Identifizierung und Charakterisierung von Tumorprogressionsgenen in einem Pankreastumor-Modellsystem

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

vorgelegt von

Stephanie M. Lösch
aus Hanhofen

Department Biologie II, Anthropologie und Humangenetik der LMU München

2004

Diese Arbeit wurde am Forschungszentrum Penzberg der Roche Diagnostics GmbH, Penzberg durchgeführt.

Eingereicht am: 12. Juli 2004

Erstgutachter: Prof. Dr. E. H. Weiß

Zweitgutachter: PD Dr. B. Kempkes

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Oktober 2004

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Einleitung 1

1. Das Pankreaskarzinom 1

1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren des Pankreaskarzinoms 1

1.2 Symptomatik und Diagnostik des Pankreaskarzinoms 2

1.3 Therapie des Pankreaskarzinoms 2

1.4 Metastasierung beim Pankreaskarzinom 3

1.4.1 Zellbiologische Aspekte 3

1.4.2 Adhäsionsmoleküle 3

1.5 Molekulare Genetik des Pankreaskarzinoms 5

1.6 Tumorbiologie des Pankreaskarzinoms 7

2. Das humane Pankreastumor-Modellsystem SUIT-2 007 und SUIT-2 028 8

3. Die Microarray-Technologie 9

3.1 Anwendung der Affymetrix GeneChip® Array Technologie für die Suche nach neuen metastasierungs- und invasionsassoziierten Genen des Pankreaskarzinoms 10

4. Aufgabenstellung 12

Material und Methoden 13

1. Material 13

1.1 Chemikalien und biochemische Reagenzien 13

1.2 Puffer 14

1.3 Geräte 15

1.4 Fertige Lösungen und Reaktionssysteme 15

1.5 Oligonukleotide 16

1.6 Klone 18

1.7 Medien für das Screening einer cDNS-Bibliothek 18

1.8 Plasmide und cDNS-Bibliothek 18

1.9 Antikörper 19

1.10 Bakterienstämme 19

1.11 Bakterienmedien 19

1.12 Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen 19

1.13 Zelllinienen und Zellen 20

1.14 Gewebe 21

2. Methoden 24
2.1 Molekularbiologische Methoden 24
2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNS 24
2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 24
2.1.3 RT-PCR 24
2.1.4 TaqMan®-PCR 25
2.1.5 Quantitative Echtzeit-PCR mittels LightCycler™ 26
2.1.6 5´-RACE-PCR 26
2.1.7 Klonierung von cDNS in Plasmide 27
2.1.8 Affymetrix GeneChip® 30
2.1.8.1 Das Prinzip der Microarrays 30
2.1.8.2 Genexpressionsanalyse mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie 31
2.1.8.3 Gesamt-RNS-Präparation 32
2.1.8.4 Array-Hybridisierung und Scannen des Oligonukleotid-Chips 33
2.1.8.5 Auswertung der Affymetrix®-Daten 33
2.1.9 Isolierung von cDNS-Klonen aus einer cDNS-Bank 34
2.1.10 Analyse mit DIG-markierten Sonden 35
2.1.11 Northern-Blot-Analyse 35
2.1.12 Genexpressionsanalysen mittels kommerzieller Blots 36
2.2 Proteinchemische Methoden 36
2.2.1 Gesamtproteinextraktion aus Zellen 36
2.2.2 Bestimmung des Proteingehaltes von Zelllysaten 37
2.2.3 Western-Blot-Analyse 37
2.3 Zellbiologische Methoden 38
2.3.1 Zellkulturführung 38
2.3.2 Ermittlung der für die Selektion notwendigen Hygromycin-Konzentration 38
2.3.3 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen mittels Lipofectamin2000 38
2.3.4 Herstellung stabil transfizierter SUIT-2 028-tet-on-Klone 39
2.3.5 Proliferationstest 39
2.3.6 Bestimmung der Generationszeiten 40
2.3.7 Transwell-Migrationstest 40
2.3.8 Matrigel-Invasionstest 41
2.3.9 Adhäsionstest 42
2.3.10 Poly-HEMA-Assay 43
2.3.11 Durchflusszytometrie 43
2.3.12 Immunfluoreszenz 43

2.4 Immunhistochemische Analyse 44
2.4.1 Herstellung artifizieller Gewebeschnitte für die histochemische Auswertung ...44
2.4.2 H & E Färbung 44
2.4.3 Immunhistochemischer Nachweis 45

Ergebnisse 46

1. Erstellung eines Transkriptionsprofils bekannter Gene für das Zellsystem SUIT-2 007 und SUIT-2 028 mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie 46
1.1 Bestätigung der Microarray-Ergebnisse mittels Northern-Blot-Analyse 48
1.2 Die mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie identifizierten neuen Gene B1i (*UKW*) und B9d (*LKW*) 51
2. Isolierung der vollständigen cDNS von *LKW* mittels 5´-RACE-PCR 55
2.1 Klonierung von *LKW*-ORF mittels RT-PCR 57
2.2 Beschreibung der dual-spezifischen Kinase LKW 57
2.3 Exon-Intron-Organisation von *LKW* 59
3. Expressionsstudien zu *LKW* 60
3.1 Expressionsstudien zu *LKW* in humanen Dickdarmkrebszelllinien 60
3.2 mRNS-Expression von *LKW* in humanen Brustkrebszelllinien 61
3.3 Expression von *LKW*-mRNS in humanen Geweben 63
3.4 ‚Cancer Profiling Array' 65
3.5 Expression von Gen *LKW* in humanen kolorektalen Karzinomen 67
3.6 Expression von *LKW* in humanen normalen Pankreasgeweben, chronischen Pankreatitiden und Pankreastumorgeweben 69
4. Isolierung von *UKW* mittels Screening einer humanen cDNS-Bibliothek 71
4.1 Klonierung von *UKW*-ORF mittels RT-PCR 72
4.2 Charakterisierung des transmembranständigen Proteins UKW 73
4.3 Exon-Intron-Organisation und Chromosomlokalisation des Gens *UKW* 77
5. Expressionsstudien zu *UKW* 79
5.1 mRNS-Expression von *UKW* in humanen Zelllinien 79
5.2 Expression von *UKW*-mRNS in humanen Geweben 80
5.3 ‚Cancer Profiling Array' 82
5.4 Expression von *UKW* in humanen normalen Pankreasgeweben, chronischen Pankreatitiden und Pankreastumorgeweben 84
6. Spezifischer Nachweis des UKW-Proteins 86
6.1 Gewinnung polyklonaler anti-UKW-Antiseren 86
6.2 UKW-Expression in SUIT-2 007- und SUIT-2 028-Lysaten mittels Western-Blot 86
7. Zellbiologische Untersuchungen zu *UKW* 88

