et al.*, 2000; Takemasa *et al.*, 2001; Agrawal *et al.*, 2002; Bertucci *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsprofil von nicht-metastasierenden Kolonkarzinom-Zelllinien mit der Genexpression von metastasierenden Kolon-Zelllinien verglichen. Jedes Gen für sich, das mit diesem Ansatz als differentiell exprimiert bestimmt wurde, könnte einen potentiellen molekularen Marker für die kolorektale Metastasierung oder einen potentiellen therapeutischen Ansatz darstellen. Zusätzlich wird die Identifizierung und Charakterisierung dieser Gene zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen und Signalwege der malignen Progression führen.

4.1 Die Genchip-Analyse von Zellmodellen

4.1.1 Das KM12-Zellmodell

Zuerst wurden mit Oligonukleotid-Mikroarrays die Unterschiede im genetischen Muster zwischen den nicht-metastasierenden KM12C-Zellen und den dazu isogenen, stark metastasierenden KM12L4A- und KM12SM-Zellen (Morikawa *et al.*, 1988a) analysiert. Die KM12-Zelllinien stellen ein häufig verwendetes Modell für die *in vitro*-Analyse der humanen kolorektalen Metastasierung dar (Li *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1996; Avizienyte *et al.*, 2002). Zusätzlich wurde gezeigt, dass sie sich für die Identifizierung differentiell exprimierter Gene mittels cDNA-Arrays eignen (Hernandez *et al.*, 2000; Hegde *et al.*, 2001). Ein wesentlicher Vorteil des KM12-Zellmodells besteht darin, dass die sehr stark in die Leber metastasierenden Varianten einen direkten genetischen Bezug zur Primärtumor-Zelllinie haben. Somit konnte erwartet werden, dass der Hauptanteil aller un-

tersuchten Gene in den drei Zelllinien eine vergleichbare Expressionshöhe zeigt. Dadurch wurde die Identifizierung der differentiell exprimierten Gene, die mit dem Prozess der Metastasierung assoziiert sind, erleichtert.

Die Verwendung von kolorektalen Zellmodellen an Stelle von frischen Tumorbiopsien zur Identifizierung von deregulierten Genen basiert auf mehreren gravierenden Vorteilen der etablierten Zelllinien. Während man bei Tumorbiopsien oft mit Degradationserscheinungen konfrontiert ist, bieten Zelllinien eine permanente Quelle an Material (z.B. RNA-Isolate) in konstant guter Qualität. Zusätzlich handelt es sich bei Zelllinien um genau definierte Zellpopulationen, während bei Tumorbiopsien meistens andere infiltrierende Zelltypen nicht vollständig entfernt werden können. Die Problematik eines *in vitro*-kultivierten Zellmodells liegt allerdings im Verlust von natürlichen, gewebe-spezifischen Einflüssen auf die Tumorzelle. Deshalb war eine anschließende Bestätigung der differentiellen Expression eines Kandidatengens in Gewebeproben von Patienten unerlässlich. Zog man diese Faktoren mit in Betracht, so stellten die drei KM12-Zelllinien ein geeignetes Modell zur Identifizierung progressionsassoziiertes Kandidatengens des Kolonkarzinoms dar.

4.1.1.1 Im KM12-Zellmodell wurden 182 Gene und EST als dereguliert bestimmt

Durch die gleichzeitige Analyse des Expressionsspiegels von Tausenden von Genen können Oligonukleotidarrays ein Bild des Momentanzustandes einer Zelle vermitteln. Dies führt zu einer schnellen Identifizierung und Selektion von Kandidatengenen, deren differentielle Expression dann weiter überprüft werden kann (Brown und Botstein, 1999; Evtimova *et al.*, 2001). In der vorliegenden Studie wurde das komplette HG-U95-GeneChip[®] Set der Firma Affymetrix, bestehend aus 5 unterschiedlichen Arrays, verwendet, um gleichzeitig Veränderungen im Expressionsmuster von 12652 Genen (HG-U95Av2-Array) und circa 50000 EST (HG-U95B-E-Arrays) zu analysieren. Somit war es möglich, die Expression von bis zu einem Drittel aller transkribierten Gene des kompletten humanen Genoms zu untersuchen. Durch Assemblierungen von überlappenden EST-Sequenzen wurde abgeschätzt, dass das menschliche Genom zusätzlich noch mindestens 85000 mRNA-Spezies transkribiert (Liang *et al.*, 2000). Auch wenn nach ersten Sequenzanalysen für 46000 der assemblierten mRNA kein proteinkodierendes Potential erkannt werden konnte, so repräsentieren die EST-Cluster wahrscheinlich noch eine beträchtliche Anzahl an Genen (Audic und Claverie, 2000). Für die Analyse der differentiell exprimierten Gene im KM12-Zellmodell wurden stringente Algorithmen eingesetzt, um signifikante und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Basierend auf diesen begrenzenden Kriterien, wie einem „Change Factor“ (CF) von > 2 oder < -2 und

einer „Change Factor Quality“ von > 1 , konnten 182 Gene und EST als dereguliert in beiden metastasierenden Zelllinien im Vergleich zur nicht-metastasierenden Zelllinie KM12C identifiziert werden. Die Proteinprodukte und die volle Länge der mRNA waren von 145 der differentiell exprimierten Gene bekannt. Vier der 145 Transkripte waren als EST-Cluster auf den HG-U95B-E-Arrays repräsentiert und konnten erst vor kurzem distinkten, kodierenden Genen zugeordnet werden. Zieht man also nur das Ergebnis mit dem HG-U95Av2-Array in Betracht, konnten 141 Gene (1,1% der 12652 repräsentierten Gene) identifiziert werden, die in beiden metastasierenden Zelllinien entweder als induziert oder reprimiert bestimmt wurden.

Hegde *et al.* (2001) erstellten zur gleichen Zeit ebenfalls Genexpressionsprofile der KM12-Zelllinien mit Mikroarrays, auf denen die cDNA von 19200 ausgewählten Klonen aufgetragen war. Mit diesem Ansatz identifizierte die Arbeitsgruppe 1911 Gene und EST (9,9%) als differentiell exprimiert und damit ca. 10 x mehr als in der vorliegenden Arbeit mit den Genchips der Firma Affymetrix bestimmt wurden. Der deutliche quantitative Unterschied kann auf mehreren Ursachen beruhen. So war leider der Publikation von Hegde *et al.* (2001) nicht zu entnehmen, wie viele der 1911 deregulierten Transkripte annotierte Gene und wie viele EST repräsentierten. Die sequenzierte Länge eines EST beträgt im Schnitt 300-500 bp, weshalb sich die komplette mRNA eines Gens in der Regel aus mehreren EST-Sequenzen zusammensetzt. Die Genchip-Analyse von über 50000 EST-Sequenzen resultierte in 78 EST-Sequenzen, die als dereguliert mit einem CF von > 2 oder < -2 bestimmt wurden. Diese 78 EST konnten in 37 Konsensussequenzen gruppiert werden, von denen jeweils das EST mit dem höchsten CF-Wert in die Auswertung übernommen wurde. Um beide Mikroarray-Analysen quantitativ miteinander vergleichen zu können, müsste bekannt sein, wie viele der 1911 von Hegde *et al.* (2001) identifizierten Transkripte ein EST waren. Wahrscheinlich wurden in ihrer Analyse alle als dereguliert bestimmten EST-Sequenzen ausgewertet. Die Zahl der identifizierten Transkripte wäre deutlich niedriger gewesen, wären nur die assemblierten Konsensussequenzen in die Auswertung eingegangen. Ein weiterer wichtiger Diskussionspunkt sind die unterschiedlichen Algorithmen, die bei den beiden Genexpressionsanalysen verwendet wurden. Während beide Analysen vergleichbare Kriterien für den „Change Factor“ verwendeten (Hegde *et al.* wählten einen CF von ≥ 2 bzw. ≤ -2) war die Wahl der „Change Factor Quality“ (CFQ) ein quantitativ stark limitierender Faktor für die Genchip-Analyse (siehe Kapitel 2.2.3.1.8.7.2). Eine Herabsenkung der CFQ von > 1 auf $\geq 0,5$ erhöhte beispielsweise die Anzahl der als dereguliert bestimmten Gene um einen Faktor von circa 3-4. Der entscheidende Unterschied beider Analysen ist jedoch in der Auswahl der Mikroarrays zu suchen. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem HG-U95Av2-Array ein kommerziell erhältlicher Oligonukleotid-Mikroarray verwendet, der konzipiert wurde um

ein möglichst breites Spektrum an Geweben und Krankheiten zu analysieren. Der cDNA-Mikroarray von Hegde *et al.* (2001) wurde dahingegen von der Arbeitsgruppe selbst erstellt und enthielt vorselektierte cDNA. Diese cDNA wurden so ausgewählt, dass sie eine große Anzahl an Genen repräsentierten, von denen eine veränderte Expression in Kolonkrebs bekannt war oder von denen bereits eine Korrelation mit dem Prozess der Metastasierung beschrieben worden war. Zieht man diese Aspekte in Betracht, so sind die quantitativen Unterschiede zwischen beiden Analysen erklärbar und die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Anzahl von 182 deregulierten Genen und EST im KM12-Zellmodell kann als ein realistischer Wert angesehen werden.

4.1.1.2 Die Genchip-Analyse von bekannten Genen lieferte verlässliche und reproduzierbare Daten

Die Relevanz der erhaltenen Daten aus der Genchip-Analyse wurde zuerst durch eine *in silico*-Funktionsanalyse der deregulierten Gene überprüft. Hierbei war es insbesondere interessant, ob mit der Genchip-Analyse Gene identifiziert werden konnten, für die eine differentielle Expression in der Progression des kolorektalen Karzinoms bereits in früheren Studien berichtet wurde. Zur Bestätigung der Expression von ausgewählten Kandidatengenen wurde anschließend die „Northernblot“-Analyse angewandt. Im vorigen Kapitel wurde bereits erwähnt, dass mit den Oligonukleotidarrays 145 Gene für bekannte Proteinprodukte als dereguliert bestimmt werden konnten. Im Detail war die Expression von 113 Genen in beiden metastasierenden Zelllinien induziert und von 32 Genen reprimiert. Diese Gene konnten nach der Funktion oder Lokalisierung ihrer Proteinprodukte in 11 Kategorien eingeteilt werden: Immunantwortassoziierte Proteine, Enzyme, Transmembran-Proteine, sezernierte Proteine, Zytoskelett- oder EZM-assoziierte Proteine, Transkription- oder Translationassoziierte Proteine, Signalmoleküle, Zellzyklus- oder Apoptoseassoziierte Proteine, Transportmoleküle und Proteine anderer Funktion.

Die identifizierte Induktion von CEACAM5 (auch bekannt als CEA) in beiden metastasierenden Zelllinien mit einem Faktor von ~ 3 ist ein erstes Indiz für die korrekte technische Versuchsdurchführung und eine geeignete Auswahl der Analyse-Algorithmen. Die Expression des „Carcinoembryonic Antigen“ in humanen Kolonkarzinomen korreliert direkt mit ihrem metastatischen Potential (Wagner *et al.*, 1992; Tibbetts *et al.*, 1993). In einer anderen Studie wurde eine erhöhte Transkription von CEA-mRNA in den KM12SM-Zellen um den Faktor 3-5 im Vergleich zu KM12C erhalten (Kitadai *et al.*, 1996).

Die Reproduzierbarkeit der Genchip-Analyse wurde anhand von 14 induzierten Genen mit der „Northernblot“-Analyse untersucht. Die Gene stammten aus 6 der 11 Kategorien und werden im Folgenden kurz vorgestellt.

FUT4, FUT3 und FUT6 („Fucosyltransferase“ 4, 3 und 6).

In einer Studie wurde gezeigt, dass Lebermetastasen einen signifikant erhöhten Expressionsspiegel der Zelloberflächenproteine sLea („sialyl Lewis A“) und sLex („sialyl Lewis X“) im Vergleich zu den korrespondierenden Primärtumoren in Kolon aufweisen (Yamada *et al.*, 1995). Der letzte Schritt in der Biosynthese der beiden Liganden für Selektin ist abhängig von der $\alpha(1,3)$ -Verknüpfung der sialylierten Vorstufe mit Fukose. Die Verknüpfung erfolgt mit Hilfe der spezifischen $\alpha(1,3)$ -Fukosyltransferasen (Mollicone *et al.*, 1992) von denen bisher 6 humane Varianten (FUT3-7 und FUT9) bekannt sind. Eine starke Expression von FUT4 wurde in Kolon-Adenokarzinom-Zelllinien beobachtet und es wurden erhöhte mRNA-Spiegel von FUT4 in kolorektalen Tumorgewebe im Vergleich zum benachbarten nicht-karzinogenen Gewebe identifiziert (Kudo *et al.*, 1998; Taniguchi *et al.*, 2000). Die in der vorliegenden Arbeit identifizierte Induktion von FUT4 in beiden metastasierenden Zelllinien KM12L4A (CF 2,9) und KM12SM (CF 3,0) unterstreicht die Bedeutung von post-translationalen Modifikationen für die Metastasierung.

Die stabile Transfektion von FUT6-Antisense-Sequenzen in humanen Kolonkarzinom-Zelllinien führte zu einer verringerten Proliferation und damit zu einem erniedrigten Tumorpotential der Zelllinien (Hiller *et al.*, 2000). Weston *et al.* (1999) zeigten ebenfalls mit Antisense-Transfektanten, dass FUT3-gehemmte Kolonkarzinomzellen die von E-Selektin vermittelte Zelladhäsionsfähigkeit verlieren. Die FUT3-reprimierten Zellen waren nach der Injektion in die Milz von Nacktmäusen nicht mehr in der Lage, die Leber zu besiedeln.

FUT3 und FUT6 wurden allerdings nur in der spontan-metastasierenden Zelllinie KM12SM als induziert bestimmt, während in der experimentell-metastasierenden Zelllinie KM12L4A keine Expression der beiden Fukosyltransferasen detektierbar war. Die Tatsache, dass 49 Gene und EST nur in der Zelllinie KM12SM bzw. 125 Gene und EST nur in der Zelllinie KM12L4A als dereguliert bestimmt wurden, kann teilweise mit der unterschiedlichen Generierung der beiden Zellklone erklärt werden. Die KM12SM- und KM12L4A-Zellen wurden beide in einem Nacktmausmodell durch Ausbreitung der nur sehr schwach metastasierenden KM12C-Zellen in die Leber generiert (Morikawa *et al.*, 1988a und 1988b). Die Selektion der KM12L4A-Zellen erfolgte, nachdem sie in der Blutzirkulation überlebten und sich im Leberparenchym ansiedeln konnten (experimentelle Metastasierung). Die erhaltenen KM12SM-Zellen mussten zuerst im orthotopen Milieu des Zäkums proliferieren und die Blutzirkulation erreichen können, bevor sie ebenfalls in das Parenchym der Leber einwandern und proliferieren konnten (spontane Metastasierung). Somit durchliefen die Zellen verschiedene molekulare Ereignisse, die möglicherweise von den abweichenden Genexpressionsprofilen ausgedrückt werden.

S100A13 („S100 Calcium-binding Protein A13“).

Die Mitglieder der S100-Proteinfamilie sind dadurch charakterisiert, dass sie zwei Bindungsmotive zur Kalziumbindung (EF-Hände) besitzen. Es sind 18 Mitglieder der S100-Proteine bekannt, die in der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie der Zellzyklus-Progression und Differenzierung, beteiligt sind. Ridinger *et al.* (2000) identifizierten für S100A13 eine mRNA-Expression in zahlreichen Normalgeweben, darunter auch in Kolon. Für einige S100-Proteine wurde eine veränderte Genexpression in Tumorgeweben berichtet (Lee *et al.*, 1992; Ilg *et al.*, 1996). Allerdings wurde die explizite Expression von S100A13 in Tumorgeweben bisher noch nicht untersucht und konnte somit in dieser Arbeit zum ersten Mal als dereguliert in Kolonkarzinom-Zelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungspotential bestimmt werden.

TMSB4X („Thymosin Beta 4, X-linked“).

Das Proteinprodukt des Thymosin Beta 4-Gens spielt eine wichtige Rolle in der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts, indem es die Bildung von F-Aktin-Mikrofilamenten durch Bindung an das monomere G-Aktin reguliert (Safer und Nachmias, 1994). Weitere Funktionen des Proteins wurden in der Zellproliferation, Migration, Angiogenese und Zelldifferenzierung nachgewiesen (Bonnet *et al.*, 1996; Malinda *et al.*, 1997; Grant *et al.*, 1999). Clark *et al.* (2000) analysierten mit DNA-Mikroarrays die Progression zu einem metastatischen Phänotyp von Melanomzellen und zeigten eine erhöhte Expression von TMSB4X in stark metastasierenden Melanomzellen. Eine murine Melanom-Zelllinie wurde von Cha *et al.* (2003) mit einem Expressionsvektor für Thymosin Beta 4 infiziert. Die intravenöse Injektion der transgenen Zellen in die Maus ergab signifikant mehr metastatische Knötchen in den Lungen als mit Kontrollzellen. Es wurde in dieser Arbeit ein erhöhter Expressionsspiegel für TMSB4X in den metastasierenden Zelllinien KM12L4A und KM12SM bestimmt und mit der „Northernblot“-Analyse bestätigt. Somit konnte zum ersten Mal eine Korrelation zwischen einer induzierten Expression von TMSB4X und dem malignen Potential von Kolonkarzinomzellen postuliert werden. Dieser Befund wurde von Wang *et al.* (2003) bestätigt, die eine Korrelation zwischen der Überexpression von TMSB4X und der malignen Transformation von SW480-Krebszellen des Kolon erkannten.

CA12 („Carbonic Anhydrase XII“).

Die Genfamilie der α -Carboanhydrasen umschließt 11 enzymatisch aktive Mitglieder, die alle die reversible Hydratation von CO_2 zu Hydrogencarbonat (HCO_3^-) katalysieren (Nogradi, 1998). CA12 ist ein transmembranes Isozym, das erstmalig in humanen Nierenkarzinomzellen identifiziert wurde (Tureci *et al.*, 1998). Es wurde von Martinez-Zaguilan *et al.* (1996) beobachtet, dass ein saurer pH-Wert das invasive Verhalten von Tumorzellen *in vitro* erhöhen kann. Ivanov *et al.* stellten daraufhin 1998 die Hypothese auf, dass CA12 das extrazelluläre Milieu unmittelbar benachbart zu den Krebszellen ansäuert und somit eine

Mikroumgebung schafft, die eine Tumordinvasion begünstigt. Eine erhöhte Expression von CA12 korrelierte mit dem malignen Verhalten von kolorektalen Tumoren (Kivela *et al.*, 2000), weshalb CA12 als potentieller Marker für die histopathologische Diagnose von kolorektalen Tumoren vorgeschlagen wurde. Diese Ergebnisse konnten mit der Genchip- und „Northernblot“-Analyse des KM12-Zellmodells bestätigt werden.