7.1 Klonierung von *UKW* in den eukaryontischen Expressionsvektor pEGFP-N3.....88
7.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz.....88
7.3 Lokalisation von UKW in transient transfizierten SUIT-2 007- und SUIT-2 028-Zellen mittels Immunfluoreszenz.....91
7.4 Doxycyclin-induzierbare Expression von *UKW* in SUIT-2 028-Zellen.....93
7.4.1 Klonierung von *UKW* in den eukaryontischen Expressionsvektor pBIG2i.....93
7.4.2 Stabile Transfektion von pBIG2i-UKW in SUIT-2 028-Zellen.....94
7.4.3 Nachweis der *UKW*-Expression in stabil transfizierten SUIT-2 028-Zellen im Northern-Blot.....94
7.4.4 UKW-Nachweis in SUIT-2 028/UKW-Transfektanten mittels Western-Blot.....95
7.5 Zellbiologische Untersuchungen in den SUIT-2 028-Transfektanten.....97
7.5.1 Untersuchungen zur UKW-abhängigen Proliferation und Bestimmung der Generationszeiten.....97
7.5.2 Untersuchungen zur Motilität von SUIT-2 007-Zellen und SUIT-2 028/UKW-Transfektanten.....98
7.5.3 Untersuchungen zum anhaftungsunabhängigen Wachstum auf poly-HEMA.100
7.5.4 *In vitro* Invasionstest.....105
7.5.5 Bestimmung der Adhäsion an Substrate der extrazellulären Matrix.....106
8. Immunhistochemische Untersuchungen zu UKW.....109
8.1 Austesten des UKW-Antiserums für die Immunhistochemie.....109
8.2 Immunhistochemische Analyse der UKW-Expression in humanen, normalen Geweben und Tumorgeweben.....111

Diskussion.....115

1. Das Pankreastumor-Modellsystem SUIT-2 007 und SUIT-2 028 eignet sich zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene.....115
2. Identifizierung von deregulierten Genen in Pankreaskarzinomzelllinien mittels Microarray-Technologie.....117
3. Das metastasierungs-assoziierte Protein LKW gehört zur Familie der dual-spezifischen Kinasen.....118
4. Expressionsstudien zu *LKW* in Tumorzelllinien, Normalgewebe und Tumorgewebe 120
4.1 *LKW* wird in normalen sekretorischen Drüsen, Tumorzelllinien und verschiedenen Tumorgeweben exprimiert.....120
4.2 LKW-mRNS-Expression in nicht-invasiven Brustkrebszelllinien.....121
4.3 Herunterregulation der LKW-mRNS-Expression korreliert in humanen Dickdarmkrebszelllinien und Dickdarmtumoren mit der Metastasierung.....122
5. Das transmembranständige Protein UKW gehört zur Immunglobulin-Superfamilie..123

6. Expressionsstudien zu *UKW* in Tumorzelllinien, Normalgewebe und Tumorgewebe 126
6.1 Nachweis der UKW-mRNS und des UKW-Proteins in den Pankreastumorzelllinien SUIT-2 007 und SUIT-2 028 ... 126
6.2 UKW-mRNS-Expression korreliert in Brusttumorzelllinien mit dem Invasionspotenzial ... 126
6.3 Expression von *UKW*-mRNS in normalen Geweben und Tumorgeweben ... 127
6.4 *UKW* wird in Tumorgeweben des Pankreas exprimiert ... 127
7. Funktionelle Studien: *In vitro*-Untersuchungen zum Einfluss ektopischer *UKW*-Expression ... 128
7.1 Einfluss von *UKW* auf Proliferation, Migration und Invasion ... 128
7.2 Stabile *UKW*-Expression verändert Adhäsionsspezifität gegenüber Laminin und Fibronektin ... 130
7.3 Einfluss stabiler *UKW*-Expression auf adhäsionsunabhängiges Wachstum ... 132
8. Immunhistochemischer Nachweis von UKW in Pankreas- und Dickdarmtumoren ... 133

Zusammenfassung ... 134

Literaturverzeichnis ... 136

Anhang ... 144
1. Abkürzungen ... 144
2. Tabelle hochregulierter bekannter Gene ... 146
3. Tabelle herunterregulierter bekannter Gene ... 149
4. Tabelle hochregulierter ESTs ... 151
5. Tabelle herunterregulierter ESTs ... 155
6. Klonierung der *UKW*-Sequenz ... 159
7. cDNS- und Protein-Sequenz von UKW ... 163
8. Klonierung der *LKW*-Sequenz ... 164
9. cDNS- und Protein-Sequenz der dual-spezifischen Kinase LKW ... 166
10. ‚Multiple Tissue Expression Array' Ubiquitin-Kontrolle ... 167
11. ‚Cancer Profiling Array' Ubiquitin-Kontrolle ... 168

Einleitung

1. Das Pankreaskarzinom

1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren des Pankreaskarzinoms

Bauchspeicheldrüsenkrebs ist das Ergebnis krankhafter, bösartiger Veränderungen der meist exokrinen Zellen in der Bauchspeicheldrüse. Betroffen von der Erkrankung sind vorwiegend Menschen vom 60. zum 80. Lebensjahr, dabei Männer häufiger als Frauen. Männer weisen ein höheres Risiko als Frauen auf (2:1), möglicherweise aufgrund des häufigeren Tabakkonsums. In den USA rechnet man jährlich mit 10 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner, für Europa können ähnliche Zahlen angenommen werden (Warshaw et al., 1992). In der Bundesrepublik Deutschland beträgt die Häufigkeit an Neuerkrankungen für Männer 8,1 und für Frauen 5,4 pro 100.000 Einwohner. In letzter Zeit finden sich gehäuft jüngere Patienten bereits ab dem dritten Lebensjahrzehnt. Beim Blick auf die Zahlen der krebsbedingten, organbezogenen Todesursachenstatistik rangiert der Bauchspeicheldrüsenkrebs mit 11.634 Verstorbenen im Jahr 1996 in der Bundesrepublik Deutschland an fünfter Stelle (Ahlgren, 1996). In den Vereinigten Staaten starben 2001 ca. 28.000 Menschen an Bauchspeicheldrüsenkrebs. Somit ist dies die fünfthäufigste krebsbedingte Todesursache und stellt nach dem kolorektalen Karzinom und dem Magenkarzinom das dritthäufigste Malignom des Gastrointestinal-traktes dar. Aus diesem Grund wird der Bauchspeicheldrüsenkrebs auch die „Herausforderung des 21. Jahrhunderts“ genannt (Flanders et al., 1996).

Hierfür gibt es im Wesentlichen zwei Gründe. Diese Tumore werden meist erst in so fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert, dass sie nicht mehr heilbar sind. Histologisch lassen sich verschiedene Formen von Tumoren der Bauchspeicheldrüse unterscheiden. Am häufigsten sind Geschwülste, die vom Gangsystem der Bauchspeicheldrüse ausgehen, sogenannte duktale exokrine Tumore. Unter ihnen sind Adenokarzinome am häufigsten. Das duktale Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse macht etwa achtzig bis neunzig Prozent aller Krebserkrankungen der Bauchspeicheldrüse aus (Lionetto et al., 1995).

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist letztendlich ungeklärt. Bestimmte Risikofaktoren disponieren überdurchschnittlich häufig zur Erkrankung. Als sicherer Risikofaktor gilt das Zigarettenrauchen (Howe et al., 1991). Weiterhin wird eine fett- und/oder fleischreiche Ernährung als prädisponierender Faktor angesehen. Koffein- bzw. Kaffeegenuss haben dagegen keinen nachweisbaren Effekt. Patienten nach Magenresektion, mit Diabetes mellitus oder chronischer Pankreatitis weisen ein erhöhtes Risiko der Karzinom-

entwicklung auf. Allerdings ist weder der kausale noch der zeitliche Zusammenhang dieser Beobachtung geklärt. Im Rahmen beruflicher Exposition besteht ein deutlich erhöhtes Risiko gegenüber Noxen wie 2-Naphtylamin, Benzidin oder Benzolderivaten. Weiterhin scheint es auch eine genetisch determinierte Form des Pankreaskarzinoms zu geben (Lowenfels et al., 1993).

1.2 Symptomatik und Diagnostik des Pankreaskarzinoms

Typische Leitsymptome oder spezifische Frühsymptome fehlen beim Pankreaskarzinom. Dies ist unter anderem für die meist späte Diagnosestellung der Tumorerkrankung verantwortlich. Schmerzen und/oder Gelbsucht werden zwar bei mehr als 90 % der Patienten beobachtet, die Gelbsucht stellt aber lediglich bei Pankreaskopftumoren ein Frühsymptom dar. Bei Tumoren im Bereich von Pankreaskorpus oder -schwanz entsteht Gelbsucht überwiegend erst bei Metastasierung. Durch Infiltration des Bauchfells kommt es zu Schmerzen in der Magengrube und im Rücken. Dies ist Ausdruck eines meist lokal fortgeschrittenen Tumorleidens. Ebenso sind Appetitlosigkeit, Verdauungsstörungen und Gewichtsverlust sowie wiederkehrende Thrombosen Spätsymptome. Gelegentlich ist eine akute Pankreatitis Erstmanifestation des Pankreaskarzinoms (Lowenfels et al., 1993). Zum Fehlen typischer Frühsymptome kommt das Fehlen einer effektiven und gleichzeitig wenig invasiven Screening-Diagnostik. Auch bei symptomatischen Patienten und nachweisbaren Tumoren stößt die Diagnostik häufig schnell an Grenzen hinsichtlich der Diagnose des Tumortyps oder lokaler Resektabilität.

1.3 Therapie des Pankreaskarzinoms

Aufgrund der fehlenden Warnzeichen als auch des raschen Wachstums des Pankreaskarzinoms, handelt es sich hierbei um eine der aggressivsten Tumorformen. Die vollständige Tumorresektion ist derzeit die einzige Möglichkeit zur Heilung eines Pankreaskarzinoms (Evans, 2001). Zum Zeitpunkt der klinischen Präsentation weisen bis zu 50 % der Pankreaskarzinome regionale und ca. 20 % entfernte Lymphknoten-metastasen auf. Zusätzlich haben zwei von drei Patienten Lebermetastasen und 70 % Infiltrationen der Nervengefäße. Daraus folgt, dass bei nahezu 70 % aller Patienten eine alleinige operative Entfernung keine Heilung ermöglicht (Willett et al., 1993; Luttges et al., 1998). Es ist dann das Ziel durch Chemotherapie eine Verbesserung der Lebens-qualität durch Verzögerung der Tumorprogression und möglichst Tumorrückbildung zu erreichen. Mit allen bisher getesteten Therapieansätzen liegt die Regressionsrate jedoch durchweg unter 15 % (Ahlgren, 1996).