NET-7 („New EST Tetraspan-7“).

Die Tetraspane, auch „Transmembrane 4 Super Family“ (TM4SF) genannt, sind integrale Membranproteine, die durch vier hydrophobe Transmembrandomänen charakterisiert sind. Die Superfamilie der Tetraspane besteht aus mindestens 26 Mitgliedern (Berditchevski, 2001). Unter ihnen sind z.B. die Leukozyten-Differenzierungsantigene CD9, CD53, CD63, CD82 und CD151 zu finden. Die Tetraspane werden mit einer Reihe von Prozessen wie Gewebedifferenzierung oder Zellmigration in Verbindung gebracht und werden als negative Regulatoren der Tumourprogression diskutiert (Boismenu *et al.*, 1996; Cajot *et al.*, 1997; Lombardi *et al.*, 1999). cDNA-Datenbankanalysen von EST führten zur Assemblierung und Identifizierung von sieben neuen Mitgliedern (NET-1-7) der Tetraspanfamilie (Serru *et al.*, 2000). RT-PCR-Analysen mit Kolonkarzinom-Zelllinien demonstrierten eine Expression von NET-7 in LoVo- und COLO 205-Zellen (Serru *et al.*, 2000), die in der vorliegenden Arbeit ebenfalls in den KM12C-Zellen gezeigt werden konnte. Die Genchip- als auch die „Northernblot“-Analyse identifizierten zusätzlich eine Erhöhung des NET-7 Transkriptspiegels in den metastasierenden Abkömmlingen KM12SM und KM12L4A.

VIM (Vimentin).

Vimentin ist in Zellen, die vom Mesenchym abstammen die vorherrschende Untereinheit der intermediären Filamente und wird deshalb als spezifischer Marker für mesenchymale Zellen verwendet (Franke *et al.*, 1979; Perreau *et al.*, 1988). Ein Verlust der epithelialen Zellmorphologie und der Erwerb von mesenchymalen Charakteristiken wurden als typisch für Karzinomzellen in einer späten Phase der Tumourprogression beschrieben und korrelierte häufig mit dem metastatischen Potential der Zellen (Birchmeier *et al.*, 1996; Thiery, 2002).

BCMP11 („Breast Cancer Membrane Protein 11“).

Das sezernierte humane BCMP11-Protein wurde erstmalig in Zelllinien des Brustkrebs identifiziert (Adam *et al.*, 2003). Das homologe Protein in Ratten kann mit dem „GPI-anchored Metastasis-associated Protein C4.4A“ interagieren, weshalb für BCMP11 eine Rolle in der Metastasierung von Tumoren postuliert wurde (Rosel *et al.*, 1998). Mit der Genchip- und „Northernblot“-Analyse konnte erstmalig eine erhöhte Expression von BCMP11 in metastasierenden Kolonkarzinom-Zelllinien im Vergleich zu einer nicht-metastasierenden Primärtumor-Zelllinie gezeigt werden.

TACSTD2, Trop-2 („Tumor-associated Calcium Signal Transducer 2“).

Aufgrund der intensiven, weiterführenden Analysen mit Trop-2 in der vorliegenden Arbeit wird Trop-2 im nächsten Kapitel (4.1.1.3) ausführlicher charakterisiert.

HSPG2 („Heparan Sulfate Proteoglycan 2“, Perlecan).

Heparansulfat-Proteoglykan ist eine Hauptkomponente von Basalmembranen und besitzt eine Schlüsselfunktion in der Tumorentwicklung, weil es die Struktur der Basalmembran von Zellen und der extrazellulären Matrix beeinflussen kann (Iozzo, 1998). HSPG2 wird ubiquitär exprimiert und spielt eine Rolle in der Angiogenese durch Bindung an FGF2 (Vigny *et al.*, 1988). Erhöhte Expressionsspiegel an HSPG2 korrelierten mit einem aggressiveren Phänotyp von Brustkarzinomen und Melanomen (Timar *et al.*, 1992; Iozzo und Cohen, 1994). Eine stabil exprimierte Antisense-cDNA in Kolonkarzinomzellen verringerte die Zellproliferation signifikant und führte zur Ausbildung von deutlich weniger Blutgefäßen in neugebildeten Tumoren in der Nacktmaus (Sharma *et al.*, 1998). Eine induzierte Expression von HSPG2 in der Genchip- und „Northernblot“-Analyse bestätigte die Assoziation von HSPG2 mit einem aggressiveren Phänotyp in Kolonkarzinomen.

RGS2 („Regulator of G-protein Signalling 2“).

RGS2 gehört zur Familie der Regulatoren der G-Protein-Signalkaskade. Diese steuern die Signale des G-Protein-gekoppelten Rezeptors, wobei die RGS-Proteine die inaktivierende GTPase-Reaktion von α -Untereinheiten der G-Proteine unterstützen (de Vries *et al.*, 2000). Die Expression von RGS2 wird entweder durch neuronale Aktivität oder durch Rezeptor-gekoppelte Systeme mit einem zweiten Botenstoff reguliert (Ingi *et al.*, 1998; Salim *et al.*, 2003). Eine Literatursuche nach Expressionsstudien für RGS2 in Kolongewebe führte zu keinem Resultat. Die Genchip- und „Northernblot“-Analysen identifizierten eine sehr schwache Expression von RGS2 in der nicht-metastasierenden Zelllinie, aber eine deutlich erhöhte RGS2-Expression in den metastasierenden Kolonkarzinom-Zelllinien.

MUC3B („Mucin 3B“).

Kyo *et al.* erkannten im Jahr 2001, dass das ursprünglich distinkte Gen MUC3 in zwei nahe miteinander verwandte Gene unterschieden werden muss, MUC3A und MUC3B. Die Mucine bestehen aus zwei strukturell und funktionell voneinander verschiedenen Klassen. Eine Klasse besteht aus den sezernierten, gelbildenden Mucinen wie beispielsweise MUC2 und MUC6, die für epitheliale Gewebe durch Ausbildung einer viskoelastischen Gelschicht eine Schutzfunktion haben. Beide MUC3-Gene kodieren für transmembrane Glykoproteine und gehören somit wie MUC1 zur Klasse der transmembranen Mucine. Für Mucin 1 wurde eine positive Korrelation zwischen dem Metastasierungspotential von kolorektalen Karzinomen und einer erhöhten Proteinexpression berichtet (Nakamori *et al.*, 1994; Matsuda *et al.*, 2000). Normale Kolongewebe exprimierten nur

sehr schwach Mucin 3, aber beide Gene sind deutlich in humanen Kolon-Adenokarzinomzellen exprimiert (Williams *et al.*, 1999; Pratt *et al.*, 2000). Die Genchip- und „Northernblot“-Analysen erweiterten das Expressionsbild für MUC3B, denn sie zeigten eine ebenfalls induzierte Expression in den metastasierenden Zelllinien im Vergleich zur Primärtumor-Zelllinie.

MDK (Midkine, „Neurite Growth-promoting Factor 2“).

Midkine ist ein sezernierter Wachstumsfaktor der an Heparin bindet. Ein erhöhter Expressionsspiegel wurde in verschiedenen malignen Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe identifiziert (Tsutsui *et al.*, 1993; Aridome *et al.*, 1995). Eine andere Studie zeigte, dass die Überexpression von Midkine zu einer erhöhten Gefäßdichte und zu einem verstärkten Tumorwachstum in Brustkarzinomzellen führte (Choudhuri *et al.*, 1997). Lediglich für Midkine konnte die Genchip-Analyse nicht vollständig mit der „Northernblot“-Analyse bestätigt werden. Eine erhöhte Anzahl an Midkine-Transkripten war nur in der Zelllinie KM12L4A und nicht in KM12SM detektierbar.

Zusammenfassend konnte die differentielle Expression von 13 der 14 ausgewählten Gene mit einer zusätzlichen „Northernblot“-Analyse bestätigt werden (FUT4, FUT3, FUT6, S100A13, TMSB4X, CA12, NET-7, VIM, BCMP11, TACSTD2, HSPG2, RGS2 und MUC3B). Zusätzlich zu CEA wurden einige der bestätigten Gene bereits zuvor mit der kolorektalen Metastasierung in Verbindung gebracht (TMSB4X, CA12, HSPG2). Somit konnte belegt werden, dass das KM12-Zellmodell in Kombination mit den verwendeten Oligonukleotid-Mikroarrays geeignet ist, Gene zu identifizieren, die potentiell mit der Metastasierung von Kolonkarzinomen assoziiert sind. Von einigen Genen wurde bereits eine erhöhte Expression in kolorektalen Primärtumoren im Vergleich zu Normalgeweben berichtet (FUT4, TACSTD2, MUC3B). Mit dem KM12-Zellmodell konnten somit erste Anhaltspunkte gewonnen werden, dass eine fortschreitende Progression des Kolonkarzinoms mit einer weiter erhöhten Expression dieser Gene korrelierte. Die Gene S100A13, NET-7, BCMP11 und RGS2 wurden für die Bestätigung mit der „Northernblot“-Analyse ausgewählt, da von ihnen bisher keine Expressionsstudien in benignen oder malignen Kolontumoren publiziert wurden. Für diese Gene konnte zum ersten Mal ein Bezug zwischen ihrer Expression und dem metastasierenden Potential von Kolonkarzinomzellen hergestellt werden.

4.1.1.3 Der Tumorassoziierte Vermittler von Kalziumsignalen - Trop-2

Das Proteinprodukt des humanen *TROP2-* (*GA733-1-*) Gens ist das 323 Aminosäuren lange Trop-2-Molekül (TACSTD2, M1S1). Trop-2 ist ein monomeres und Typ-I-transmembranes Zelloberflächen-Glykoprotein, das zuerst in der Plazenta identifiziert wurde (Lipinski *et al.*, 1981). In Trophoblastenzellen wird das Trop-2-Protein zusammen mit dem Protein Trop-1 exprimiert. Trop-1 ist auch unter der Bezeichnung Ep-CAM bekannt und wird von dem *TROP1-* (*GA733-2-*) Gen auf Chromosom 4 kodiert. Die Trop-Proteine sind zu 48% homolog und es wird angenommen, dass das intronlose *TROP2-* Gen aus einer Retropositionierung von Trop-1-mRNA in das Chromosom 1 entstanden ist (Linnenbach *et al.*, 1993).

Das Rückgrat des Trop-2-Proteins besitzt vier potentielle N-Glykosylierungsstellen, die zum Molekulargewicht von 50 kD des Glykoproteins beitragen (Alberti *et al.*, 1992). Die Inhibierung der Glykosylierung an Asparagin durch Tunicamycin resultierte in einer 30 kD großen Isoform von Trop-2 (Schon und Orfanos, 1995). Expressionsstudien mit Trop-2 zeigen eine fehlende oder nur schwache Expression in den meisten der untersuchten Normalgeweben (mit Ausnahme von vielschichtigen Epithelien), aber eine deutliche Expression in zahlreichen humanen epithelialen Tumoren (Alberti, 2001).

Nach der Abspaltung eines N-terminalen Signalpeptids aus 25 Aminosäuren (in Abbildung 4.1 schematisch angedeutet) enthält das Trop-2-Protein eine 250 Aminosäuren lange extrazelluläre Domäne. Dieser extrazelluläre Abschnitt des Trop-2-Moleküls besitzt am N-Terminus eine 111 Aminosäuren umfassende Domäne mit zwölf Cysteinen, die in zwei Unterregionen gegliedert ist: eine EGF-ähnliche Domäne und eine Thyroglobulin-Wiederholungssequenz. Viele transmembrane Proteine mit diesem Modul sind an der Zelladhäsion beteiligt oder in die Wachstumskontrolle involviert, wie beispielsweise die Zelladhäsionsmoleküle (CAM) und Integrine (Davis, 1990; Fornaro *et al.*, 1995). Die integrale Membrandomäne von Trop-2 enthält 22 hydrophobe Aminosäuren und ist stark homolog zur Transmembrandomäne von Ep-CAM. Die relativ kurze, 26 Aminosäuren umfassende zytoplasmatische Domäne von Trop-2 kann durch Proteinkinase C an der Aminosäure Serin 303 phosphoryliert werden und enthält eine spezifische Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat- (PIP_2 -) Bindungssequenz (HIKE, Basu *et al.*, 1995). Die Identifizierung einer HIKE-Sequenz im Trop-2-Molekül deutet auf eine mögliche PIP_2 -regulierte Signalfunktion für Trop-2 (El Sewedy *et al.*, 1998; Ciccarelli *et al.*, 2000). Das HIKE-Modul ist der PIP_2 -Bindungsstelle von Gelsolin und „G protein-coupled receptor kinase 4“ (GRK4) sehr ähnlich und ermöglicht entweder die Verankerung des Proteins an die Plasmamembran oder die Bindung an zytoplasmatische Moleküle (Yu *et al.*, 1992; Pitcher *et al.*, 1996). Deshalb wurde für Trop-2 eine Rolle als Signalvermittler vorgeschlagen, obwohl bisher noch keine Liganden für Trop-2 identifiziert werden konnten.

Diese Hypothese wird von dem Befund gestützt, dass die Stimulierung von Karzinomzellen mit Trop-2-spezifischen Antikörpern zu einem intrazellulären Kalziumsignal als Folge der Bindung führte (Ripani *et al.*, 1998).

Interessanterweise wurde Trop-2 als das verantwortliche Gen für die autosomale, rezessive Störung GDLN („gelatinous drop-like corneal dystrophy“) identifiziert. „Nonsense“- oder Leseraster-Mutationen in der Sequenz von Trop-2 führen zu einem verkürzten Protein und somit zum Verlust der PIP₂-Bindungssequenz (Tsujiyama *et al.*, 1999). Aufgrund dieser nachteiligen Mutationen kommt es zu Ablagerungen von amyloiden Glykoprotein-komplexen in der Hornhaut des Auges.

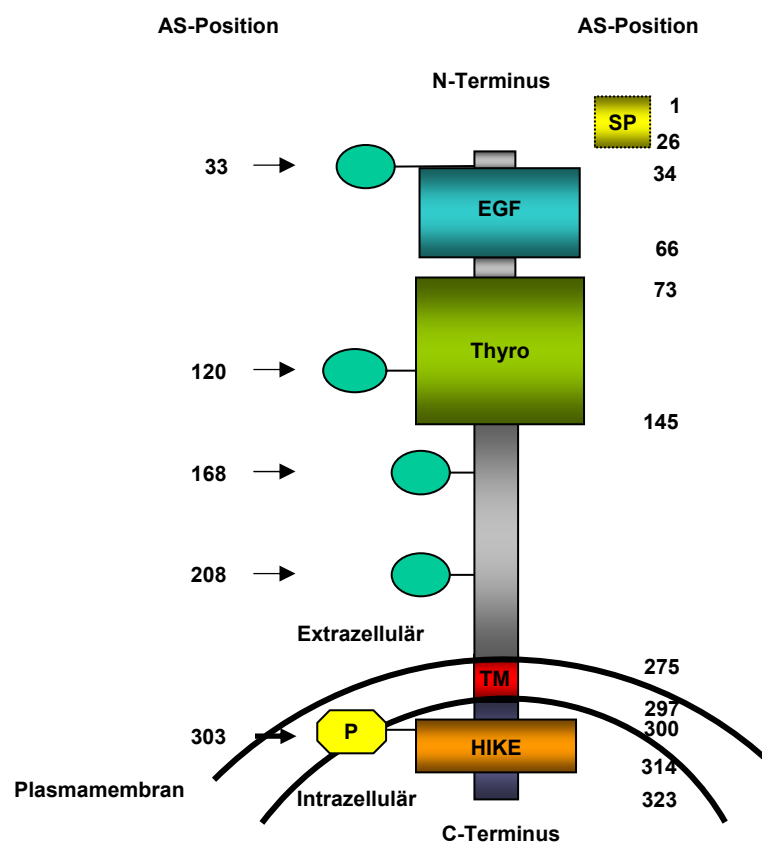


Abbildung 4.1: Schematischer Aufbau von Trop-2.

Das Trop-2-Protein wird aus 323 Aminosäuren gebildet. Die Zahlen geben die Aminosäure-Positionen an. Die grünen Kreise zeigen die Positionen der vier möglichen N-Glykosylierungsstellen, das Oktogon deutet auf die Proteinkinase C-Phosphorylierungsstelle und die Rechtecke repräsentieren einzelne Domänen.

SP = Signalpeptid, EGF = „Epidermal Growth Factor-like“-Wiederholungssequenz, Thyro = Thyroglobulin-Wiederholungssequenz, TM = Transmembrandomäne.

4.1.1.4 Die Genchip-Analyse eignete sich zur Identifizierung von differentiell exprimierten EST im KM12-Zellmodell

Mit Hilfe der Technologie basierend auf dem GeneChip[®] System ist es möglich, differentiell exprimierte EST zu identifizieren und ausgehend von der korrespondierenden mRNA die volle Länge der humanen cDNA zu klonieren (de Wit *et al.*, 2002; Evtimova *et al.*, 2004; Tarbe *et al.*, 2004). Beispielsweise konnten Evtimova *et al.* (2004) auf diese Weise erstmalig CRASH (bzw. ALP: „asparaginase-like protein“) identifizieren, das in etablierten Zelllinien von Knochenmetastasen im Vergleich zu Brust-Primärtumor-Zelllinien als induziert bestimmt wurde. Die Genchip-Analyse mit den HG-U95B-E-Arrays resultierte in der Identifizierung von 78 differentiell exprimierten EST, die in 37 verschiedene Konsensussequenzen gruppiert werden konnten. Im Schnitt wurde somit jede Konsensussequenz von 2-3 EST repräsentiert, von denen jeweils das EST mit dem höchsten CF-Wert in die Auswertung übernommen wurde. In der Regel konnten keine dramatischen Differenzen zwischen den einzelnen CF-Werten der EST einer Konsensussequenz beobachtet werden. Kleinere Unterschiede im CF lassen sich durch die unterschiedliche Position der EST innerhalb einer Konsensussequenz erklären. Eine für die Genchip-Hybridisierung verwendete cRNA wurde ausgehend vom 3'-Ende durch die T7 RNA-Polymerase synthetisiert. Deshalb wurde die Signalintensität eines EST, das in der Konsensussequenz näher am 5'-Ende lag, von der Effizienz der reversen Transkription beeinflusst. Aus diesem Grund war eine sorgfältige Bestimmung der cRNA-Qualität (siehe Kapitel 2.2.3.1.8.3) anhand des 3'-/5'-Verhältnisses von β -Aktin und der Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase eine wichtige Voraussetzung für die Verlässlichkeit der mit der Genchip-Analyse erhaltenen Daten.

Von den 37 deregulierten Konsensussequenzen (in der Arbeit zumeist verkürzt als EST bezeichnet) wurden 24 in den metastasierenden Zelllinien als induziert und 13 als reprimiert bestimmt. Evtimova *et al.* (2004) analysierten die mRNA-Expression von CRASH mittels RT-PCR im KM12-Zellmodell und identifizierten erhöhte Expressionsspiegel in den metastasierenden Zelllinien KM12SM und KM12L4A, mit der stärksten Expression in KM12L4A. Diese Korrelation konnte in der vorliegenden Arbeit mit der Genchip-Analyse bestätigt werden⁴ und war ein Indiz für eine korrekte Auswertung der EST-Genchips. 13 der 24 induzierten und 1 der 13 reprimierten EST wurden für eine anschließende „Northernblot“-Analyse ausgewählt. Mit dieser konnten 8 induzierte EST und das reprimierte EST bestätigt und zusätzlich wertvolle Informationen über die Länge der

⁴ Der CF-Wert für ein zu CRASH korrespondierendes EST AI928342 betrug für KM12L4A den Wert 3,1 und für KM12SM den Wert 1,9. Aufgrund des CF von < 2,1 für KM12SM wurde das EST in Tabelle 3.1 nicht aufgenommen.

korrespondierenden mRNA erhalten werden. Mit DNA-Sonden für fünf EST-Sequenzen wurden entweder keine Hybridisierungssignale erhalten, oder es konnte die Deregulierung nicht bestätigt werden. Diese relativ hohe Fehlerrate von 36% kann im folgenden aufgeführte Ursachen haben. Im Gegensatz zu den annotierten Genen sind die EST-Clustersequenzen in der UniGene-Datenbank als Folge von „fehlerhaften, unsauberer Sequenzierungen“ nicht immer zu 100% korrekt. Als Folge der Sequenzfehler ist die Möglichkeit erhöht, „falsch-positive“ Signale in der Genchip-Analyse zu erhalten. Außerdem könnte sich das prinzipielle Problem der Bestimmung von Kreuzhybridisierungen ähnlicher oder homologer Sequenzen bei der fehlerhaften Analyse ausgewirkt haben (Ishii *et al.*, 2000).

Von vier der acht bestätigten, induzierten EST wurde inzwischen die komplette cDNA kloniert und die Translation eines funktionellen Proteins nachgewiesen. Dass die Identifizierung und erste Charakterisierung der vier Proteinprodukte durch andere Arbeitsgruppen erst in den letzten drei bis vier Jahren erfolgte, beweist eindrucksvoll das Potential, das in der Genchip-Analyse von EST mit dem KM12-Zellmodell steckt. Zwei der vier neu identifizierten Gene gehören zu der Gruppe der Kinasen (MPP5, PRKWNK2) und könnten potentielle therapeutische Angriffspunkte sein.

Zu fünf der neun bestätigten EST konnten bis heute keine funktionellen Proteinprodukte zugewiesen werden. Die Expressionsanalyse mit einem mRNA-Gewebearray (MTE-Array) von Normalgeweben ergab erste interessante Einblicke über die Expression der EST in unterschiedlichen Geweben. Hierbei wurden sehr unterschiedliche Expressionsmuster für die einzelnen EST erhalten. Diese reichten von einer nur sehr geringen Expression in wenigen Geweben (EST AI344053) bis zu einer starken, ubiquitären Expression (EST AI739241 und AA309047). Eine auf kolorektales Gewebe begrenzte Expression wurde bei keinem der analysierten EST beobachtet. Zur Identifizierung eines EST, das in der kolorektalen Metastasierung involviert ist, hätte anschließend die Expression der Kandidaten-EST in einer Vielzahl von Metastasen- und Primärtumorgeweben analysiert werden müssen. Das Resultat der Hybridisierung eines „Cancer Gene Screening“-Arrays mit einer spezifischen Sonde für das EST AI739241 demonstrierte die Notwendigkeit der Analysenerweiterung auf Tumorgewebe. Das ubiquitäre Expressionsprofil von EST AI739241 in den repräsentierten Normalgeweben des MTE-Arrays ließ kein Selektionskriterium erkennen. Die induzierte Expression des EST in allen vier repräsentierten kolorektalen Primärtumoren auf dem „Cancer Gene Screening“-Array stellte allerdings einen ersten interessanten Ansatzpunkt für eine weiterführende Analyse dar. Zu diesem Zeitpunkt der Arbeit standen uns aber noch keine entsprechenden Gewebe oder isolierte RNA zur Verfügung.

4.1.2 Das HCT116-Zellmodell

Um die Studie über die molekulare Natur von Metastasen des kolorektalen Karzinoms zu vertiefen und um sicherzustellen, dass die differentielle Expression der identifizierten Gene nicht auf ein einzelnes Zelllinienmodell beschränkt ist, wurde zusätzlich das Expressionsprofil eines zweiten Zellmodells für Kolonkarzinome analysiert – das HCT116-Zellmodell. Die sehr schwach metastasierende Zelllinie HCT116 wurde von einem humanen Kolon-Primärtumor etabliert (Brattain *et al.*, 1981). Dahingegen repräsentiert der Zellklon HCT116U5.5 eine zur Lunge hochmetastatische Variante von HCT116, die in Nacktmäusen generiert wurde (bisher nicht publizierte Daten der Firma Roche).

4.1.2.1 Im HCT116-Zellmodell wurden 72 Gene und EST als dereguliert bestimmt

Die Genchip-Analyse mit dem HCT116-Zellmodell führte zur Identifizierung von insgesamt 72 deregulierten Genen. Hiervon waren 43 Gene in den isogenen, metastasierenden HCT116U5.5-Zellen um einen CF von > 2 induziert und 29 Gene waren um einen CF von < -2 reprimiert. Diese Gene wurden mit Hilfe der UniGene-Datenbank *in silico* klassifiziert. Die Analyse wurde auf den HG-U95Av2-Array beschränkt, der fast ausschließlich bereits charakterisierte Gene repräsentiert. Somit wurden unter den 72 deregulierten Genen lediglich 4 EST-Konsensussequenzen als differentiel exprimiert bestimmt. Eine ausführlichere Detailanalyse und Bestätigung der differentiel exprimierten Gene im HCT116-Zellmodell, wie sie für das KM12-Zellmodell durchgeführt wurde, war nicht das Ziel der Arbeit. Vielmehr wurde das mit den HCT116-Zellen erhaltene Genexpressionsprofil direkt mit dem Expressionsprofil des KM12-Zellmodells verglichen.

4.1.3 Die Schnittmengen-Analyse der KM12- und HCT116-Genexpressionsprofile führte zur Identifizierung von differentiel exprimiertem Trop-2 und Vimentin

Die Genchip-Analyse resultierte in der Erstellung zweier Genlisten, die alle differentiel exprimierten Gene im KM12-Zellmodell oder im HCT116-Zellmodell aufführten. Mit Ausnahme der verwendeten Zellen wurden sämtliche Arbeitsschritte zwar separat aber identisch durchgeführt und die resultierenden Genlisten wurden durch Verwendung der gleichen Analyse-Algorithmen erhalten. Vergleich man die beiden Expressionsprofile miteinander, so erhielt man zwei Gene, deren Expression in allen stark metastasierenden Zelllinien (KM12SM, KM12L4A und HCT116U5.5) im Vergleich zu den nicht-metastasierenden Kolon-Zelllinien (KM12C und HCT116) deutlich erhöht war. Diese zwei induzierten Gene kodieren für Trop-2 und Vimentin. Gene, die in allen metastasierenden Zelllinien reprimiert vorlagen wurden nicht identifiziert. Trotz der sehr stringenten Analyse-kriterien war es überraschend, dass von den 12652 untersuchten Genen nur zwei Gene

differentiell exprimiert waren, wenn die zellulären Phänotypen von nicht-metastasierenden und stark metastasierenden Kolonkarzinomzellen zur Leber oder Lunge *in vitro* miteinander verglichen wurden.

In diesem Zusammenhang lohnt sich ein weiterer Vergleich zu der bereits vorher diskutierten Arbeit von Hegde *et al.* (2001, siehe Kapitel 4.1.1.1). Sie verfolgten nach der Genexpressionsanalyse mit dem KM12-Zellmodell eine ähnliche Strategie und verglichen die Ergebnisse ebenfalls zusätzlich mit dem Expressionsprofil eines anderen Zellmodells für Kolonkarzinome. Das zweite Zellmodell bestand aus der sehr schwach metastasierenden Zelllinie SW480, die aus einem humanen Kolonkarzinom generiert wurde und der stark metastasierenden Zelllinie SW620, die aus einer Lymphknotenmetastase des gleichen Primärtumors erhalten wurde (Hewitt *et al.*, 2000). Mit ihrem laboreigenen cDNA-Mikroarray identifizierte die Arbeitsgruppe um J. Quackenbush 176 Gene, die in allen drei metastasierenden Zelllinien (KM12SM, KM12L4A und SW620) vergleichbar dereguliert waren. Leider wurde von Ihnen nicht die komplette Genliste veröffentlicht, deshalb war es nicht ersichtlich, ob sich unter den deregulierten Genen auch *TROP2* und Vimentin befanden. Die beträchtlichen, quantitativen Unterschiede (176/2 Gene) sind zum einen darauf zurückzuführen, dass in dem Vergleich zwischen dem KM12- und HCT116-Zellmodell die EST nicht berücksichtigt werden konnten (mit der erstellten cRNA des HCT116-Zellmodells wurden keine HG-U95B-E Chips hybridisiert). Ferner spielt zusätzlich zu den bereits in Kapitel 4.1.1.1 diskutierten Unterschieden in der Durchführung beider Versuchsansätze (Analyse-Algorithmen, Mikroarrays), die Verwendung von unterschiedlichen Zellmodellen für die Schnittmengenanalyse eine beträchtliche Rolle. Die KM12SM- und KM12L4A-Zellen des KM12-Zellmodells wurden bezüglich ihrer Fähigkeiten selektiert, experimentelle oder spontane metastatische Zellknoten in der Leber auszubilden. Sie repräsentieren in Kombination mit den KM12C-Primärtumorzellen ein häufig verwendetes und bereits gut charakterisiertes Zellmodell für die *in vitro*-Analyse der kolorektalen Metastasierung in die Leber (Morikawa *et al.*, 1988a und 1988b). Im Gegensatz dazu ist nur sehr wenig über die metastatische Variante HCT116U5.5 bekannt, die aus der HCT116-Zelllinie hervorgegangen ist. Bisher konnte nur gezeigt werden, dass die HCT116U5.5-Zellen nach einer heterotopen Injektion in den Fußballen von Nacktmäusen stark in die Lunge metastasieren. Im Gegensatz dazu produzierten die HCT116-Zellen nach der Injektion in den Fußballen keine Lungenmetastasen (unpublizierte Daten). Als Folge der „Saat und Boden“-Theorie von Stephen Paget (1889; republiziert und kommentiert von Poste und Paruch, 1989) begann eine heftige Diskussion über den Einfluss von Interaktionen zwischen den metastasierenden Tumorzellen und den befallenen Organen. Sugarbaker folgerte schließlich 1981, dass diese Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung von organspezifischen Metastasen spielen. Während die

regionale Metastasierung noch als eine Folge von anatomischen oder mechanischen Faktoren angesehen werden kann, ist eine Absiedlung von metastatischen Zellen in entfernt liegende Organe an bestimmte wirtsorganspezifische Muster gebunden (Radinsky und Ellis, 1996). Die beiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellmodelle KM12 und HCT116 unterscheiden sich im wesentlichen darin, dass die Metastasierung in zwei unterschiedlichen Organen erfolgt. Somit könnte die stark begrenzte Anzahl an Genen, die in beiden Zellmodellen als differentiell exprimiert bestimmt wurden, als eine Folge der unterschiedlichen Mikroumgebungen angesehen werden die von der Leber oder der Lunge ausgebildet werden. Vermutlich ist die erhöhte Expression von Trop-2 und Vimentin nicht von dem spezifischen Milieu der befallenen Organe abhängig. Deshalb könnte ihre Expression eine Grundvoraussetzung sein, die metastasierende Zellen entwickeln müssen, um lebensfähige Kolonien in Leber oder Lunge ausbilden zu können. Weiterführende Analysen wurden deshalb auf Trop-2 und Vimentin als interessante Kandidaten für den Prozess der kolorektalen Metastasierung beschränkt, nachdem erhöhte mRNA-Spiegel in den metastasierenden Zellen mit einer „Northernblot“-Analyse bestätigt werden konnte.

4.2 Expression von Trop-2 in kolorektalen Krebsgeweben

4.2.1 Trop-2-mRNA-Spiegel sind in Lebermetastasen erhöht

Aus den in Kapitel 4.1.1 erwähnten Gründen wurde die Expressionsanalyse für Trop-2 und Vimentin ausgehend von den Zelllinien auf Gewebe erweitert und zuerst in mikro-sezierten Normalgeweben, Primärtumorgeweben und Lebermetastasen analysiert. Dabei konnte in Übereinstimmung mit dem Befund in den Zelllinien ein deutlich erhöhter durchschnittlicher Trop-2-mRNA-Spiegel in den metastatischen Läsionen beobachtet werden. Außerdem konnte eine bereits von Alberti (2001) berichtete Induktion von Trop-2 in Primärtumoren im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe bestätigt werden. Typische Merkmale für Karzinomzellen in der späten Phase der Tumorprogression sind der Verlust der epithelialen Zellmorphologie und die Akquisition von mesenchymalen Charakteristika (Birchmeier *et al.*, 1996; Thiery, 2002). Im Vergleich zur deutlichen Induktion von Vimentin in den metastasierenden Zelllinien wurde in den Lebermetastasen nur eine geringe Expressionserhöhung für Vimentin im Vergleich zu den Primärtumorgeweben beobachtet. Der induzierten Expression von Vimentin in den metastasierenden Läsionen ging allerdings eine deutlich stärkere Repression der Vimentinexpression von Normalgeweben zu den korrespondierenden Primärtumoren voraus. Interessanterweise ist die Koexpression von Vimentin mit Zytokeratin ein häufig beobachteter Effekt in epithelialen Zellen, die *in vitro* kultiviert werden (Franke *et al.*, 1981; Hunt und Davis, 1990).

Virtanen *et al.* (1981) schlugen deshalb vor, dass eine erhöhte Vimentinexpression in epithelialen Zellen primär mit der Adaption der Zellen an die Kulturbedingungen zusammenhängt. Diese Hypothese wird dadurch bekräftigt, dass Vimentin als ein wachstumsreguliertes Gen identifiziert wurde (Hirschhorn *et al.*, 1984). Aufgrund der Inkonsistenz in der Vimentinexpression wurde Vimentin als Kandidatengen nicht weiter verfolgt und die Arbeit konzentrierte sich nachfolgend ausschließlich auf das Genprodukt von *TROP2*.

Semiquantitative RT-PCR-Analysen bestätigten die Ergebnisse der Genchip-Analysen und verdeutlichten erhöhte Trop-2-mRNA-Spiegel in sieben der neun analysierten Lebermetastasen. Allerdings wurden die miteinander verglichenen Metastasen und Primärtumore jeweils verschiedenen Patienten entnommen. Frühere Studien zeigten, dass die Expressionsmuster vieler Gene in unterschiedlichen Individuen deutlich voneinander abweichen können, und somit führten direkte Vergleiche einiger Gene in Geweben von unterschiedlichen Patienten zu falschen Rückschlüssen (Perou *et al.*, 2000). Um dies auszuschließen, wurde die mRNA-Expressionsanalyse für Trop-2 auf drei Paare von Kolon-Primärtumoren und den jeweils daraus resultierenden Lebermetastasen ausgeweitet. Eine semiquantitative RT-PCR-Analyse bestätigte auch in diesen Geweben eine erhöhte Anzahl an Transkripten von Trop-2 in den Lebermetastasen.

4.2.2 Trop-2-Proteinspiegel sind in metastasierenden Zelllinien und in Biopsien von Lebermetastasen erhöht

Mehrere erst kürzlich veröffentlichte Arbeiten befassten sich intensiv mit der vergleichenden Analyse von Protein- und mRNA-Expressionsspiegeln in Geweben (Chen *et al.*, 2002; Griffin *et al.*, 2002; Pratt *et al.*, 2002). Chen *et al.* (2002) verglichen die Höhe der mRNA-Expression von 98 verschiedenen Genen in Adenokarzinomen der Lunge und in den korrespondierenden Normalgeweben mit der entsprechenden Proteinmenge in den Geweben. Überraschenderweise fand die Arbeitsgruppe nur mit 21 der 98 (21,4%) untersuchten Gene eine signifikante Korrelation zwischen der mRNA- und der Proteinexpression. Als Konsequenz wurde die Trop-2-Expressionsanalyse der Zelllinien und Tumorbiopsien auf die Proteinebene erweitert. Dabei wurde für Trop-2 eine starke Korrelation zwischen der mRNA- und Proteinexpression erhalten. Durch Verwendung von Immunblots konnte die Proteinexpression von Trop-2 in allen drei metastasierenden Zelllinien KM12SM, KM12L4A und HCT116U5.5 nachgewiesen werden, während kein Trop-2-Protein in den nicht-metastasierenden Zelllinien KM12C und HCT116 detektiert wurde. Im Vergleich zur „Northernblot“-Analyse war allerdings die Höhe der Trop-2-Proteinspiegel in den metastasierenden Zelllinien niedriger als die mRNA-Spiegel erwarten ließen. Diese Beobachtung wurde durch nachfolgende FACS- und Immun-

fluoreszenzanalysen bestätigt. Mit der Immunfluoreszenzfärbung konnte die Proteinexpression von Trop-2 in den KM12SM- und KM12L4A-Zellpopulationen als sehr heterogen bestimmt werden. In diesen beiden Zelllinien zeigten nur vereinzelte Zellen ein sehr starkes membranständiges Färbungssignal für Trop-2 innerhalb einer sonst ungefärbten Zellpopulation. Im Gegensatz zu den metastasierenden Varianten der KM12-Zellen demonstrierten die HCT116U5.5-Zellen eine starke und homogene Expression von Trop-2 in den Membranen sämtlicher Zellen. Die immunhistochemische Untersuchung von Gewebebereichen aus Primärtumoren führte ebenfalls zu einer heterogenen Trop-2-Anfärbung von epithelialen Zellmembranen. Im Schnitt waren in den Kolon-Primärtumoren 5-10% der Zellen immunpositiv für Trop-2. Diese waren in kleine Bereiche abgegrenzt und zeigten eine spezifische Membranfärbung. In den metastatischen Läsionen aus der Leber oder den Lymphknoten wurden dahingegen homogene, hohe Expressionsspiegel des Trop-2-Proteins detektiert. Die Färbung war ausschließlich auf die Membranen der Epithelzellen des einwandernden Tumors beschränkt. Zusätzlich zu dem hohen Basalspiegel der Trop-2-Proteinexpression zeigten einige Bereiche eine auffällig stärkere Membranfärbung, während andererseits die nicht-neoplastischen Krypten von Kolon-Normalgeweben keine oder nur eine minimale Immunfärbung für Trop-2 aufwiesen.