1.4 Metastasierung beim Pankreaskarzinom

1.4.1 Zellbiologische Aspekte

Der erste Schritt zur Metastasierung ist das Durchbrechen der Basalmembran. Invasiv wachsende Tumore sind in der Lage, diese Membran zu durchdringen. Nach Anheftung an die Basalmembran erfolgt der enzymatische Abbau der Membran und letztendlich die Passage der Tumorzellen in das subkutane Fettgewebe bzw. in die Lymph- und Blutzirkulation (Streit et al., 1996).

Solide Tumoren sind ab einem Durchmesser von wenigen Millimetern von der Versorgung durch Blutgefäße abhängig. Daher induzieren Tumorzellen die Bildung neuer Gefäße aus vorhandenen Gefäßen, ein Prozess der als Angiogenese bezeichnet wird. Die Ausbildung neuer Gefäße aus vorhandenen Gefäßen ähnelt in vielen Aspekten dem invasiven Wachstum von Tumorzellen. Die Basalmembran des reifen Gewebes wird abgebaut, und die Endothelzellen wandern in das umgebende Bindegewebe (Liotta et al., 1991). Begünstigt werden könnte die Verbreitung von Tumorzellen durch die abnormale Morphologie und Größe der beteiligten Endothelzellen, da die neu gebildeten Gefäße durchlässiger sind als normale Blutgefäße (Folkman et al., 1987). In Pankreastumoren wurden Angiogenin, TGFα und IL-8 überexprimiert gefunden und scheinen an der Angiogenese beteiligt zu sein (Fidler et al., 1994; Ellenrieder et al., 1999).

Die Modifizierungen bei der Progression des Pankreaskarzinoms können Metastasierungs-stimulierende Faktoren oder Metastasierungs-supprimierende Faktoren umfassen. Zu den stimulierenden Faktoren zählen Onkogene, Proteasen, Motilitätsfaktoren, Angiogeneseinduktoren sowie heterotypische Adhäsionsmoleküle. Die Metastasen-Suppressor-Gene umfassen, Proteaseinhibitoren, Differenzierungsfaktoren, Wachstumsfaktoren, Angiogeneseinhibitoren und homotypische Adhäsionsmoleküle.

1.4.2 Adhäsionsmoleküle

Adhäsive Interaktionen von Zellen sind essentiell für das Überleben, die Proliferation sowie die Differenzierung und die Funktion von Zellen, als auch für die zelluläre Kommunikation wie sie bei zahlreichen physiologischen Prozessen eines vielzelligen Organismus stattfindet. Unter Adhäsion versteht man den spezifischen, Rezeptor-vermittelten Kontakt zwischen Zellen oder zwischen Zellen und der sie umgebenden extrazellulären Matrix. Diese Interaktionen besitzen einerseits eine mechanische Funktion, die für die Elastizität und Zugfestigkeit, also für Gewebeintegrität, und die Zellwanderung von Bedeutung sind. Andererseits wirken die Adhäsionsrezeptoren auch als Signalübermittler (Pines et al., 2001).

Untersuchungen zur Pathophysiologie der Metastasierung von Tumorzellen weisen darauf hin, dass eine Deregulation von Adhäsionsmechanismen die Loslösung von Tumorzellen aus ihrem primären Zellverband erleichtert. Bei den Zelladhäsionsrezeptoren handelt es sich um transmembrane Glykoproteine, die sich in vier Familien zusammenfassen lassen: den Molekülen der Immunglobulin-Superfamilie, Integrinen, Selektinen und Cadherinen (Skubitz, 2002).

Die Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulinfamilie (Ig-CAMs) besitzen eine oder mehrere Immunglobulin-Domänen (Ig-Domänen). Ig-Domänen sind durch äußerst variable Bindungsfunktionen und eine hohe Resistenz gegen proteolytischen Abbau gekennzeichnet. Diese Eigenschaften erklären die Bevorzugung und Konservierung dieser Struktur im Verlauf der Evolution.

Ig-CAMs vermitteln sowohl homotypische Interaktionen, wie z.B. durch das N-CAM, welches an der neuronalen Differenzierung beteiligt ist, als auch heterotypische, wie sie bei den Adhäsionsrezeptoren im Immunsystem vorkommen (Hemler et al., 2000). Ig-CAMs zeichnen sich durch extrazelluläre Domänen aus, die sich durch die Bildung von Disulfidbrücken in charakteristischer Weise falten. Mit ihrer Hilfe bilden diese Adhäsionsmoleküle typischerweise homophile Bindungen aus. Adhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie spielen in vielen physiologischen Prozessen eine Rolle, so z.B. bei der Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel im Rahmen von Entzündungsprozessen. Als Rezeptoren für Wachstums- und Differenzierungsfaktoren gehören z.B. die PDGF-, FGF- und VEGF-Rezeptoren zur Immunglobulin-Superfamilie.

Für Adhäsionsmoleküle aus der Immunglobulin-Superfamilie wurde eine Beteiligung an der Tumorprogression diskutiert. Eine systemisch zirkulierende Form von ICAM-1 wurde verstärkt bei Karzinompatienten entdeckt. Auch beim Pankreaskarzinom ist eine Erhöhung von ICAM-1 im Serum beobachtet worden (Schwaeble et al., 1993).

Protein-Protein-Wechselwirkungen finden sich auch zwischen Vertretern der Immunglobulin-Familie und Zelladhäsionsmolekülen anderer Familien wie z.B. Integrinen. (Huttenlocher et al., 1996) (Miyamoto et al., 1996).

Eines der bedeutendsten Adhäsionsmoleküle aus der Klasse der Cadherine, der Ca^{2+}-abhängigen CAMs, ist das E-Cadherin. Es wird ausschließlich von epithelialen Zellen exprimiert. Invasive Tumorzelllinien zeigen oft einen Verlust von E-Cadherin. Beim Pankreaskarzinom wurde eine Korrelation einer E-Cadherin-Reduktion mit Lymphknoten- und Fernmetastasen beschrieben (Frixen et al., 1991).