4.3 Expression von Trop-2 und Trop-1 in Normal- und Tumorgeweben

Im Verlauf dieser Arbeit fokussierten sich die Expressions- und funktionellen Studien auf Trop-2, einem von zwei Trop-Zelloberflächen-Glykoproteinen. Bei dem zweiten bisher identifizierten Mitglied der Trop-Moleküle handelt es sich um Ep-CAM bzw. Trop-1 (Gottlinger *et al.*, 1986). Während das Ep-CAM Protein schon ausführlich charakterisiert wurde und bereits ein zu Ep-CAM spezifischer Antikörper (Edrecolomab) als therapeutisches Agens gegen kolorektalen Krebs im Dukes' C-Stadium verwendet wurde, ist bisher nur sehr wenig über Trop-2 bekannt (Riethmuller *et al.*, 1994; Balzar *et al.*, 1999; Schwartzberg, 2001). Ep-CAM wird in den Zelllinien sowie in kolorektalen Normal- und Krebsgeweben (Primärtumoren und Metastasen) gleich stark exprimiert und unterscheidet sich somit von dem deregulierten Expressionsmuster von Trop-2. Vergleich man das Expressionsmuster von Trop-2 und Ep-CAM in einer Vielzahl von Normalgeweben mit einem mRNA-Array (MTE-Array) so war zu erkennen, dass Gewebe, die hohe mRNA-Spiegel an Trop-2 besaßen, wie beispielsweise der Ösophagus, die Trachea und Prostata, Ep-CAM nur schwach exprimieren. Der anschließend verwendete humane „Cancer Profiling“-Array enthielt cDNA von korrespondierenden kolorektalen Normal- und Tumorgeweben. Nach der Hybridisierung mit einer Trop-2-spezifischen cDNA wurden fast keine Hybridisierungssignale in den Kolon-Normalgeweben detektiert, aber es konnten mit den meisten der Kolon-Primärtumorgeweben Trop-2-positive Signale von schwacher

Intensität erhalten werden. Dies stand in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Genchip- und RT-PCR-Analysen. Interessanterweise konnte mit dem Array ebenfalls in drei von vier cDNA aus Metastasen von Kolon eine erhöhte Trop-2-Expression im Vergleich zum korrespondierenden Primärtumor- und Normalgewebe identifiziert werden. Zusammenfassend wurde somit zum ersten Mal gezeigt, dass neben einer Erhöhung der Trop-2-Expression von Normal- zu Primärtumorgeweben des Kolons, die weitaus drastischere Erhöhung der Expression von Trop-2 erst im nächsten Schritt der Tumorphprogression hin zu einer metastatischen Läsion des Kolons erfolgt.

4.3.1 Die Expression von Trop-2 ist in Lungen- und Schilddrüsenkarzinomen erhöht

Mit dem „Cancer Profiling“-Array konnten zusätzlich erhöhte Transkriptspiegel von Trop-2 in Lungen- und Schilddrüsenkarzinomen im Vergleich zu den korrespondierenden Normalgeweben nachgewiesen werden. Die Induktion von Trop-2 in Plattenepithelkarzinomen der Lunge und in Schilddrüsenkarzinomen konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal identifiziert werden. Eine differentielle Trop-2-Expression konnte bisher nur in Adenokarzinomen der Lunge gezeigt werden und wurde nicht in einem erweiterten Kontext von nicht-kleinzelligen und kleinzelligen Lungenkarzinomen untersucht (Alberti, 2001). Die Ergebnisse auf RNA-Ebene konnten auf Proteinebene mit einem Multitumor-Gewebearray bestätigt werden. Der Gewebearray enthielt jeweils zehn Tumorgewebebeispiele von Lunge und Schilddrüse sowie die korrespondierenden Normalgewebe. Multitumor-Gewebearrays erlauben die Analyse einer großen Anzahl an Tumorgewebeproben in einem Versuch. Allerdings wurde diskutiert, ob Gewebestücke mit nur 2 mm Durchmesser eine repräsentative Aussagefähigkeit für die gesamte Tumormasse geben können (Hoos und Cordon-Cardo, 2001). Im Rahmen einer vergleichenden Expressionsanalyse von cDNA-Arrays und Multitumor-Gewebearrays fanden Ginestier *et al.* (2002) jedoch eine gute Übereinstimmung in der Expression von einem Drittel der 15 analysierten Tumormarker. Die Analyse der differentiellen mRNA-Expression von Trop-2 in Lungen- und Schilddrüsengeweben mit dem „Cancer Profiling“ cDNA-Array korrelierte mit der Proteinexpression von Trop-2 im Multitumor-Gewebearray. Eine immunpositive, membranständige Färbung für Trop-2 wurde in der Mehrzahl von Papillenkarcinomen der Schilddrüse erhalten. Die verschiedenen Varianten (Plattenepithel-, Adeno- und großzelliges Karzinom) von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen waren ebenfalls stark gefärbt, während die Normalgewebe zumeist keine Immunfärbung zeigten. Für eine statistische Absicherung dieser vorläufigen Ergebnisse bezüglich der Expression von Trop-2 müsste allerdings noch eine weitaus größere Anzahl an Geweben analysiert werden. Aufgrund der unterschiedlichen Behandlung von Patienten mit nicht-kleinzelligen und

kleinzelligen Lungenkarzinomen sollten die Experimente ebenfalls auf die Analyse von kleinzelligen Lungenkarzinomen ausgedehnt werden (Bhattacharjee *et al.*, 2001). Zu diesem Zweck werden zur Zeit immunhistochemische Färbungen in Kooperation mit Herrn J. Wagner (Institut für Pathologie der Universität des Saarlandes, Homburg-Saar) durchgeführt, allerdings wiesen erste Immunfärbungen keine Expression von Trop-2 in Tumorbiopsien von kleinzelligen Lungenkarzinomen auf.

4.4 *In vitro*-Analysen zum Einfluß der Trop-2-Expression in Tumorzellen

4.4.1 Die Proteinspiegel von Cyclin D1 und β -Catenin sind nach Induktion von Trop-2 in Kolon-Tumorzellen erhöht

Der Vergleich von Trop-2-negativen und Trop-2-positiven Kolon-Tumorzellen mit gleichem genetischen Hintergrund ermöglichte es, den Einfluss von Trop-2 auf das metastasierende Potential von Kolonkarzinomzellen zu studieren. Hierzu wurden als Trop-2-negativ identifizierte, nicht-metastasierende KM12C-Zellen stabil mit der kodierenden Region des *TROP2*-Gens transfiziert. In Übereinstimmung zu früheren Beobachtungen mit stabil Trop-2-transfizierten Mausfibroblastenzellen (L-Zellen) oder COS-7-Nierenzellen von Affen (Fornaro *et al.*, 1995) zeigten KM12C-Zellen, die in dieser Arbeit mit einem konstitutiven Expressionsvektor für Trop-2 transfiziert wurden, keine morphologischen Veränderungen oder Modifikationen im Wachstumsverhalten. Ein parallel dazu verwendeter Doxycyclin-induzierbarer Expressionsvektor (pBig2i, Strathdee *et al.*, 1999) erwies sich für die Transfektion der verwendeten KM12C-Zelllinie als ungeeignet, da er zu starken morphologischen Veränderungen in den Trop-2- als auch in den Leervektor-Transfektanten führte (Daten nicht gezeigt).

Eine Studie von Herynk *et al.* (2003) zeigte, dass in den metastasierenden KM12SM- und KM12L4A-Zellen erhöhte Cyclin D1-Proteinspiegel im Vergleich zu den KM12C-Zellen auftraten. Diese Beobachtung konnten in der vorliegenden Arbeit anhand einer „Westernblot“-Analyse bestätigt werden. Zusätzlich konnte mit einem Immunblot erstmalig quantitativ mehr Cyclin D1-Protein in Trop-2-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Leervektor-transfizierten Zellen detektiert werden. Dies lässt vermuten, dass die Cyclin D1-Expression in den KM12-Zellen ebenfalls von Trop-2 reguliert sein könnte und liefert somit einen ersten Einblick in eventuelle Signaltransduktionswege des Trop-2-Moleküls. Cyclin D1 leitet als ein wesentlicher Regulator des Zellzyklus den Übergang von der späten G1-Phase in die S-Phase ein. Unter physiologischen Bedingungen ist die Expression von Cyclin D1 genau kontrolliert indem es am Beginn der G1-Phase synthetisiert und schon bald nach dem G1/S-Phasenübergang wieder degradiert wird. Eine zusätzliche Funktion als Onkoprotein wurde für Cyclin D1 von Hinds *et al.* (1994)

vorgeschlagen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass überexprimiertes Cyclin D1-Protein bei der Transformation von Zellen beteiligt ist. Eine Überexpression von Cyclin D1 wurde in humanem kolorektalen Krebs beobachtet (Arber *et al.*, 1997) und die induzierte Expression von Cyclin D1 könnte zu einem metastatischen Phänotyp führen. Dies wurde von Tarbé *et al.* (2002) anhand eines Zellmodells für ein Pankreas-Adenokarzinom in Ratten postuliert. Herynk *et al.* (2003) bemerkten, dass neben dem erhöhten Cyclin D1-Spiegel in den metastasierenden KM12-Zellen in gleicher Weise die c-Myc- und uPAR-Proteinspiegel erhöht waren. Diese Beobachtung korrelierte mit den ebenfalls erhöhten Proteinspiegeln von Mitgliedern der Familie der „T Cell Factor“ (Tcf) Transkriptionsfaktoren. Die Induktion der transkriptionellen Aktivität von Mitgliedern der Tcf-Familie wird durch eine Interaktion mit β -Catenin reguliert und resultiert in der Aktivierung spezifischer Gene wie Cyclin D1 (Tetsu und McCormick, 1999), c-Myc (He *et al.*, 1998), c-Jun (Mann *et al.*, 1999) und uPAR (Behrens *et al.*, 1996). Ein funktioneller Tcf-Transkriptionskomplex benötigt die Assemblierung des Tcf-Proteins mit β -Catenin, indem β -Catenin die transkriptionellen Aktivierungsdomänen bereitstellt. Der Tcf/ β -Cateninkomplex transloziert daraufhin in den Zellkern (Morin, 1999). Eine Erhöhung der Proteinmenge an β -Catenin in der Zelle kann die transkriptionelle Aktivität des Tcf/ β -Cateninkomplexes steigern und zu einer verstärkten Synthese von Cyclin D1 führen (Wang *et al.*, 2002).

Um diesen Zusammenhang zu überprüfen, wurde in einem Experiment untersucht, ob der erhöhte Proteinspiegel von Cyclin D1 in den Trop-2-exprimierenden Transfektanten mit einem erhöhten Proteinspiegel von β -Catenin korrelierte. Tatsächlich konnten erhöhte Proteinspiegel für β -Catenin in den konstitutiv Trop-2-exprimierenden Transfektanten nachgewiesen werden. Dies lässt für Trop-2 eine Rolle im Tcf/ β -Cateninsignalweg vermuten. Die Etablierung stabiler Transfektanten birgt jedoch stets das Risiko einer klonalen Selektion, so dass die Frage nach einem direkten Zusammenhang zwischen der Trop-2- und der Cyclin D1- bzw. β -Catenininduktion an dieser Stelle nicht endgültig beantwortet werden konnte. Den Nachweis hierfür könnten weitere Untersuchungen mit einem induzierbaren Expressionssystem für Trop-2 erbringen. Nachfolgende Experimente werden dann klären, ob noch weitere Zielproteine des Tcf/ β -Cateninkomplexes in den Trop-2-exprimierenden Transfektanten dereguliert vorliegen. Daraufhin sollte untersucht werden, ob die verstärkte Signalkaskade einzig als eine Folge der erhöhten Expression von β -Catenin angesehen werden kann. Eine Analyse des Phosphorylierungsstatus von β -Catenin in den Transfektanten könnte ein weiteres aufschlussreiches Nachfolgeexperiment sein. Herynk *et al.* (2003) schlugen in dem Zusammenhang bereits ein Modell für das KM12-Zellliniensystem vor. Sie postulierten, dass die aktivierte Rezeptor-Proteintyrosinkinase c-Met nachfolgend β -Catenin phosphoryliert und somit die transkriptionelle Aktivität des Tcf/ β -Cateninkomplexes erhöht.

4.4.2 Trop-2-vermittelte Effekte auf die Migrationsfähigkeit von Kolon-Tumorzellen

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse deuten auf einen Einfluss von Trop-2 auf die Migration von Kolon-Tumorzellen. Die Migration von Zellen ist ein dynamischer Prozess der Zelladhäsion, bei dem Zellen mit ihrer Vorderfront neue Interaktionen mit dem Substrat ausbilden und sich mit ihrem Ende wieder vom Substrat lösen (Huttenlocher *et al.*, 1996). Erfolgreich metastasierende Tumorzellen sind in der Lage, von der ursprünglichen Tumormasse aus in das zirkuläre System zu migrieren, das sie anschließend wieder durch Migration in ein Organ verlassen. Die intrazellulären kontraktile Kräfte für die notwendige Zellbewegung werden durch „Myosinmotoren“ bereitgestellt (Wolenski, 1995). Ein Beispiel hierfür ist Myosin II, das zu bipolaren Filamenten polymerisiert. An diese können Aktinfilamente binden und somit eine ATP-abhängige Zellbewegung ermöglichen. Vermutlich können diese auf Myosin II basierenden Zellkontraktionen in migrierenden Zellen adhäsive Interaktionen durch direkte Ausübung von physikalischer Spannung brechen (Jay *et al.*, 1995). Diese Kraftanwendung, ausgelöst durch die Kontraktion von Aktinfilamenten, könnte zum Bruch der Bindungen entweder an der Verknüpfungsstelle von extrazellulärem Adhäsionsrezeptor/Ligand oder von intrazellulärem Rezeptor/Zytoskelett führen. Stimuliert wird die Myosin II gesteuerte Kontraktion durch Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Eine transiente Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration reguliert die von Integrinen vermittelte Adhäsion an Liganden der EZM und bewirkt, dass sich das hintere Zellende von der Matrix ablöst. Die kalziumregulierte Ablösung des hinteren Zellendes wird als eine wichtige Voraussetzung für eine effektive Migration von Zellen angesehen (Maxfield, 1993). In diesem Zusammenhang ist es äußerst interessant, dass ein intrazelluläres Kalziumsignal ausgelöst wird, wenn anti-Trop-2-Antikörper als Liganden an transmembrane Trop-2-Moleküle gebunden werden. Nach der Zugabe von Trop-2-spezifischen Antikörpern stieg die basale, intrazelluläre Kalziumkonzentration innerhalb von 1-2 Minuten um bis zu 300% (Ripani *et al.*, 1998). Dieses Ergebnis könnte ein Bindeglied zwischen der Funktion von Trop-2 als ein Kalziumsignal-vermittelnder Zelloberflächenrezeptor und der Beobachtung sein, dass die Expression von Trop-2 in den stabil transfizierten KM12C-Zellen die Zellmigration deutlich erhöht. Trotz der erhöhten Motilität von Trop-2-Transfektanten zeigten diese *in vitro* keine erhöhte Fähigkeit eine künstliche extrazelluläre Matrix (Matrigel) zu durchdringen. Die unveränderte Invasivität der Transfektanten deutet darauf hin, dass durch die Überexpression von Trop-2 keine Expression von spezifischen Proteinase induziert wurde. Die Synthese von EZM-sezernierenden Enzymen ist neben der lokomotorischen Fähigkeit von Zellen eine wichtige Voraussetzung für das Eindringen von metastasierenden Zellen aus den Gefäßen in das Gewebe von Organen. Im Gegensatz zu den Trop-2-Transfektanten konnte eine Verdopplung der Invasionsfähigkeit

durch das Matrigel für die metastasierenden Zelllinien KM12SM und KM12L4A im Vergleich zur nicht-metastasierenden Zelllinie KM12C bestimmt werden. Diese Beobachtung stand in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Morikawa *et al.* (1988b), die eine um den Faktor 2 erhöhte Typ IV Kollagenaseaktivität in den Zelllinien KM12SM und KM12L4A identifizierten. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die Expression von Kollagenase Typ IV in metastasierenden Zellen stark von dem unterschiedlichen Milieu der befallenen Organe beeinflusst wird (Nakajima *et al.*, 1990). Um diesen Aspekt zu berücksichtigen sollten weiterführende Studien, die den Einfluss der Trop-2-Expression auf das invasive Verhalten von Kolonkarzinomzellen untersuchen, dann *in vivo* durchgeführt werden.

4.4.3 Die erhöhte Fähigkeit zur Zelladhäsion an Komponenten der EZM in stark metastasierenden Zelllinien ist nicht mit der Trop-2-Expression assoziiert

Ein neuartiger Befund in dieser Arbeit war, dass die Fähigkeit zur *in vitro*-Zelladhäsion an fünf klassische Substrate der extrazellulären Matrix in den nachgewiesenen stark metastasierenden Zellen KM12SM und KM12L4A deutlich stärker war als in den nicht-metastasierenden KM12C-Zellen. Die Adhäsion von Tumorzellen an die Komponenten der Basalmembran und extrazellulären Matrix ist ein kritischer Schritt in der Metastasierung von entfernt liegenden Organen (Morris *et al.*, 1997). Allerdings konnten keine Unterschiede in der Adhäsionsfähigkeit von Trop-2-exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellklonen festgestellt werden.

4.5 Fazit und Ausblick

Mit einem Set an Oligonukleotid-Mikroarrays konnten gleichzeitig die Expressionsspiegel von mehreren tausend Genen in Zellmodellen für den Prozess der kolorektalen Metastasierung analysiert werden. Durch die Kombination von *in silico*-Analysen der erhaltenen Datensätze und der Bestätigung der Expression von ausgewählten Genen mit der „Northernblot“-Analyse erwies sich die Genchip-Analyse als sehr verlässlich und reproduzierbar.

Die Genexpressionsanalysen führten zur Identifizierung einer Induktion von Trop-2 in allen metastasierenden Zellen von zwei Kolonkarzinom-Zellmodellen im Vergleich zu den nicht-metastasierenden Zellen. Anschließend wurde die Induktion von Trop-2 auf der mRNA- und Proteinebene in nicht korrespondierendem und korrespondierendem Gewebe von kolorektalen Primärtumoren und Lebermetastasen bestätigt. Diese Ergebnisse identifizierten Trop-2 als ein potentiell wichtiges Protein im Prozess der kolorektalen Metastasierung. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal eine erhöhte

Expression von Trop-2 in Schilddrüsenkarzinomen und in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen im Vergleich zu den korrespondierenden Normalgeweben berichtet.

Im Rahmen der *in vitro*-Versuchsreihe mit stabil Trop-2-transfizierten Zellen waren keine Unterschiede im Proliferationsvermögen in hochkonzentrierter Agarose (1,2%) zwischen den Trop-2-transfizierten Zellen und ihren Leervektor-transfizierten Äquivalenten erkennbar (Daten nicht gezeigt). Dahingegen wurde eine Korrelation zwischen dem Proliferationsvermögen von Zellen des KM12-Zellmodells in hochkonzentrierter Agarose und ihrem *in vivo*-Proliferationsvermögen in metastatisch befallenen Organen beobachtet (Li *et al.*, 1989). Die biologischen Hintergründe, die zu der Korrelation zwischen dem *in vitro* erhöhten Proliferationsvermögen von Einzelzellen in dichter Agarose und dem *in vivo* erhöhten Metastasierungspotential der Zellen führen, sind noch nicht genau geklärt. Trotzdem kann anhand der Ergebnisse wahrscheinlich geschlossen werden, dass eine Induktion von Trop-2 alleine nicht ausreicht, um die nicht-metastasierenden KM12C-Kolonkarzinomzellen in eine stark metastasierende Variante wie beispielsweise die KM12SM-Zellen zu konvertieren. Dies überrascht nicht, wenn man den metastatischen Prozess als eine Abfolge von einzelnen wichtigen Schritten ansieht. Diese Schritte müssen möglicherweise jeder für sich erfolgreich abgeschlossen werden um letztendlich zu einem metastatischen Tumor zu führen (Woodhouse *et al.*, 1997). Somit würde eine erfolgreiche Metastasierung ähnlichen Regeln folgen, wie in dem eingangs erwähnten Modell von Fearon und Vogelstein (1990) für den Prozess der kolorektalen Karzinogenese. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass der Verlust einer ausbalancierten Trop-2-Expression als ein Schritt in Richtung der Ausbildung eines metastatischen Phänotyps von kolorektalen Krebszellen angesehen werden kann. Als eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Metastasierung kann insbesondere die Erhöhung der migratorischen Eigenschaften von Trop-2-exprimierenden Zellen angesehen werden, die es den Zellen ermöglicht, sich von einem vorwiegend sessilen zu einem hochmobilen Phänotyp zu entwickeln. Die ersten Hinweise auf einen möglichen Einfluss von Trop-2 auf den Tcf/ β -Cateninsignalweg sind ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Arbeit. Dieses vorläufige Resultat sollte eine Grundlage für nachfolgende Untersuchungen bilden, die in der Identifizierung von weiteren Trop-2-regulierten Genen resultieren werden.

Zusätzliche funktionelle Analysen sollten mit weiteren stabil Trop-2-transfizierten Zellklonen vertieft werden, um weitestgehend ausschließen zu können, dass die beobachteten Effekte nicht nur auf Variationen zwischen den unterschiedlichen Klonen zurückzuführen sind. Für diese nachfolgenden *in vitro*-Analysen sollte ein induzierbares Trop-2-Expressionssystem verwendet werden. Im weiteren wäre es sehr interessant, die erhaltenen Ergebnisse mit einem zweiten *in vitro*-Zellmodell zu vergleichen. Dies könnte

zum Beispiel durch den posttranskriptionalen Abbau der Trop-2-mRNA-Moleküle in der metastasierenden Zelllinie HCT116U5.5 durch die Methode der RNA-Interferenz (RNAi, Elbashir *et al.*, 2001) erfolgen. Sollte sich die Korrelation zwischen einer hohen Expression von Trop-2 und einer verbesserten Migrationsfähigkeit von Zellen bestätigen lassen, sollte analysiert werden, ob dieser Effekt ebenfalls das metastatische Potential von Tumorzellen *in vivo* beeinflusst.

Techniken zur Untersuchung der differentiellen Genexpression können in Kombination mit geeigneten Zellsystemen entscheidend zur Lösung der Frage beitragen, welche molekularen Ursachen zu der Metastasierung von Krebs führen. Dies konnte in dieser Arbeit anhand der erstmaligen Identifizierung von Trop-2 als ein potentielles Glied der kolorektalen Tumorprogressions-Kaskade demonstriert werden. Zusätzlich kann anhand der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit ein mögliches klinisches Potential von Trop-2 als Tumormarker des kolorektalen Karzinoms diskutiert werden.

5 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist weltweit der zweithäufigste bösartige Tumor. Fernmetastasen eines CRC treten zumeist in Leber und Lunge auf, sind nur in seltenen Fällen operativ entfernbar und sprechen nicht auf derzeit verfügbare Chemotherapien an. Die Identifizierung von Genen und die Charakterisierung der molekularen Mechanismen, durch welche sie zur Tumorprogression eines CRC beitragen, liefert eine Grundlage für die Prävention oder Behandlung der zumeist tödlich verlaufenden Erkrankung.

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Genen, die für die Entwicklung des metastatischen Phänotyps in Kolonkarzinomzellen verantwortlich sind. Hierzu wurden mittels der Genchip-Technologie die Transkriptionsprofile von insgesamt fünf Tumor-Zelllinien erstellt und nach stringenten Auswahlkriterien miteinander verglichen.

Zuerst wurde ein CRC-Zellmodell verwendet, das aus einer in der Nacktmaus nicht-metastasierenden humanen Primärtumor-Zelllinie KM12C und zwei davon abgeleiteten, stark zur Leber metastasierenden Zelllinien, KM12SM und KM12L4A bestand. In diesem überwiegend isogenen Zellmodell wurden 145 Gene in beiden metastasierenden Zelllinien als dereguliert im Vergleich zu der nicht-metastasierenden Zelllinie identifiziert.

Die Transkriptionsprofile eines weiteren humanen CRC-Zellmodells, bestehend aus einer nicht-metastasierenden Zelllinie HCT116 und einer stark zur Lunge metastasierenden Zelllinie HCT116U5.5 wurden ebenfalls verglichen und 72 Gene als differentiell exprimiert identifiziert.

Ein Vergleich der Datensätze aller Transkriptionsprofile ermöglichte die Identifizierung von Vimentin und Trop-2 (TACSTD2, „Tumorassoziierter Vermittler von Kalziumsignalen“) als in allen metastasierenden Zelllinien überexprimiert. Die hohe Homologie des bisher noch weitestgehend unerforschten Trop-2 zu Trop-1 (Ep-CAM), einem regulatorischen Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, das überwiegend von aggressiven Tumorarten exprimiert wird und die Proliferation von Tumorzellen stimulieren kann, machten Trop-2 für weiterführende Expressions- und Funktionsstudien zu einem interessanten Zielgen.

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Expressionsstudien in einer Vielzahl von Tumorbiopsien zeigten deutlich erhöhte mRNA- und Proteinspiegel von Trop-2 in Metastasen aus CRC im Vergleich zu den Primärtumorgeweben. Zusätzlich zu diesem neuen Befund in CRC wurde in dieser Arbeit erstmalig eine erhöhte Expression von Trop-2 in Schilddrüsenkarzinomen und in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen im Vergleich zu den korrespondierenden Normalgeweben nachgewiesen.

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von Trop-2 für die Metastasierung von Karzinomzellen des Kolons wurden stabile Transfektanten für Trop-2 in der nicht-metastasierenden Zelllinie KM12C generiert. Die konstitutiv Trop-2 exprimierenden Zellklone zeigten erhöhte Cyclin D1-Proteinspiegel bei unveränderter Zellproliferation gegenüber den Vektorkontrollen. Die Induktion von Cyclin D1 könnte mit der Identifizierung eines ebenfalls erhöhten Proteinspiegels von β -Catenin in den Trop-2 exprimierenden Transfektanten in Zusammenhang stehen. Somit liefert diese Arbeit erste Hinweise auf einen möglichen Einfluss von Trop-2 auf den Tcf/ β -Catenin Signalweg.

Zusätzlich demonstrierte ein Migrationstest erhöhte mobile Eigenschaften von Trop-2 exprimierenden Zellen *in vitro*, während sich die invasive Fähigkeit der Transfektanten, *in vitro* durch eine Matrigelschicht zu wandern, nicht von den Vektorkontrollen unterschied.

Die induzierte Expression von Trop-2 in der Mehrzahl von Metastasen des kolorektalen Karzinoms sowie in Tumoren von Lunge und Schilddrüse war eine neue Beobachtung. Diese Ergebnisse demonstrieren das Potential von Hochdurchsatzmethoden wie die hier verwendete Genchip-Technologie in Kombination mit geeigneten Zellmodellen. In der vorliegenden Arbeit führte sie zur Identifizierung von Trop-2 als einen Marker der Tumorprogression und Metastasierung von verschiedenen humanen Karzinomen.

6 Literaturverzeichnis

Adam PJ, Boyd R, Tyson KL, Fletcher GC, Stamps A, Hudson L, Poyser HR, Redpath N, Griffiths M, Steers G, Harris AL, Patel S, Berry J, Loader JA, Townsend RR, *et al.* (2003). Comprehensive proteomic analysis of breast cancer cell membranes reveals unique proteins with potential roles in clinical cancer. *J Biol Chem* 278, 6482-6489.

Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merril CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, *et al.* (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252, 1651-1656.

Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, Cantor A, Coppola D and Yeatman TJ (2002). Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J Natl Cancer Inst* 94, 513-521.

Alberti S, Miotti S, Stella M, Klein CE, Fornaro M, Menard S and Colnaghi MI (1992). Biochemical characterization of Trop-2, a cell surface molecule expressed by human carcinomas: formal proof that the monoclonal antibodies T16 and MOv-16 recognize Trop-2. *Hybridoma* 11, 539-545.

Alberti S (2001). Trop molecules as targets for anti-tumor immunotherapy in man. *Tumori* 87, S5-8.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson, JD (1994). *Molecular Biology of the Cell* (New York, Garland Publishing Inc.).

Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM and McEwan RN (1987). A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res* 47, 3239-3245.

Alwine JC, Kemp DJ and Stark GR (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5350-5354.

Arber N, Doki Y, Han EK, Sgambato A, Zhou P, Kim NH, Delohery T, Klein MG, Holt PR and Weinstein IB (1997). Antisense to cyclin D1 inhibits the growth and tumorigenicity of human colon cancer cells. *Cancer Res* 57, 1569-1574.

Arends JW (2000). Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J Pathol* 190, 412-416.

Aridome K, Tsutsui J, Takao S, Kadomatsu K, Ozawa M, Aikou T and Muramatsu T (1995). Increased midkine gene expression in human gastrointestinal cancers. *Jpn J Cancer Res* 86, 655-661.

Audic S and Claverie JM (2000). The first draft of the human genome. An academic and industrial perspective. Workshop at the Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, 1 to 2 October.

Auerbach W and Auerbach R (1994). Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacol Ther* 63, 265-311.

Avizienyte E, Wyke AW, Jones RJ, McLean GW, Westhoff MA, Brunton VG and Frame MC (2002). Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. *Nat Cell Biol* 4, 632-638.

Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ and Litvinov SV (1999). The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med* 77, 699-712.

Baskaran N, Kandpal RP, Bhargava AK, Glynn MW, Bale A and Weissman SM (1996). Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. *Genome Res* 6, 633-638.

Basu A, Goldenberg DM and Stein R (1995). The epithelial/carcinoma antigen EGP-1, recognized by monoclonal antibody RS7-3G11, is phosphorylated on serine 303. *Int J Cancer* 62, 472-479.

Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R and Birchmeier W (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-642.

Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shirota K and Stanners CP (1989). Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 57, 327-334.

Berditchevski F (2001). Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci* 114, 4143-4151.

Bertram J, Palfner K, Hiddemann W and Kneba M (1998). Elevated expression of S100P, CAPL and MAGE 3 in doxorubicin-resistant cell lines: comparison of mRNA differential display reverse transcription-polymerase chain reaction and subtractive suppressive hybridization for the analysis of differential gene expression. *Anticancer Drugs* 9, 311-317.

Bertucci F, Salas S, Eysteris S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Loriod B, Bachelart L, Montfort J, Victorero G, Viret F, Ollendorff V, Fert V, Giovaninni M, *et al.* (2004). Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* 23, 1377-1391.

Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, Ladd C, Beheshti J, Bueno R, Gillette M, Loda M, Weber G, Mark EJ, Lander ES, Wong W, *et al.* (2001). Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13790-13795.

Birchmeier C, Birchmeier W and Brand-Saberi B (1996). Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Acta Anat (Basel)* 156, 217-226.

Boismenu R, Rhein M, Fischer WH and Havran WL (1996). A role for CD81 in early T cell development. *Science* 271, 198-200.

Bonnet D, Lemoine FM, Frobert Y, Bonnet ML, Baillou C, Najman A and Guigon M (1996). Thymosin beta4, inhibitor for normal hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 24, 776-782.

Boyd D, Ziober B, Chakrabarty S and Brattain M (1989). Examination of urokinase protein/transcript levels and their relationship with laminin degradation in cultured colon carcinoma. *Cancer Res* 49, 816-820.

Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J and Brattain DE (1981). Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res* 41, 1751-1756.

- Brielmeier M, Bechet JM, Falk MH, Pawlita M, Polack A and Bornkamm GW (1998). Improving stable transfection efficiency: antioxidants dramatically improve the outgrowth of clones under dominant marker selection. *Nucleic Acids Res* 26, 2082-2085.
- Brown PO and Botstein D (1999). Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* 21, 33-37.
- Bull HA, Brickell PM and Dowd PM (1994). Src-related protein tyrosine kinases are physically associated with the surface antigen CD36 in human dermal microvascular endothelial cells. *FEBS Lett* 351, 41-44.
- Burnette WN (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203.
- Cajot JF, Sordat I, Silvestre T and Sordat B (1997). Differential display cloning identifies motility-related protein (MRP1/CD9) as highly expressed in primary compared to metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 57, 2593-2597.
- Carr I (1983). Lymphatic metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2, 307-317.
- Cha HJ, Jeong MJ and Kleinman HK (2003). Role of thymosin beta4 in tumor metastasis and angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 95, 1674-1680.
- Chakrabarty S, Fan D and Varani J (1990). Modulation of differentiation and proliferation in human colon carcinoma cells by transforming growth factor beta 1 and beta 2. *Int J Cancer* 46, 493-499.
- Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardia SL, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM and Beer DG (2002). Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 1, 304-313.
- Choi SH, Takahashi K, Eto H, Yoon SS and Tanabe KK (2000). CD44s expression in human colon carcinomas influences growth of liver metastases. *Int J Cancer* 85, 523-526.
- Chomczynski P (1992). One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal Biochem* 201, 134-139.
- Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Ziche M and Bicknell R (1997). An angiogenic role for the neurokinins midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Res* 57, 1814-1819.
- Christofori G and Semb H (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 24, 73-76.
- Ciccarelli FD, Acciarito A and Alberti S (2000). Large and diverse numbers of human diseases with HIKE mutations. *Hum Mol Genet* 9, 1001-1007.
- Clark EA, Golub TR, Lander ES and Hynes RO (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 406, 532-535.
- Cottler-Fox M and Fox CH (1991). Examining cells for infectious agents: a novel approach. *J Infect Dis* 164, 1239-1240.
- Davis CG (1990). The many faces of epidermal growth factor repeats. *New Biol* 2, 410-419.

- de Récamier JD (1829). Recherches sur le traitement du cancer par la compression méthodique simple ou combinée, et sur l'histoire générale de la même maladie (Paris, Gabon).
- de Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E and Farquhar MG (2000). The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 235-271.
- de Wit NJ, Weidle UH, Ruiter DJ and van Muijen GN (2002). Expression profiling of MMA-1a and splice variant MMA-1b: new cancer/testis antigens identified in human melanoma. *Int J Cancer* 98, 547-553.
- DeRisi JL, Iyer VR and Brown PO (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680-686.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED and Siebert PD (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6025-6030.
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M and Dvorak AM (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146, 1029-1039.
- Eagle H (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130, 432-437.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO and Botstein D (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14863-14868.
- El Sewedy T, Fornaro M and Alberti S (1998). Cloning of the murine TROP2 gene: conservation of a PIP2-binding sequence in the cytoplasmic domain of TROP-2. *Int J Cancer* 75, 324-330.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K and Tuschl T (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Evtimova V, Schwirzke M, Tarbe N, Burtscher H, Jarsch M, Kaul S and Weidle UH (2001). Identification of breast cancer metastasis-associated genes by chip technology. *Anticancer Res* 21, 3799-3806.
- Evtimova V, Zeillinger R, Kaul S and Weidle UH (2004). Identification of CRASH, a gene deregulated in gynecological tumors. *Int J Oncol* 24, 33-41.
- Ewing J (1928). Neoplastic diseases. (Philadelphia: WB Saunders).
- Faassen AE, Schragger JA, Klein DJ, Oegema TR, Couchman JR and McCarthy JB (1992). A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion. *J Cell Biol* 116, 521-531.
- Fan JB, Chen X, Halushka MK, Berno A, Huang X, Ryder T, Lipshutz RJ, Lockhart DJ and Chakravarti A (2000). Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays. *Genome Res* 10, 853-860.