Bei dem Prozess der Metastasierung können sowohl supprimierende Gene, wie z.B. Cadherine, als auch stimulierende Gene, z.B. Integrine und CAMs von Bedeutung sein.

1.5 Molekulare Genetik des Pankreaskarzinoms

Die in den letzten 5 Jahren durchgeführte molekulargenetische Forschung hat wertvolle Erkenntnisse bezüglich der Tumorentwicklung des Pankreaskarzinoms erbracht. Die genetischen Grundlagen der Pankreaskarzinomentstehung stellen sich aus heutiger Sicht als eine Ansammlung von kritischen Mutationen in verschiedenen Genen dar. Sowohl die Aktivierung des Onkogens K-*RAS* als auch die Inaktivierung der Kontrollfunktion der 4 Tumorsuppressorgene *P53*, *DPC_4, $CDKN_2$, BRCA-2* kommen häufig vor (Hruban et al., 1993; Lowenfels et al., 1993).

Das K-*RAS* Onkogen weist beim Pankreaskarzinom eine Mutationshäufigkeit von ca. 90 % auf (Urban et al., 1993; Sohn, 2002). Ras-Proteine liegen an der Plasmamembran und sind wichtige Stationen des Signalwegs von der Zelloberfläche in den Zellkern. Als Onkogen wirkt K-*RAS* dominant (Urban et al., 1993; Sohn, 2002; Klimstra et al., 1994). Im Gegensatz dazu wirken Tumorsuppressorgene rezessiv. Für einen vollständigen Funktionsverlust müssen sowohl das väterliche als auch das mütterliche Allel unwirksam werden.

Das Tumorsuppressorgen *TP53* ist bei ungefähr 75 % der Pankreaskarzinome mutiert. *P53* repräsentiert eines der am häufigsten veränderten Gene bei Krebserkrankungen des Menschen. Funktionell handelt es sich bei p53 um einen Transkriptionsfaktor, der als Antwort auf einen DNS-Schaden aktiviert wird. Er spielt auch im Rahmen der Apoptose eine zentrale Rolle und sorgt dafür, dass die Zelle ihren DNS-Schaden repariert, oder stirbt. Liegt eine *TP53*-Mutation vor, gehen diese Funktionen verloren (Rozenblum et al., 1997).

Die Häufigkeit von *TP53*-Mutationen beträgt im Pankreaskarzinom ungefähr 75 %. Bei 41 % der *TP53*-Mutationen in Pankreastumoren handelt es sich um eine Transition eines G-Nukleotids gegen ein A-Nukleotid und bei 13 % um eine Transversion eines G-Nukleotids gegen ein T-Nukleotid. Sofern in Pankreastumoren sowohl das *TP53*-Gen als auch das K-*RAS*-Gen mutiert vorlagen, konnte der gleiche Mutations-Typ – entweder Transition oder Transversion – nachgewiesen werden. Diese Feststellung lässt auf einen gemeinsamen Mechanismus schließen. Li et al zeigten, dass es sich bei 62 % der K-*RAS*-Mutationen um G-Nukleotid gegen A-Nukleotid Transitionen und bei 35 % um G-Nukleotid gegen T-Nukleotid Transversionen handelt (Li et al., 2003).

Das *$CDKN_2$* Tumorsuppressorgen (auch als *P16* bekannt) ist bei mehr als 95 % der Fälle im Pankreaskarzinom inaktiviert. *$CDKN_2$* gehört zu den Zellzykluskontrollgenen, die die DNS-Replikation steuern (Caldas et al., 1994; Whelan et al., 1995; Hahn et al., 1996).

Das Tumorsuppressorgen *DPC_4* (deleted in pancreatic carcinoma) ist bei ca. 50 % und das *BRCA-2* bei ca. 20 % der Pankreaskarzinome inaktiviert (Caldas et al., 1994; Whelan et al., 1995; Hahn et al., 1996). Personen mit *BRCA-2* Keimbahnmutationen haben ein 5 % hohes Risiko ein Pankreaskarzinom zu entwickeln. *BRCA-2* ist charakterisiert als ein Protein, welches DNS-Strangbrüche im Rahmen der normalen Zellteilung verhindert (Goggins et al., 2000; Venkitaraman, 2002).
Interessanterweise konnten die beim Pankreaskarzinom häufig gefundenen Mutationen K-*RAS*, *TP53* und *$CDKN_2$* bereits in frühen duktalen Läsionen nachgewiesen werden. Im Rahmen eines Tumorprogressionsmodells werden sie als Karzinomvorläufer diskutiert, vergleichbar der Adenom-Karzinom-Sequenz im Dickdarm (Abbildung 1).