- Fearon ER and Vogelstein B (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.
- Feinberg AP and Vogelstein B (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13.
- Fidler IJ (1970). Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with ¹²⁵I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 45, 773-782.
- Fidler IJ (1973). The relationship of embolic homogeneity, number, size and viability to the incidence of experimental metastasis. *Eur J Cancer* 9, 223-227.
- Fidler IJ and Bucana C (1977). Mechanism of tumor cell resistance to lysis by syngeneic lymphocytes. *Cancer Res* 37, 3945-3956.
- Fidler IJ (1990). Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 50, 6130-6138.
- Fidler IJ and Radinsky R (1990). Genetic control of cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 82, 166-168.
- Fidler IJ (2002). Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol* 12, 89-96.
- Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT and Solas D (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251, 767-773.
- Folkman J (1986). How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res* 46, 467-473.
- Folkman J (2003). Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med* 3, 643-651.
- Folkman J and Klagsbrun M (1987). Angiogenic factors. *Science* 235, 442-447.
- Fornaro M, Dell'Arciprete R, Stella M, Bucci C, Nutini M, Capri MG and Alberti S (1995). Cloning of the gene encoding Trop-2, a cell-surface glycoprotein expressed by human carcinomas. *Int J Cancer* 62, 610-618.
- Franke WW, Schmid E, Osborn M and Weber K (1979). Intermediate-sized filaments of human endothelial cells. *J Cell Biol* 81, 570-580.
- Franke WW, Mayer D, Schmid E, Denk H and Borenfreund E (1981). Differences of expression of cytoskeletal proteins in cultured rat hepatocytes and hepatoma cells. *Exp Cell Res* 134, 345-365.
- Gasic GJ (1984). Role of plasma, platelets, and endothelial cells in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 3, 99-114.
- Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Bertucci F, Eisinger F, Geneix J, Bechlian D, Conte N, Adelaide J, Toiron Y, Nguyen C, Viens P, Mozziconacci MJ, Houlgatte R, Birnbaum D and Jacquemier J (2002). Distinct and complementary information provided by use of tissue and DNA microarrays in the study of breast tumor markers. *Am J Pathol* 161, 1223-1233.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD and Lander ES (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286, 531-537.

Gottlinger HG, Funke I, Johnson JP, Gokel JM and Riethmuller G (1986). The epithelial cell surface antigen 17-1A, a target for antibody-mediated tumor therapy: its biochemical nature, tissue distribution and recognition by different monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 38, 47-53.

Grant DS, Rose W, Yaen C, Goldstein A, Martinez J and Kleinman H (1999). Thymosin beta4 enhances endothelial cell differentiation and angiogenesis. *Angiogenesis* 3, 125-135.

Greenlee RT, Murray T, Bolden S and Wingo PA (2000). Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 50, 7-33.

Gress TM, Hoheisel JD, Lennon GG, Zehetner G and Lehrach H (1992). Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. *Mamm Genome* 3, 609-619.

Griffin TJ, Gygi SP, Ideker T, Rist B, Eng J, Hood L and Aebersold R (2002). Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics* 1, 323-333.

Guo YS, Narayan S, Yallampalli C and Singh P (1992). Characterization of insulinlike growth factor I receptors in human colon cancer. *Gastroenterology* 102, 1101-1108.

Gutman M and Fidler IJ (1995). Biology of human colon cancer metastasis. *World J Surg* 19, 226-234.

Hacia JG (1999). Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nat Genet* 21, 42-47.

Hanada N, Makino K, Koga H, Morisaki T, Kuwahara H, Masuko N, Tabira Y, Hiraoka T, Kitamura N, Kikuchi A and Saya H (2000). NE-dlg, a mammalian homolog of *Drosophila* dlg tumor suppressor, induces growth suppression and impairment of cell adhesion: possible involvement of down-regulation of beta-catenin by NE-dlg expression. *Int J Cancer* 86, 480-488.

Hanahan D and Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hart IR and Fidler IJ (1980). Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. *Cancer Res* 40, 2281-2287.

Hasegawa S, Sakurai Y, Imazu H, Matsubara T, Ochiai M, Funabiki T, Suzuki K, Mizoguchi Y, Kuroda M and Kasahara M (2000). Metastasis to the forearm skeletal muscle from an adenocarcinoma of the colon: report of a case. *Surg Today* 30, 1118-1123.

Hashino J, Fukuda Y, Oikawa S, Nakazato H and Nakanishi T (1994). Metastatic potential of human colorectal carcinoma SW1222 cells transfected with cDNA encoding carcinoembryonic antigen. *Clin Exp Metastasis* 12, 324-328.

Hauser NC, Vingron M, Scheideler M, Krems B, Hellmuth K, Entian KD and Hoheisel JD (1998). Transcriptional profiling on all open reading frames of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1209-1221.

He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B and Kinzler KW (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-1512.

Hegde P, Qi R, Gaspard R, Abernathy K, Dharap S, Earle-Hughes J, Gay C, Nwokekeh NU, Chen T, Saeed AI, Sharov V, Lee NH, Yeatman TJ and Quackenbush J (2001). Identification of tumor markers in models of human colorectal cancer using a 19,200-element complementary DNA microarray. *Cancer Res* 61, 7792-7797.

Hernandez A, Smith F, Wang Q, Wang X and Evers BM (2000). Assessment of differential gene expression patterns in human colon cancers. *Ann Surg* 232, 576-585.

Herynk MH, Tsan R, Radinsky R and Gallick GE (2003). Activation of c-Met in colorectal carcinoma cells leads to constitutive association of tyrosine-phosphorylated beta-catenin. *Clin Exp Metastasis* 20, 291-300.

Hewitt RE, McMarlin A, Kleiner D, Wersto R, Martin P, Tsokos M, Stamp GW, Stetler-Stevenson WG and Tsoskas M (2000). Validation of a model of colon cancer progression. *J Pathol* 192, 446-454.

Hiller KM, Mayben JP, Bendt KM, Manousos GA, Senger K, Cameron HS and Weston BW (2000). Transfection of alpha(1,3)fucosyltransferase antisense sequences impairs the proliferative and tumorigenic ability of human colon carcinoma cells. *Mol Carcinog* 27, 280-288.

Hinds PW, Dowdy SF, Eaton EN, Arnold A and Weinberg RA (1994). Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 709-713.

Hirschhorn RR, Yuan ZA, Aller P, Gibson CW and Baserga R (1984). Molecular biology of cell division. *Symp Fundam Cancer Res* 37, 1-10.

Hoos A and Cordon-Cardo C (2001). Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest* 81, 1331-1338.

Hunt RC and Davis AA (1990). Altered expression of keratin and vimentin in human retinal pigment epithelial cells *in vivo* and *in vitro*. *J Cell Physiol* 145, 187-199.

Hurd TW, Gao L, Roh MH, Macara IG and Margolis B (2003). Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly. *Nat Cell Biol* 5, 137-142.

Huttenlocher A, Ginsberg MH and Horwitz AF (1996). Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity. *J Cell Biol* 134, 1551-1562.

Ilg EC, Schafer BW and Heizmann CW (1996). Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors. *Int J Cancer* 68, 325-332.

Ingi T, Krumins AM, Chidiac P, Brothers GM, Chung S, Snow BE, Barnes CA, Lanahan AA, Siderovski DP, Ross EM, Gilman AG and Worley PF (1998). Dynamic regulation of RGS2 suggests a novel mechanism in G-protein signaling and neuronal plasticity. *J Neurosci* 18, 7178-7188.

Iozzo RV and Cohen I (1994). Altered proteoglycan gene expression and the tumor stroma. *Exs* 70, 199-214.

Iozzo RV (1998). Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 67, 609-652.

Ishii M, Hashimoto S, Tsutsumi S, Wada Y, Matsushima K, Kodama T and Aburatani H (2000). Direct comparison of GeneChip and SAGE on the quantitative accuracy in transcript profiling analysis. *Genomics* 68, 136-143.

Ivanov SV, Kuzmin I, Wei MH, Pack S, Geil L, Johnson BE, Stanbridge EJ and Lerman MI (1998). Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12596-601.

Jalkanen S and Jalkanen M (1992). Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* 116, 817-825.

Jay PY, Pham PA, Wong SA and Elson EL (1995). A mechanical function of myosin II in cell motility. *J Cell Sci* 108 (Pt 1), 387-393.

Jessup JM and Gallick GE (1992). The biology of colorectal carcinoma. *Curr Probl Cancer* 16, 261-328.

Johnson JP (1991). Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev* 10, 11-22.

Jones FS and Rous P (1914). On the cause of the localization of secondary tumors at point of injury. *J Exp Med* 20, 404-412.

Kane MD, Jatko TA, Stumpf CR, Lu J, Thomas JD and Madore SJ (2000). Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res* 28, 4552-4557.

Kennedy GC, Matsuzaki H, Dong S, Liu WM, Huang J, Liu G, Su X, Cao M, Chen W, Zhang J, Liu W, Yang G, Di X, Ryder T, He Z, *et al.* (2003). Large-scale genotyping of complex DNA. *Nat Biotechnol* 21, 1233-1237.

Kerbel RS (1990). Growth dominance of the metastatic cancer cell: cellular and molecular aspects. *Adv Cancer Res* 55, 87-132.

Kitadai Y, Radinsky R, Bucana CD, Takahashi Y, Xie K, Tahara E and Fidler IJ (1996). Regulation of carcinoembryonic antigen expression in human colon carcinoma cells by the organ microenvironment. *Am J Pathol* 149, 1157-1166.

Kivela A, Parkkila S, Saarnio J, Karttunen TJ, Kivela J, Parkkila AK, Waheed A, Sly WS, Grubb JH, Shah G, Tureci O and Rajaniemi H (2000). Expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase isozyme XII in normal human gut and colorectal tumors. *Am J Pathol* 156, 577-584.

- Koretz K, Schlag P, Boumsell L and Moller P (1991). Expression of VLA-alpha 2, VLA-alpha 6, and VLA-beta 1 chains in normal mucosa and adenomas of the colon, and in colon carcinomas and their liver metastases. *Am J Pathol* 138, 741-750.
- Kudo T, Ikehara Y, Togayachi A, Morozumi K, Watanabe M, Nakamura M, Nishihara S and Narimatsu H (1998). Up-regulation of a set of glycosyltransferase genes in human colorectal cancer. *Lab Invest* 78, 797-811.
- Kyo K, Muto T, Nagawa H, Lathrop GM and Nakamura Y (2001). Associations of distinct variants of the intestinal mucin gene MUC3A with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Hum Genet* 46, 5-20.
- Lauffenburger DA and Horwitz AF (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369.
- Lee SW, Tomasetto C, Swisshelm K, Keyomarsi K and Sager R (1992). Down-regulation of a member of the S100 gene family in mammary carcinoma cells and reexpression by azadeoxycytidine treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2504-2508.
- Li L, Price JE, Fan D, Zhang RD, Bucana CD and Fidler IJ (1989). Correlation of growth capacity of human tumor cells in hard agarose with their *in vivo* proliferative capacity at specific metastatic sites. *J Natl Cancer Inst* 81, 1406-1412.
- Li M, Lin YM, Hasegawa S, Shimokawa T, Murata K, Kameyama M, Ishikawa O, Katagiri T, Tsunoda T, Nakamura Y and Furukawa Y (2004). Genes associated with liver metastasis of colon cancer, identified by genome-wide cDNA microarray. *Int J Oncol* 24, 305-312.
- Liang F, Holt I, Pertea G, Karamycheva S, Salzberg SL and Quackenbush J (2000). Gene index analysis of the human genome estimates approximately 120,000 genes. *Nat Genet* 25, 239-240.
- Liang P and Pardee AB (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-971.
- Linnenbach AJ, Seng BA, Wu S, Robbins S, Scollon M, Pyrc JJ, Druck T and Huebner K (1993). Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes. *Mol Cell Biol* 13, 1507-1515.
- Liotta LA (1986). Tumor invasion and metastases-role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res* 46, 1-7.
- Liotta LA (1992). Cancer cell invasion and metastasis. *Sci Am* 266, 54-59, 62-53.
- Lipinski M, Parks DR, Rouse RV and Herzenberg LA (1981). Human trophoblast cell-surface antigens defined by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 5147-5150.
- Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR and Lockhart DJ (1999). High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 21, 20-24.
- Lisitsyn N and Wigler M (1993). Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259, 946-951.

- Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H and Brown EL (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* **14**, 1675-1680.
- Lombardi DP, Geradts J, Foley JF, Chiao C, Lamb PW and Barrett JC (1999). Loss of KAI1 expression in the progression of colorectal cancer. *Cancer Res* **59**, 5724-5731.
- Long L, Nip J and Brodt P (1994). Paracrine growth stimulation by hepatocyte-derived insulin-like growth factor-1: a regulatory mechanism for carcinoma cells metastatic to the liver. *Cancer Res* **54**, 3732-3737.
- Lukashev ME and Werb Z (1998). ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol* **8**, 437-441.
- Malinda KM, Goldstein AL and Kleinman HK (1997). Thymosin beta 4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *Faseb J* **11**, 474-481.
- Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ and Hanski C (1999). Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1603-1608.
- Markowitz SD, Molkenin K, Gerbic C, Jackson J, Stellato T and Willson JK (1990). Growth stimulation by coexpression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor-receptor in normal and adenomatous human colon epithelium. *J Clin Invest* **86**, 356-362.
- Martinez-Zaguilan R, Seftor EA, Seftor RE, Chu YW, Gillies RJ and Hendrix MJ (1996). Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* **14**, 176-186.
- Matsuda K, Masaki T, Watanabe T, Kitayama J, Nagawa H, Muto T and Ajioka Y (2000). Clinical significance of MUC1 and MUC2 mucin and p53 protein expression in colorectal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* **30**, 89-94.
- Matsumura Y and Tarin D (1992). Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* **340**, 1053-1058.
- Maxfield FR (1993). Regulation of leukocyte locomotion by Ca²⁺. *Trends Cell Biol* **3**, 386-391.
- McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J, Sekhon M, Wylie K, Mardis ER, Wilson RK, Fulton R, Kucaba TA, Wagner-McPherson C, Barbazuk WB, Gregory SG, *et al.* (2001). A physical map of the human genome.
- Melton L (2003). Pharmacogenetics and genotyping: on the trail of SNPs. *Nature* **422**, 917-923.
- Michalopoulos GK (1990). Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *Faseb J* **4**, 176-187.
- Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M, Hishima T, Koike M, Shitara N, Iwama T, Utsunomiya J, Kuroki T and Mori T (1999). Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* **18**, 3098-3103.

- Mollicone R, Candelier JJ, Mennesson B, Couillin P, Venot AP and Oriol R (1992). Five specificity patterns of (1-3)-alpha-L-fucosyltransferase activity defined by use of synthetic oligosaccharide acceptors. Differential expression of the enzymes during human embryonic development and in adult tissues. *Carbohydr Res* 228, 265-276.
- Morikawa K, Walker SM, Jessup JM and Fidler IJ (1988a). *In vivo* selection of highly metastatic cells from surgical specimens of different primary human colon carcinomas implanted into nude mice. *Cancer Res* 48, 1943-1948.
- Morikawa K, Walker SM, Nakajima M, Pathak S, Jessup JM and Fidler IJ (1988b). Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. *Cancer Res* 48, 6863-6871.
- Morin PJ (1999). beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays* 21, 1021-1030.
- Morris VL, Schmidt EE, MacDonald IC, Groom AC and Chambers AF (1997). Sequential steps in hematogenous metastasis of cancer cells studied by *in vivo* videomicroscopy. *Invasion Metastasis* 17, 281-296.
- Nakajima M, Irimura T and Nicolson GL (1988). Heparanases and tumor metastasis. *J Cell Biochem* 36, 157-167.
- Nakajima M, Morikawa K, Fabra A, Bucana CD and Fidler IJ (1990). Influence of organ environment on extracellular matrix degradative activity and metastasis of human colon carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 82, 1890-1898.
- Nakamori S, Ota DM, Cleary KR, Shirotani K and Irimura T (1994). MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 106, 353-361.
- Nicolson GL (1988). Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochim Biophys Acta* 948, 175-224.
- Nogradi A (1998). The role of carbonic anhydrases in tumors. *Am J Pathol* 153, 1-4.
- Notterman DA, Alon U, Sierk AJ and Levine AJ (2001). Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. *Cancer Res* 61, 3124-3130.
- Paget S (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1, 99-101.
- Parle-McDermott A, McWilliam P, Tighe O, Dunican D and Croke DT (2000). Serial analysis of gene expression identifies putative metastasis-associated transcripts in colon tumour cell lines. *Br J Cancer* 83, 725-728.
- Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP and Fodor SP (1994). Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5022-5026.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-752.

Perreau J, Lilienbaum A, Vasseur M and Paulin D (1988). Nucleotide sequence of the human vimentin gene and regulation of its transcription in tissues and cultured cells. *Gene* 62, 7-16.

Pignatelli M, Smith ME and Bodmer WF (1990). Low expression of collagen receptors in moderate and poorly differentiated colorectal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 61, 636-638.

Pitcher JA, Fredericks ZL, Stone WC, Premont RT, Stoffel RH, Koch WJ and Lefkowitz RJ (1996). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. Location, structure, and regulation of the PIP₂ binding site distinguishes the GRK subfamilies. *J Biol Chem* 271, 24907-24913.

Poste G and Paruch L (1989). Stephen Paget, M.D., F.R.C.S., (1855-1926). A retrospective. *Cancer Metastasis Rev* 8, 93-97.

Pratt JM, Petty J, Riba-Garcia I, Robertson DH, Gaskell SJ, Oliver SG and Beynon RJ (2002). Dynamics of protein turnover, a missing dimension in proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1, 579-591.

Pratt WS, Crawley S, Hicks J, Ho J, Nash M, Kim YS, Gum JR and Swallow DM (2000). Multiple transcripts of MUC3: evidence for two genes, MUC3A and MUC3B. *Biochem Biophys Res Commun* 275, 916-923.

Price JT, Bonovich MT and Kohn EC (1997). The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32, 175-253.

Punt CJ, Nagy A, Douillard JY, Figer A, Skovsgaard T, Monson J, Barone C, Fountzilas G, Riess H, Moylan E, Jones D, Dethling J, Colman J, Coward L and MacGregor S (2002). Edrecolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomised study. *Lancet* 360, 671-677.

Radinsky R and Fidler IJ (1992). Regulation of tumor cell growth at organ-specific metastases. *In Vivo* 6, 325-331.

Radinsky R (1993). Paracrine growth regulation of human colon carcinoma organ-specific metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 12, 345-361.

Radinsky R, Bucana CD, Ellis LM, Sanchez R, Cleary KR, Brigati DJ and Fidler IJ (1993). A rapid colorimetric in situ messenger RNA hybridization technique for analysis of epidermal growth factor receptor in paraffin-embedded surgical specimens of human colon carcinomas. *Cancer Res* 53, 937-943.

Radinsky R, Risin, Fan, Dong, Bielenberg, Bucana and Fidler (1995). Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1, 19-31.

Radinsky R and Ellis LM (1996). Molecular determinants in the biology of liver metastasis. *Surg Oncol Clin N Am* 5, 215-229.

Raftopoulos I, Davaris P, Karatzas G, Karayannacos P and Kouraklis G (1998). Level of alpha-catenin expression in colorectal cancer correlates with invasiveness, metastatic potential, and survival. *J Surg Oncol* 68, 92-99.

Ramaswamy S and Golub TR (2002). DNA microarrays in clinical oncology. *J Clin Oncol* 20, 1932-1941.