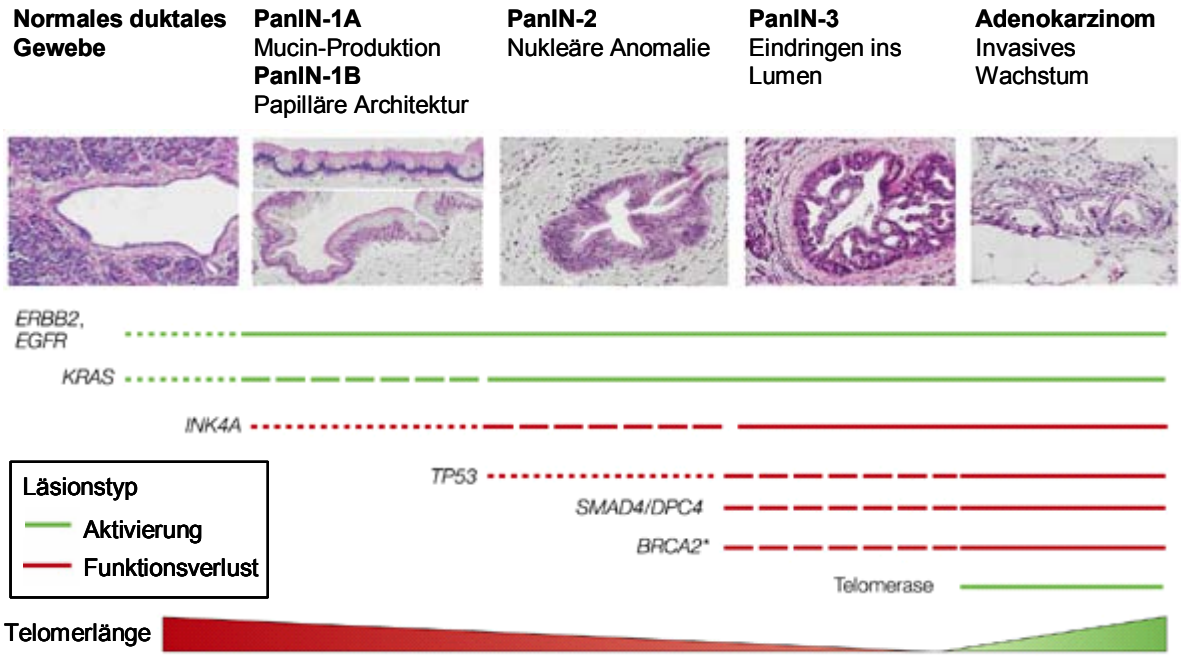


Abbildung 1: Genetisches Progressionsmodel des Pankreaskarzinoms. Das intraepitheliale Neoplasma des Pankreas (PanIN) repräsentiert die Störung bzw. den Verlust der Wachstumsregulation. Bei den PanINs handelt es sich um Vorläufer des Adenokarzinoms, die das Entstehungsstadium der Läsion veranschaulichen. Die Dichte der Punkte einer Linie korrespondiert mit der Häufigkeit der krankhaften Veränderung. (Bardeesy et al., 2002)

Trotz der Inaktivierung und dem Verlust der Expression von *P16, P21* und *P53*, sowie der Expression mehrerer in Apoptose involvierter Gene wie *BAX* und *BCL-2* sind diese nicht von prognostischer Bedeutung für das Pankreaskarzinom (Ghaneh et al., 2002).

1.6 Tumorbiologie des Pankreaskarzinoms

Gefährlich für den Patienten werden Karzinome durch ihr invasives Wachstum und ihre Fähigkeit zur Metastasierung. Tumorbiologische Untersuchungen der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass Tumorzellen nach der Transformation Wachstumsfaktoren benötigen (Ellenrieder et al., 1999). Pankreaskarzinomzellen sezernieren unter anderen TGF-α und TGF-β, EGF und bFGF, die entweder autokrin oder parakrin das Tumorwachstum stimulieren (Lynch, 1994; Sakorafas et al., 2000). Ein weiterer Schritt in der Metastasenentwicklung besteht in der Fähigkeit der Tumorzellen, die Gefäßneubildung zu induzieren. Zahlreiche angiogeneseaktivierende Faktoren sind bei Pankreaskarzinomen überexprimiert, z.B. Angiogenin. Das Absetzen der Tumorzellen vom Primärtumor und die Invasion der Umgebung bedeuten den zweiten Schritt in der Metastasenentwicklung. Biologisch erreichen dies die Tumorzellen durch die Änderung der Expression und Funktion von Adhäsionsmolekülen z.B. Verlust der E-Cadherin-Expression oder Neuexpression von ICAM-1 (Schwaeble et al., 1993). Die aktive Verdauung und Degradation der extrazellulären Matrix sind ein weiterer bedeutender Schritt auf dem Weg zur Metastasierung. Dafür produzieren Pankreaskarzinomzellen eine Vielzahl von Enzymen (z.B. Kollagenase, Urokinase). Durch diese Mechanismen wandern die Tumorzellen in die Umgebung aus, gelangen in das Gefäßsystem und werden im Organismus verteilt.

2. Das humane Pankreastumor-Modellsystem SUIT-2 007 und SUIT-2 028

Das isogene Pankreastumor-Modellsystem SUIT-2 007 und 028 leitet sich von der gemeinsamen Elternzelllinie SUIT-2 ab. Diese epitheliale parentale Zelllinie wurde aus einer Lebermetastase eines japanischen Pankreaskarzinompatienten gewonnen. Der Name der Zelllinie SUIT-2 setzt sich aus dem japanischen Wort für Pankreas ‚SUI' und ‚T' für Tumor zusammen. SUIT-2 weist ein aggressives Tumor-biologisches Verhalten auf. Versuche mit Nacktmäusen haben gezeigt, dass sie spontan nach subkutaner Injektion sowohl in pankreasnahe Lymphknoten als auch in die Lunge metastasiert (Iwamura et al., 1987). Histopathologisch wurde der Tumor klassifiziert als ein moderat-differenziertes tubuläres Adenokarzinom. Durch mehrfache *in vitro* Selektionsrunden wurden aus SUIT-2 insgesamt 28 Subklone mit unterschiedlichem Metastasierungs-potenzial etabliert (Iwamura et al., 1987). Für das Studium der Progression und der Metastasierung von Pankreastumoren wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Subklone ausgewählt, die sich in ihrem Metastasierungsgrad unterscheiden. SUIT-2 007 zeigt in der Nacktmaus ein moderat-differenziertes Adenokarzinom und ist die Sublinie mit dem stärksten Metastasierungspotenzial. SUIT-2 028 metastasiert nicht und zeigt in der Nacktmaus ein gut differenziertes Adenokarzinom (Iwamura et al., 1992).
Die Untersuchung der Metastasenentwicklung in Nacktmäusen nach Injektion von Eltern- und Tochterzellen unterstützt diese Beobachtung. Bei Verwendung der Elternzelllinie entwickelte die Hälfte der Mäuse Metastasen in der Lunge und den Lymphknoten, während nach Injektion von SUIT-2 007-Zellen 83 % der Mäuse Lungenmetastasen aufwiesen. Die Metastasierungsrate in Lymphknoten war mit 33 % geringer. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse, die mit SUIT-2 028-Zellen behandelt wurden, keinerlei Metastasen (Taniguchi et al., 1992).
Pankreaskarzinome zeigen eine ausgeprägte Tendenz zur Metastasierung ohne Korrelation zur Größe des Primärtumors. Metastasierungswege sind in erster Linie lymphogen, zumeist in peripankreatische Lymphknoten sowie im Bereich der Leberpforte. Eine hämatogene Metastasierung betrifft vor allem die Leber und die Lunge (Kelly et al., 1995).

Auch *in vitro* Versuche bestätigten ein unterschiedliches Invasionspotenzial der Zelllinien. Entsprechende Matrigel-Versuche mit SUIT-2-, SUIT-2 007- und SUIT-2 028-Zellen wurden von Taniguchi et al. durchgeführt (Taniguchi et al., 1994). Über den Invasionsgrad von Tumorzellen in Matrigel ist es möglich die Tumorzellen durch Mitwirkung von Rezeptoren der extrazellulären Matrix und matrixdegradierender

Enzyme, welche eine Rolle bei der Tumorprogression spielen, zu charakterisieren. SUIT-2 007 scheint die stärkste Bindungsaffinität gegenüber der Basalmembran zu haben. Der stark metastasierende Subklon SUIT-2 007 zeigte die stärkste Anhaftung an Matrigel, während die Zelllinie SUIT-2 028 mit keinem Metastasierungspotenzial kaum an Matrigel haftete.

Die Pankreastumorzelllinie SUIT-2 028 metastasiert nicht. Dafür könnte u.a. das Biglycan (PG-I) verantwortlich sein. Weber et al. konnten eine Überexpression dieser Komponente der extrazellulären Matrix, in SUIT-2 028-Zellen nachweisen, während keine PG-I-Expression in den metastasierenden Pankreastumorzelllinien SUIT-2 und SUIT-2 007 detektiert werden konnte. Das ECM-Protein PG-I hemmt das Zellwachstum durch Verweilen in der G1-Phase. PG-I spielt sehr wahrscheinlich eine Rolle beim Abwehrmechanismus der Zelle mit dem Ziel die Progression in Pankreastumoren abzuschwächen (Weber et al., 2001).
Iwamura et al. wiesen die Expression von P-Selektin für die metastasierende Elternzelllinie SUIT-2 und für die metastasierende SUIT-2 007-Zelllinie nach. P-Selektin spielt sowohl im Rahmen von Entzündungen als auch bei der Blutgerinnung eine wichtige Rolle. Eine P-Selektin-Expression wurde in Bereichen von Tumoren beobachtet, die der Neovaskularisation unterliegen. Es wird vermutet, dass Interaktionen zwischen diesem Adhäsionsmolekül und dem Endothelgewebe eine entscheidende Rolle im Prozess der Metastasierung und der Angiogenese spielen (Iwamura et al., 1997).

3. Die Microarray-Technologie

Mit Hilfe der Ende der 90er Jahre entwickelten Microarray-Technologie wurde es möglich, die Zusammensetzung und relative Menge der mRNS in einer Zelle zu bestimmen. Es sei hier angemerkt, dass es keine feste Korrelation zwischen zellulärer mRNS und zellulärem Proteinspiegel gibt, so dass absolut-quantitative Rückschlüsse aus den Ergebnissen des Microarray-Experimentes auf die jeweilige Protein-konzentration derzeit noch nicht möglich sind.

3.1 Anwendung der Affymetrix GeneChip® Array Technologie für die Suche nach neuen metastasierungs- und invasionsassoziierten Genen des Pankreaskarzinoms

Der Bauchspeicheldrüsenkrebs hat eine schlechte Prognose, da spezifische Frühsymptome fehlen und eine rasche lokale Invasion und Metastasierung der Tumorzellen Schwierigkeiten bei der Behandlung der Patienten bedingen. *In vitro* Modellsysteme sollen dazu beitragen, die für die Progression des Pankreaskarzinoms verantwortlichen Gene zu identifizieren und zu charakterisieren, um somit neue Möglichkeiten der Tumordiagnostik und -therapie zu schaffen. Das hier beschriebene Modell besteht aus den beiden isogenen Pankreastumorzelllinien SUIT-2 007 und SUIT-2 028, die sich deutlich in ihrer Metastasierungsfähigkeit unterscheiden. Durch mehrfache *in vitro* Selektionsrunden wurden aus der metastasierenden Zelllinie SUIT-2 die ebenso metastasierende Zelllinie SUIT-2 007 und die nicht-metastasierende Zelllinie SUIT-2 028 etabliert (Taniguchi et al., 1992).

Für die metastasierende Zellinie SUIT-2 007 zeigten Iwamura et al., dass diese von allen der 28 Klone den höchsten Wert des Krebsmarkers Carcinoembryonales Antigen (CEA) produziert (Iwamura et al., 1992). CEA wird als Tumormarker bei Lebermetastasen, sowie bei der Einschätzung von Bauchspeicheldrüsenkrebstumoren verwendet. SUIT-2 028 wies hingegen den höchsten Gehalt an Carbohydrat Antigen 19-9 (CA19-9) auf. CA19-9 ist der Tumormarker erster Wahl bei der Diagnose von Bauchspeicheldrüsenkrebs. Diese Krebsmarker eignen sich jedoch nicht sonderlich gut zur Suche nach einem möglichen Krebsleiden, denn sie sind weder kennzeichnend für ein bestimmtes Organ, noch entspricht der gemessene Wert des Markers der Größe des entarteten Gewebes.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mittels Microarray-Technologie die Transkriptionsprofile der beiden Pankreastumorzelllinien SUIT-2 007 und SUIT-2 028 erstellt werden. Die Microarray-Technologie ermöglicht es, die Unterschiede in den Expressionsprofilen zwischen SUIT-2 007 und SUIT-2 028 nachzuweisen.