- Ridinger K, Schafer BW, Durussel I, Cox JA and Heizmann CW (2000). S100A13. Biochemical characterization and subcellular localization in different cell lines. *J Biol Chem* 275, 8686-8694.
- Ries LA, Wingo PA, Miller DS, Howe HL, Weir HK, Rosenberg HM, Vernon SW, Cronin K and Edwards BK (2000). The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. *Cancer* 88, 2398-2424.
- Riethmuller G, Schneider-Gadicke E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, Gruber R, Pichlmaier H, Hirche H, Pichlmayr R and et al. (1994). Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group. *Lancet* 343, 1177-1183.
- Ripani E, Sacchetti A, Corda D and Alberti S (1998). Human Trop-2 is a tumor-associated calcium signal transducer. *Int J Cancer* 76, 671-676.
- Rosel M, Claas C, Seiter S, Herlevsen M and Zoller M (1998). Cloning and functional characterization of a new phosphatidyl-inositol anchored molecule of a metastasizing rat pancreatic tumor. *Oncogene* 17, 1989-2002.
- Ruoslahti E (1991). Integrins. *J Clin Invest* 87, 1-5.
- Safer D and Nachmias VT (1994). Beta thymosins as actin binding peptides. *Bioessays* 16, 473-479.
- Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, Velculescu VE, Rago C, St Croix B, Romans KE, Choti MA, Lengauer C, Kinzler KW and Vogelstein B (2001). A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science* 294, 1343-1346.
- Salim S, Sinnarajah S, Kehrl JH and Dessauer CW (2003). Identification of RGS2 and type V adenylyl cyclase interaction sites. *J Biol Chem* 278, 15842-15849.
- Sasaki CY and Passaniti A (1998). Identification of anti-invasive but noncytotoxic chemotherapeutic agents using the tetrazolium dye MTT to quantitate viable cells in Matrigel. *Biotechniques* 24, 1038-1043.
- Scheithauer W, McKendrick J, Begbie S, Borner M, Burns WI, Burris HA, Cassidy J, Jodrell D, Koralewski P, Levine EL, Marschner N, Maroun J, Garcia-Alfonso P, Tujakowski J, Van Hazel G, et al. (2003). Oral capecitabine as an alternative to i.v. 5-fluorouracil-based adjuvant therapy for colon cancer: safety results of a randomized, phase III trial. *Ann Oncol* 14, 1735-1743.
- Schena M, Shalon D, Davis RW and Brown PO (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.
- Schoen RE (2002). The case for population-based screening for colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 65-70.
- Schon MP and Orfanos CE (1995). Transformation of human keratinocytes is characterized by quantitative and qualitative alterations of the T-16 antigen (Trop-2, MOv-16). *Int J Cancer* 60, 88-92.

- Schwarte-Waldhoff I, Volpert OV, Bouck NP, Sipos B, Hahn SA, Klein-Scory S, Luttes J, Kloppel G, Graeven U, Eilert-Micus C, Hintelmann A and Schmiegel W (2000). Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9624-9629.
- Schwartzberg LS (2001). Clinical experience with edrecolomab: a monoclonal antibody therapy for colorectal carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 40, 17-24.
- Serru V, Dessen P, Boucheix C and Rubinstein E (2000). Sequence and expression of seven new tetraspans. *Biochim Biophys Acta* 1478, 159-163.
- Sharma B, Handler M, Eichstetter I, Whitelock JM, Nugent MA and Iozzo RV (1998). Antisense targeting of perlecan blocks tumor growth and angiogenesis in vivo. *J Clin Invest* 102, 1599-1608.
- Singh RK, Bucana CD, Gutman M, Fan D, Wilson MR and Fidler IJ (1994). Organ site-dependent expression of basic fibroblast growth factor in human renal cell carcinoma cells. *Am J Pathol* 145, 365-374.
- Smith C (2004). Drug target identification: a question of biology. *Nature* 428, 225-231.
- Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M and Seed B (1991). The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *Embo J* 10, 343-348.
- Stiles CD, Capone GT, Scher CD, Antoniades HN, Van Wyk JJ and Pledger WJ (1979). Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1279-1283.
- Strathdee CA, McLeod MR and Hall JR (1999). Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector. *Gene* 229, 21-29.
- Sugarbaker PH (1981). Carcinoma of the colon-prognosis and operative choice. *Curr Probl Surg* 18, 753-802.
- Takahashi K, Stamenkovic I, Cutler M, Dasgupta A and Tanabe KK (1996). Keratan sulfate modification of CD44 modulates adhesion to hyaluronate. *J Biol Chem* 271, 9490-9496.
- Takemasa I, Higuchi H, Yamamoto H, Sekimoto M, Tomita N, Nakamori S, Matoba R, Monden M and Matsubara K (2001). Construction of preferential cDNA microarray specialized for human colorectal carcinoma: molecular sketch of colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 285, 1244-1249.
- Tanabe KK, Ellis LM and Saya H (1993). Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases. *Lancet* 341, 725-726.
- Taniguchi A, Suga R and Matsumoto K (2000). Expression and transcriptional regulation of the human alpha1, 3-fucosyltransferase 4 (FUT4) gene in myeloid and colon adenocarcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 370-376.
- Tarbe N, Losch S, Burtscher H, Jarsch M and Weidle UH (2002). Identification of rat pancreatic carcinoma genes associated with lymphogenous metastasis. *Anticancer Res* 22, 2015-2027.

Tarbe NG, Rio MC and Weidle UH (2004). SMAGP, a new small trans-membrane glycoprotein altered in cancer. *Oncogene* 23, 3395-3403.

Tarin D, Price JE, Kettlewell MG, Souter RG, Vass AC and Crossley B (1984). Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous shunts. *Cancer Res* 44, 3584-3592.

Taub DD (2000). Modified microchemotaxis assays. *Methods Mol Biol* 138, 105-112.

Tetsu O and McCormick F (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426.

Thiery JP (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-454.

Tibbetts LM, Doremus CM, Tzanakakis GN and Vezeridis MP (1993). Liver metastases with 10 human colon carcinoma cell lines in nude mice and association with carcinoembryonic antigen production. *Cancer* 71, 315-321.

Timar J, Ladanyi A, Lapis K and Moczar M (1992). Differential expression of proteoglycans on the surface of human melanoma cells characterized by altered experimental metastatic potential. *Am J Pathol* 141, 467-474.

Tjoelker LW, Seyfried CE, Eddy RL, Jr., Byers MG, Shows TB, Calderon J, Schreiber RB and Gray PW (1994). Human, mouse, and rat calnexin cDNA cloning: identification of potential calcium binding motifs and gene localization to human chromosome 5. *Biochemistry* 33, 3229-3236.

Tsujikawa M, Kurahashi H, Tanaka T, Nishida K, Shimomura Y, Tano Y and Nakamura Y (1999). Identification of the gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Nat Genet* 21, 420-423.

Tsutsui J, Kadomatsu K, Matsubara S, Nakagawara A, Hamanoue M, Takao S, Shimazu H, Ohi Y and Muramatsu T (1993). A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: increased midkine expression in Wilms' tumor and other human carcinomas. *Cancer Res* 53, 1281-1285.

Tureci O, Sahin U, Vollmar E, Siemer S, Gottert E, Seitz G, Parkkila AK, Shah GN, Grubb JH, Pfreundschuh M and Sly WS (1998). Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7608-7613.

van der Geer P, Hunter T and Lindberg RA (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 10, 251-337.

Vande Weghe JG and Ow DW (1999). A fission yeast gene for mitochondrial sulfide oxidation. *J Biol Chem* 274, 13250-13257.

Varner JA and Cheresch DA (1996). Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 8, 724-730.

Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, Lash AE, Yu J, Rago C, Lal A, Wang CJ, Beaudry GA, Ciriello KM, Cook BP, Dufault MR, Ferguson AT, Gao Y, He TC, *et al.* (1999). Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* 23, 387-388.

- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B and Kinzler KW (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* 270, 484-487.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
- Veres G, Gibbs RA, Scherer SE and Caskey CT (1987). The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science* 237, 415-417.
- Vigny M, Ollier-Hartmann MP, Lavigne M, Fayein N, Jeanny JC, Laurent M and Courtois Y (1988). Specific binding of basic fibroblast growth factor to basement membrane-like structures and to purified heparan sulfate proteoglycan of the EHS tumor. *J Cell Physiol* 137, 321-328.
- Virtanen I, Lehto VP, Lehtonen E, Vartio T, Stenman S, Kurki P, Wager O, Small JV, Dahl D and Badley RA (1981). Expression of intermediate filaments in cultured cells. *J Cell Sci* 50, 45-63.
- Wagner HE, Toth CA, Steele GD, Jr. and Thomas P (1992). Metastatic potential of human colon cancer cell lines: relationship to cellular differentiation and carcinoembryonic antigen production. *Clin Exp Metastasis* 10, 25-31.
- Wang HL, Wang J, Xiao SY, Haydon R, Stoiber D, He TC, Bissonnette M and Hart J (2002). Elevated protein expression of cyclin D1 and Fra-1 but decreased expression of c-Myc in human colorectal adenocarcinomas overexpressing beta-catenin. *Int J Cancer* 101, 301-310.
- Wang WS, Chen PM, Hsiao HL, Ju SY and Su Y (2003). Overexpression of the thymosin beta-4 gene is associated with malignant progression of SW480 colon cancer cells. *Oncogene* 22, 3297-3306.
- Wang Y, Jatkoe T, Zhang Y, Mutch MG, Talantov D, Jiang J, McLeod HL and Atkins D (2004). Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J Clin Oncol* 22, 1564-1571.
- Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA and Ferrara N (1995). Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 95, 1789-1797.
- Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ and Cantor H (1996). Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* 271, 509-512.
- Weidle UH, Wollisch E, Ronne E, Ploug M, Behrendt N, de Vries TJ, Quax PH, Verheijen JH, van Muijen GN, Ruiten DJ and *et al.* (1994). Studies on functional and structural role of urokinase receptor and other components of the plasminogen activation system in malignancy. *Ann Biol Clin (Paris)* 52, 775-782.
- Weidner N (1995). Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 147, 9-19.
- Weir HK, Thun MJ, Hankey BF, Ries LA, Howe HL, Wingo PA, Jemal A, Ward E, Anderson RN and Edwards BK (2003). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. *J Natl Cancer Inst* 95, 1276-1299.

- Weiss L, Grundmann E, Torhorst J, Hartveit F, Moberg I, Eder M, Fenoglio-Preiser CM, Napier J, Horne CH, Lopez MJ and et al. (1986). Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J Pathol* **150**, 195-203.
- Weston BW, Hiller KM, Mayben JP, Manousos GA, Bendt KM, Liu R and Cusack JC, Jr. (1999). Expression of human alpha(1,3)fucosyltransferase antisense sequences inhibits selectin-mediated adhesion and liver metastasis of colon carcinoma cells. *Cancer Res* **59**, 2127-2135.
- Willett CG, Tepper JE, Cohen AM, Orlow E and Welch CE (1984). Failure patterns following curative resection of colonic carcinoma. *Ann Surg* **200**, 685-690.
- Williams SJ, Munster DJ, Quin RJ, Gotley DC and McGuckin MA (1999). The MUC3 gene encodes a transmembrane mucin and is alternatively spliced. *Biochem Biophys Res Commun* **261**, 83-89.
- Wodicka L, Dong H, Mittmann M, Ho MH and Lockhart DJ (1997). Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* **15**, 1359-1367.
- Wolenski JS (1995). Regulation of calmodulin-binding myosins. *Trends Cell Biol* **5**, 310-316.
- Woodhouse EC, Chuaqui RF and Liotta LA (1997). General mechanisms of metastasis. *Cancer* **80**, 1529-1537.
- Worby CA and Dixon JE (2002). Sorting out the cellular functions of sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 919-931.
- Xiang Z, Yang Y, Ma X and Ding W (2003). Microarray expression profiling: analysis and applications. *Curr Opin Drug Discov Devel* **6**, 384-395.
- Xu B, English JM, Wilsbacher JL, Stippec S, Goldsmith EJ and Cobb MH (2000). WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in sub-domain II. *J Biol Chem* **275**, 16795-16801.
- Yamada N, Chung YS, Maeda K, Sawada T, Ikehara T, Nishino H, Okuno M and Sowa M (1995). Increased expression of sialyl Lewis A and sialyl Lewis X in liver metastases of human colorectal carcinoma. *Invasion Metastasis* **15**, 95-102.
- Yang CL, Angell J, Mitchell R and Ellison DH (2003). WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport. *J Clin Invest* **111**, 1039-1045.
- Yu FX, Sun HQ, Janmey PA and Yin HL (1992). Identification of a polyphosphoinositide-binding sequence in an actin monomer-binding domain of gelsolin. *J Biol Chem* **267**, 14616-14621.
- Zarrilli R, Bruni CB and Riccio A (1994). Multiple levels of control of insulin-like growth factor gene expression. *Mol Cell Endocrinol* **101**, R1-14.
- Zinn K, DiMaio D and Maniatis T (1983). Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human beta-interferon gene. *Cell* **34**, 865-879.

7 Abkürzungen

5-FU	5-Fluorouracil
Å	Angstrom
Abb.	Abbildung
ACTB	„Actin Beta“, β -Aktin
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
AvgDiff	„Average Difference“
BCA	Bicinchonsäure
Betain	N, N, N-trimethylglycine
BGH	„Bovine Growth Hormone“
BM	Basalmembran
BSA	„Bovine Serum Albumine“, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CANX	Calnexin
CEACAM5 (CEA)	„Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 5“
CF	„Change Factor“
CFQ	„Change Factor Quality“
CMV	Cytomegalovirus
CRC	„Colorectal Carcinoma“, Kolorektales Karzinom
CY3	Carbocyanin 3
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DDRT-PCR	„Differential Display“-RT-PCR
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“
Ep-CAM	„Epithelial Cellular Adhesion Molecule“
EST	„Expressed Sequence Tag“, Exprimierte Sequenzmarkierte Stellen
<i>et al.</i>	und andere
EZM	Extrazelluläre Matrix
FA	Formaldehyd
FACS	„Fluorescence Activated Cell Sorting“, Durchflußzytometrie
FITC	Fluoreszin-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
G1-Phase	„Gap“-Phase 1
GAPD(H)	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GFP	„Green Fluorescence Protein“
HE	Hämatoxylin-Eosin
HG	„Human Genome“
HSV	Herpes Simplex Virus
Hygro	Hygromycin
IVT	<i>in vitro</i> -Transkription
kD	Kilodalton

LB	Luria-Bertani
LDS	Lithiumdodecylsulfat
Maldi-TOF/TOF	Matrix assistierte Laser-Desorptions-/Ionisations-, „Time-of-Flight“-Massenspektrometrie
MEM	„Minimum Essential-Medium“
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MTE	„Multiple Tissue Expression“
MTT	3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid
n.b.	nicht bekannt
neo	Neomycinphosphotransferase
OD	Optische Dichte
ORF	„Open Reading Frame“, Offener Leserahmen
OT	Objektträger
p.A.	zur Analyse
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POD	Peroxidase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SAGE	Serielle Analyse der Genexpression
SCC	„Squamous Cell Carcinoma“, Plattenepithelkarzinome
SNPs	„Single Nucleotide“-Polymorphismen
S-Phase	DNA-Synthesephase
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitratpuffer
SSH	„Supression Subtractive“-Hybridisierung
SSPE	Natriumchlorid-Natriumdihydrogenphosphat-EDTA-Puffer
SV40	Simianvirus 40
TACSTD2 (Trop-2)	„Tumor-associated Calcium Signal Transducer 2“
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UBB	Ubiquitin B
uPA	Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp
UTR	Untranslatierte Region
V.	„Vena“, Vene
v/v	Volumen pro Volumenanteil
VIM	Vimentin
Vv.	„Venae“, Venen
w/v	Gewicht pro Volumenanteil
x g	vielfaches der Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m x s}^{-2}$)
z.B.	zum Beispiel

8 Anhang

Vektorkarte des Expressionsvektors für Trop-2

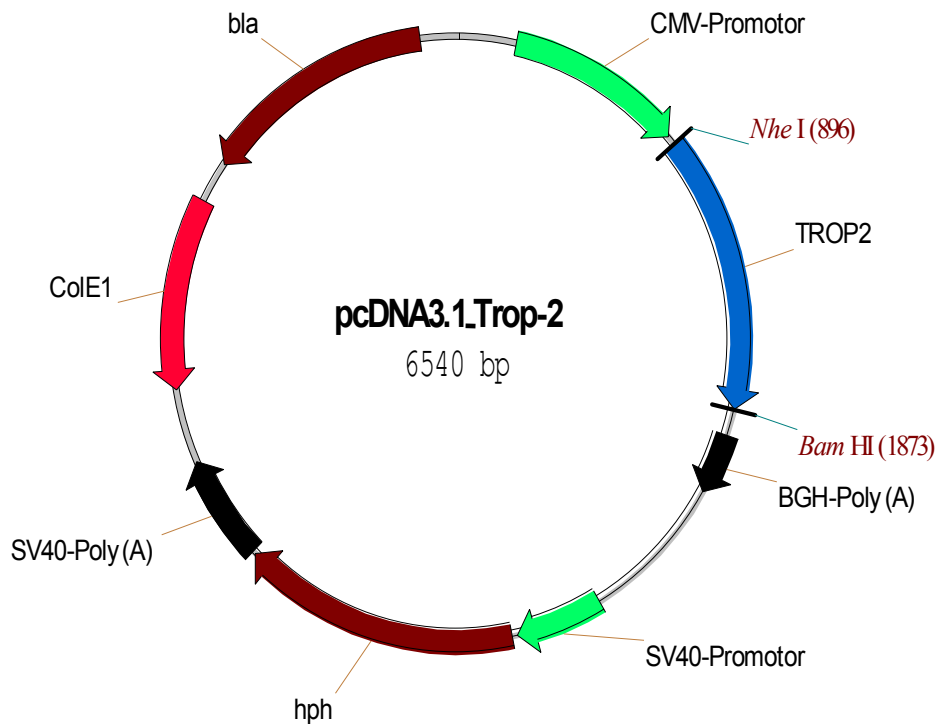


Abbildung 8.1: Vektorkarte von pcDNA3.1_Trop-2.

Der verwendete Vektor pcDNA3.1/Hygro (+) basiert auf einem Plasmid-Rückgrat mit dem colE1-Replikationsursprung und dem β -Laktamase-Gen (*bla*) für die Ampicillinresistenz. Zusätzlich enthält der Vektor einen Selektionsmarker für die Resistenz gegen Hygromycin B (*hph*). Die Expressionskassette des Vektors besteht aus einer multiplen Klonierungssequenz, einem CMV-Promotor und einer BGH-Poly(A)-Sequenz. Die Trop-2-cDNA wurde mit den Primern Trop-2_ *Nhe* I_for und Trop-2_ *Bam* HI_rev amplifiziert und das *Nhe*I/*Bam* HI-Fragment mit dem entsprechend geschnittenen Vektor pcDNA3.1/Hygro (+) ligiert (Schnittstellen sind eingezeichnet). Die Sequenz und Lage der Vektorelemente sind von der Internetseite des Herstellers übernommen, die Vektorkarte wurde mit dem Programm Vector NTI 8 der Firma InforMax (Frederick, MD, USA) gezeichnet.

Sequenz der Expressionskassette von Trop-2

Die Sequenz des Vektors ist von der Internetseite des Herstellers übernommen. Die cDNA für Trop-2 wurde mit den Primern Trop-2_*Nhe* I_for und Trop-2_*Bam* HI_rev amplifiziert und das *Nhe*I/*Bam* HI-Fragment mit dem entsprechend geschnittenen Vektor pcDNA3.1/Hygro (+) ligiert. Die Position der zwei Schnittstellen ist angegeben. Die Sequenz der kodierenden Region für *TROP2*, sowie die korrekte Insertion in den Vektor wurde verifiziert.

1	GACGGATCGG	GAGATCTCCC	GATCCCCTAT	GGTGCACCTCT	CAGTACAATC
	CTGCCTAGCC	CTCTAGAGGG	CTAGGGGATA	CCACGTGAGA	GTCATGTTAG
51	TGCTCTGATG	CCGCATAGTT	AAGCCAGTAT	CTGCTCCCTG	CTTGTGTGTT
	ACGAGACTAC	GGCGTATCAA	TTCGGTCATA	GACGAGGGAC	GAACACACAA
101	GGAGGTCGCT	GAGTAGTGCG	CGAGCAAAAT	TTAAGCTACA	ACAAGGCAAG
	CCTCCAGCGA	CTCATCACGC	GCTCGTTTTA	AATTCGATGT	TGTTCCGTTT
151	GCTTGACCGA	CAATTGCATG	AAGAATCTGC	TTAGGGTTAG	GCGTTTTGCG
	CGAACTGGCT	GTTAACGTAC	TTCTTAGACG	AATCCCAATC	CGCAAAACGC
	CMV-Promotor				
201	CTGCTTCGCG	ATGTACGGGC	CAGATATACG	CGTTGACATT	GATTATTGAC
	GACGAAGCGC	TACATGCCCG	GTCTATATGC	GCAACTGTAA	CTAATAACTG
	CMV-Promotor				
251	TAGTTATTAA	TAGTAATCAA	TTACGGGGTTC	ATTAGTTCAT	AGCCCATATA
	ATCAATAAATT	ATCATTAGTT	AATGCCCCAG	TAATCAAGTA	TCGGGTATAT
	CMV-Promotor				
301	TGGAGTTCCG	CGTTACATAA	CTTACGGTAA	ATGGCCCGCC	TGGCTGACCG
	ACCTCAAGGC	GCAATGTATT	GAATGCCATT	TACCGGGCGG	ACCGACTGGC
	CMV-Promotor				
351	CCCAACGACC	CCCGCCCAT	GACGTCAATA	ATGACGTATG	TTCCCATAGT
	GGGTTGCTGG	GGGCGGGTAA	CTGCAGTTAT	TACTGCATAC	AAGGGTATCA
	CMV-Promotor				
401	AACGCCAATA	GGGACTTTCC	ATTGACGTCA	ATGGGTGGAG	TATTTACGGT
	TTGCGGTTAT	CCCTGAAAGG	TAAGTGCAGT	TACCCACCTC	ATAAATGCCA
	CMV-Promotor				
451	AAACTGCCCA	CTTGGCAGTA	CATCAAGTGT	ATCATATGCC	AAGTACGCCC
	TTTGACGGGT	GAACCGTCAT	GTAGTTCACA	TAGTATACGG	TTCATGCGGG
	CMV-Promotor				
501	CCTATTGACG	TCAATGACGG	TAAATGGCCC	GCCTGGCATT	ATGCCAGTA
	GGATAAAGTC	AGTTACTGCC	ATTTACCGGG	CGGACCGTAA	TACGGGTTCAT
	CMV-Promotor				
551	CATGACCTTA	TGGGACTTTC	CTACTTGGCA	GTACATCTAC	GTATTAGTCA
	GTAAGTGAAT	ACCCTGAAAG	GATGAACCGT	CATGTAGATG	CATAATCAGT
	CMV-Promotor				
601	TCGCTATTAC	CATGGTGATG	CGGTTTTGGC	AGTACATCAA	TGGGCGTGGA
	AGCGATAAATG	GTACCACTAC	GCCAAAACCG	TCATGTAGTT	ACCCGCACCT
	CMV-Promotor				
651	TAGCGGTTTG	ACTCACGGGG	ATTTCCAAGT	CTCCACCCCA	TTGACGTCAA
	ATCGCCAAAC	TGAGTGCCCC	TAAAGGTTCA	GAGGTGGGGT	AACTGCAGTT
	CMV-Promotor				
701	TGGGAGTTTG	TTTTGGCACC	AAAATCAACG	GGACTTTCCA	AAATGTCGTA
	ACCCTCAAAC	AAAACCGTGG	TTTTAGTTGC	CCTGAAAGGT	TTTACAGCAT
	CMV-Promotor				
751	ACAAGTCCGC	CCCATTGACG	CAAATGGGCG	GTAGGCGTGT	ACGGTGGGAG
	TGTTGAGGCG	GGGTAAGTGC	GTTTACCCGC	CATCCGCACA	TGCCACCCCT

	CMV-Promotor				
801	GTCTATATAA	GCAGAGCTCT	CTGGCTAACT	AGAGAACCCA	CTGCTTACTG
	CAGATATATT	CGTCTCGAGA	GACCGATTGA	TCTCTTGGGT	GACGAATGAC
	CMV-Promotor				
851	GCTTATCGAA	ATTAATACGA	CTCACTATAG	GGAGACCCAA	GCTGGCTAGC
	CGAATAGCTT	TAATTATGCT	GAGTGATATC	CCTCTGGGTT	CGACCGATCG
	TROP2				
901	ATGGCTCGGG	GCCCCGGCCT	CGCGCCGCCA	CCGCTGCGGC	TGCCGCTGCT
	TACCGAGCCC	CGGGGCCGGA	GCGCGGCGGT	GGCGACGCCG	ACGGCGACGA
	TROP2				
951	GCTGCTGGTG	CTGGCGGCGG	TGACCGGCCA	CACGGCCGCG	CAGGACAAC
	CGACGACCAC	GACCGCCGCC	ACTGGCCGGT	GTGCCGGCGC	GTCCTGTTGA
	TROP2				
1001	GCACGTGTCC	CACCAACAAG	ATGACCGTGT	GCAGCCCCGA	CGGCCCCGGC
	CGTGACACAG	GTGGTTGTTC	TACTGGCACA	CGTCGGGGCT	GCCGGGGCCG
	TROP2				
1051	GGCCGCTGCC	AGTGCCGCGC	GCTGGGCTCG	GGCATGGCGG	TCGACTGCTC
	CCGGCGACGG	TCACGGCGCG	CGACCCGAGC	CCGTACCGCC	AGCTGACGAG
	TROP2				
1101	CACGCTGACC	TCCAAGTGTC	TGCTGCTCAA	GGCGCGCATG	AGCGCCCCCA
	GTGCGACTGG	AGGTTACACAG	ACGACGAGTT	CCGCGCGTAC	TCGCGGGGGT
	TROP2				
1151	AGAACGCCCC	CACGCTGGTG	CGGCCGAGTG	AGCACGCGCT	CGTGGACAAC
	TCTTGCGGGC	GTGCGACCAC	GCCGGCTCAC	TCGTGCGCGA	GCACCTGTTG
	TROP2				
1201	GATGGCCTCT	ACGACCCCGA	CTGCGACCCC	GAGGGCCGCT	TCAAGGCGCG
	CTACCGGAGA	TGCTGGGGCT	GACGCTGGGG	CTCCCGGCGA	AGTTCCGCGC
	TROP2				
1251	CCAGTGCAAC	CAGACGTCGG	TGTGCTGGTG	CGTGAACCTCG	GTGGGCGTGC
	GGTCACGTTG	GTCTGCAGCC	ACACGACCAC	GCACTTGAGC	CACCCGCACG
	TROP2				
1301	GCCGCACGGA	CAAGGGCGAC	CTGAGCCTAC	GCTGCGATGA	GCTGGTGCGC
	CGGCGTGCCT	GTTCCCGCTG	GACTCGGATG	CGACGCTACT	CGACCACGCG
	TROP2				
1351	ACCCACCACA	TCCTCATTGA	CCTGCGCCAC	CGCCCCACCG	CCGGCGCCTT
	TGGGTGGTGT	AGGAGTAACT	GGACGCGGTG	GCGGGGTGGC	GGCCGCGGAA
	TROP2				
1401	CAACCACTCA	GACCTGGACG	CCGAGCTGAG	GCGGCTCTTC	CGCGAGCGCT
	GTTGGTGAGT	CTGGACCTGC	GGCTCGACTC	CGCCGAGAAG	GCGCTCGCGA
	TROP2				
1451	ATCGGCTGCA	CCCCAAGTTC	GTGGCGGCCG	TGCACTACGA	GCAGCCCACC
	TAGCCGACGT	GGGGTTC AAG	CACCGCCGGC	ACGTGATGCT	CGTCGGGTGG

	TROP2				
1501	ATCCAGATCG	AGCTGCGGCA	GAACACGTCT	CAGAAGGCCG	CCGGTGAAGT
	TAGGTCTAGC	TCGACGCCGT	CTTGTGCAGA	GTCTTCCGGC	GGCCACTTCA
	TROP2				
1551	GGATATCGGC	GATGCCGCCT	ACTACTTCGA	GAGGGACATC	AAGGGCGAGT
	CCTATAGCCG	CTACGGCGGA	TGATGAAAGCT	CTCCCTGTAG	TTCCCGCTCA
	TROP2				
1601	CTCTATTCCA	GGGCCGCGGC	GGCCTGGACT	TGCGCGTGCG	CGGAGAACCC
	GAGATAAGGT	CCCGGCGCCG	CCGGACCTGA	ACGCGCACGC	GCCTCTTGGG
	TROP2				
1651	CTGCAGGTGG	AGCGCACGCT	CATCTATTAC	CTGGACGAGA	TTCCCCGGAA
	GACGTCCACC	TCGCGTGCGA	GTAGATAATG	GACCTGCTCT	AAGGGGGCTT
	TROP2				
1701	GTTCTCCATG	AAGCGCCTCA	CCGCCGGCCT	CATCGCCGTC	ATCGTGGTGG
	CAAGAGGTAC	TTCGCGGAGT	GGCGGCCGGA	GTAGCGGCAG	TAGCACCACC
	TROP2				
1751	TCGTGGTGGC	CCTCGTCGCC	GGCATGGCCG	TCCTGGTGTGAT	CACCAACCGG
	AGCACCACCG	GGAGCAGCGG	CCGTACCGGC	AGGACCACTA	GTGGTTGGCC
	TROP2				
1801	AGAAAGTCGG	GGAAGTACAA	GAAGGTGGAG	ATCAAGGAAC	TGGGGGAGTT
	TCTTTCAGCC	CCTTCATGTT	CTTCCACCTC	TAGTTCCTTG	ACCCCTCAA
	TROP2		BamHI		
1851	GAGAAAGGAA	CCGAGCTTGT	AGGATCCACT	AGTCCAGTGT	GGTGGAAATTC
	CTCTTTCCTT	GGCTCGAACA	TCCTAGGTGA	TCAGGTCACA	CCACCTTAAG
1901	TGCAGATATC	CAGCACAGTG	GCGGCCGCTC	GAGTCTAGAG	GGCCCGTTTA
	ACGTCTATAG	GTCGTGTCAC	CGCCGGCGAG	CTCAGATCTC	CCGGGCAAAT
	BGH-Poly(A)				
1951	AACCCGCTGA	TCAGCCTCGA	CTGTGCCTTC	TAGTTGCCAG	CCATCTGTTG
	TTGGGCGACT	AGTCGGAGCT	GACACGGAAAG	ATCAACGGTC	GGTAGACAAC
	BGH-Poly(A)				
2001	TTTGCCCTC	CCCCGTGCCT	TCCTTGACCC	TGGAAGGTGC	CACTCCCACT
	AAACGGGGAG	GGGGCACGGA	AGGAACTGGG	ACCTTCCACG	GTGAGGGTGA
	BGH-Poly(A)				
2051	GTCCTTTCCT	AATAAAATGA	GGAAATTGCA	TCGCATTGTC	TGAGTAGGTG
	CAGGAAAGGA	TTATTTTACT	CCTTTAACGT	AGCGTAAACAG	ACTCATCCAC
	BGH-Poly(A)				
2101	TCATTCTATT	CTGGGGGGTG	GGGTGGGGCA	GGACAGCAAG	GGGGAGGATT
	AGTAAGATAA	GACCCCCCAC	CCCACCCCGT	CCTGTCGTTC	CCCCTCCTAA
	BGH-Poly(A)				
2151	GGGAAGACAA	TAGCAGGCAT	GCTGGGGATG	CGGTGGGCTC	TATGGCTTCT
	CCCTTCTGTT	ATCGTCCGTA	CGACCCCTAC	GCCACCCGAG	ATACCGAAGA

Danksagung

Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß danke ich für die Erstellung des Erstgutachtens, für ihr reges Interesse an der Arbeit und für kritische Diskussionen.

Bei Herrn Prof. Dr. John Parsch möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulrich Weidle für die interessante Aufgabenstellung. Vor allem möchte ich mich für seine ständige Diskussionsbereitschaft bedanken, insbesondere bei der unermüdlichen „Targetsuche“ innerhalb von unzähligen Genlisten.

Bei Herrn Prof. Dr. Saverio Alberti möchte ich mich für den regen E-Mail-Austausch (Tag und Nacht!) bedanken und für die vielen wertvollen Tipps rund um Trop-2, die so manchen „hoffnungslosen“ Versuch letztendlich doch noch möglich machten.

Vielen Dank an die gesamte Affymetrix- und IT-Abteilung. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. Helmut Burtscher für die fachliche Unterstützung bei allen Fragen rund um die Genchips und die zahlreichen Lehrstunden beim Squash bedanken. Bei Dr. J. Auer, Dr. S. Klostermann, Dr. T. Heinemeyer, Dr. H. Schindler, Dr. U. Brehm und vor allem bei Ute Bär bedanke ich mich für die wertvollen Hilfestellungen bei der Arbeit mit den Genchips, die ich nur zu gerne in Anspruch genommen habe.

Ein großes Dankeschön geht an E. Herzmann, D. Oguntke, G. Jobs und an G. Dietmann für die geduldige Unterstützung und permanente Hilfsbereitschaft bei allen Fragestellungen rund um die Zellkultur, FACS-Analyse und Immunhistochemie.

Ein herzlicher Dank geht an Marina Schwirzke, ich könnte mir ein Leben bei „Roche“ ohne sie gar nicht mehr vorstellen. Nicht zu vergessen meine „neuen Arbeitskollegen“ S. Gegner, A. Kaczmarek, U. Schwarz und Dr. O. Plöttner für Ihre geduldige Einführung in die Welt der Antikörper und therapeutische Proteine und insbesondere bei Herrn Dr. Erhard Kopetzki und Frau Dr. Anne Stern für das in mich gesetzte Vertrauen.

Für den engen Zusammenhalt, Freundschaft, gegenseitige Motivation und ein außergewöhnlich nettes Klima auch in schwierigeren Zeiten möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden Dirk Demuth, Dr. Kirsten Dettmar, Nicole Euer, Dr. Vesna Evtimova, Dr. Andrea Gnirke, Dr. Thorsten Gutjahr, Dr. Tobias Hildebrandt, Marion Hirt, Dr. Christian Klein, Sonia Krauss, Dr. Tanja Ligensa, Dr. Robert Macek, Josef Preiherr, Dr. Tanja Schneider, Michael Schräml, Dr. Nesrine Tarbé und Dr. Malte Weber bedanken. Vielen Dank für viele private aber auch fachliche Gespräche in kleiner oder größerer Runde, die mir sehr geholfen haben. Zudem möchte ich mich bei allen für die unterhaltsamen Wettrunden bei sämtlichen Fußballmeisterschaften bedanken.

Bei Claudia Nickel, Nicole Euer und Frank Schneider möchte ich mich herzlich für das kritische Lesen meines Manuskripts und dem beseitigen vieler „Fehlerteufel“ bedanken.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir durch sämtliche Höhen und Tiefen immer zur Seite standen und mir geholfen haben, meinen eigenen Weg zu gehen.

Zu guter Letzt gilt mein herzlicher Dank meiner Frau Magdalena, die mit mir den langen Weg ausgehend vom Keller des Botanischen Instituts gegangen ist und mir stets ein großer Rückhalt war. Und obwohl sie mich zeitweise kaum gesehen hat, trotzdem zwischendurch geheiratet hat.

Danke!

Eidesstattliche Erklärung

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

München, den 10. Dezember 2004

Lebenslauf

Zur Person

Robert de Lange
geboren am 26.04.1967 in Köln
verheiratet

Schulbildung

1984 Mittlere Reife an der Gerhart-Hauptmann-Realschule, Leonberg
1984 – 1987 Besuch der gewerblichen Berufsschule in der Fachklasse Lacklaborant, Stuttgart
1988 – 1990 Erlangen der allgemeinen Hochschulreife an der Technischen Oberschule, Stuttgart

Berufliche Ausbildung

1984 – 1988 Ausbildung zum Lacklaboranten bei der Akzo Coatings GmbH in Stuttgart mit Abschluss vor der Industrie und Handelskammer

Hochschulausbildung

1990 – 1993 Studium der Chemie an der Technischen Universität, München
1993 – 1999 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
1998 - 1999 Diplomarbeit am Lehrstuhl I des Botanischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität in München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. R. G. Herrmann
Thema der Diplomarbeit: „Cytogenetische und molekularbiologische Untersuchungen an hexaploiden Triticale“
23.11.1999 Erlangen des akademischen Grades: Diplom-Biologe Univ.
02.2000 - 04.2004 Dissertation an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München
Durchführung der praktischen Arbeiten bei der Roche Diagnostics GmbH in Penzberg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. U. H. Weidle
seit Mai 2004 Postdoktorand am Forschungszentrum der Roche Diagnostics GmbH in Penzberg