SUIT-2 028 unterscheidet sich von SUIT-2 007 des weiteren im Zelltyp. Während diese Zelllinie den Phänotyp einer gut differenzierten Epithelzelle aufweist, erscheinen die SUIT-2 007-Zellen gemäßigt differenziert (Iwamura et al., 1992). Dies spricht für eine Dedifferenzierung der SUIT-2 007-Zellen. Die Dedifferenzierung der Zelllinie SUIT-2 007 im Vergleich zu SUIT-2 028 kann beispielsweise durch Erstellung des Transkriptionsprofils mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie für die Gene Vimentin und Keratin untersucht werden.

Die Affymetrix GeneChip® Array Technologie wurde bereits in einigen Studien erfolgreich zur Identifizierung von neuen Genen eingesetzt. Auch manche wichtige Krebsgene konnten mittels dieser Methode bereits identifiziert werden. Dazu zählen beispielsweise die Gene ‚malignant melanom-associated I' (*MMA-Ia*) und *MMA-Ib*, welche ausschließlich in Tumoren der Haut, Lunge, Leber und normalem Hodengewebe gefunden wurden (de Wit et al., 2002). Evtimova et al. verwendeten die Affymetrix GeneChip® Array Technologie zur Erstellung des Transkriptionsprofils verschiedener Brustkrebszelllinien unterschiedlichen Metastasierungsgrades. So konnten sie die Überexpression einiger prognostischer Brustkrebsmarker wie Cystatin, Thrombospondin-1 und Kreatinkinase BB zeigen (Evtimova et al., 2001). De Lange et al. wiesen mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie beim Vergleich humaner metastasierender und nicht-metastasierender Dickdarmkrebszelllinien das S100 Calcium-bindende Protein A13 nach, dessen Rolle in Verbindung mit Metastasierung gebracht wird (De Lange et al., 2001). Dieses experimentelle Affymetrix GeneChip® Array Technologie System schien somit als sehr vielversprechend, zur Erstellung eines Transkriptionsprofils um weitere unbekannte, im speziellen metastasierungs- und invasionsassoziierte Gene des Pankreaskarzinoms im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu finden. Die neu identifizierten Gene könnten zuerst als potenzielle Tumor- bzw. Metastasierungsmarker dienen um später eventuell in der Therapie des Pankreaskarzinoms Anwendung zu finden.

4. Aufgabenstellung

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, mit Hilfe der Microarray-Technologie in einem humanen Pankreastumor-Modellsystem, bestehend aus einer stark metastasierenden (SUIT-2 007) und einer nicht-metastasierenden Zelllinie (SUIT-2 028), differentiell exprimierte Gene unbekannter Funktion zu identifizieren, die bei der Kanzerogenese im Pankreas in Prozessen wie Invasion und Metastasierung eine Rolle spielen. Zunächst sollte das Zellsystem durch Erstellung eines Expressionsprofils bekannter Gene auf dessen Eignung überprüft werden. Nach der Identifizierung neuer Gene sollte in verschiedenen Korrelationsstudien bestimmt werden, ob es ein erkennbares Schema für die Expression dieser Gene gibt. Die ausgewählten unbekannten Gene sollten isoliert und ihre funktionelle Relevanz hinsichtlich Proliferation, Invasivität und Metastasierung aufgeklärt werden. Diese potenziell neuen ‚Krankheitsgene' könnten als Ausgangspunkt für die spätere Entwicklung neuer diagnostischer oder therapeutischer Optionen für das Pankreaskarzinom dienen.

Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien und biochemische Reagenzien

Enzyme und Chemikalien	Bezugsquelle
α-(Lindberg et al.)dATP	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Agarose MP	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Ampicillin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Fluka, Neu-Ulm
BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA
Bodipy TR	Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande
BrightStar-Plus Positively Charged Nylon Membrane	Ambion, Cambridge, England
BSA (bovine serum albumin)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Collagen I	Clontech, Heidelberg
Collagen IV	Clontech, Heidelberg
DNA Ligase, T4	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DNA COT-1, human	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DMSO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Expresshyb Hybridisierungslösung	Clontech, Heidelberg
Formaldehyd, 37%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fibronectin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Goat IgG, Reagent Grade	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Herring Sperm DNS	Promega, Mannheim
Hoechst	Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande
Hygromycin B	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Kanamycin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Laminin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Lipofectin	Invitrogen, Leek, Niederlande
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Leek, Niederlande
Lipofectamin Plus	Invitrogen, Leek, Niederlande
MES	Invitrogen, Leek, Niederlande
10 x MOPS	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
MultiMark Multi-Colored Standard	Invitrogen, Leek, Niederlande
Multiple tissue expression array	Clontech, Heidelberg
NuPage Novex 4-12% Bis-Tris Gel	Invitrogen, Leek, Niederlande
Nylonmembran, positiv geladen	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Penicillin-Streptomycin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:25:1)	Invitrogen, Leek, Niederlande
Poly-HEMA	Polysciences Europe, Eppelheim
Quick Spin Columns Sephadex G50	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Restriktionsenzyme	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

RNase-Zap	Ambion, Cambridge, England
Röntgenfilme Biomax MS	Kodak
Röntgenfilme Cronex 4	DuPont, München
R-Phycoerythrin-Streptavidin	Molecular Probes Europe BV, Leiden, NL
20 x SSPE	Invitrogen, Leek, Niederlande
Streptavidin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Tris Base	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween 20	Serva, Heidelberg
Velcorin (Dimethyldicarbonat)	Bayer AG, Leverkusen
Vitronectin	Clontech, Heidelberg
Wasserstoffperoxid (Perhydrol)	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

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

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

1.2 Puffer

Puffer	Herstellung
1 % Eosin-Lösung	1 g Eosin in 1000 ml Aqua dest. lösen, vor Gebrauch 0,3 ml Eisessig zu 200 ml Eosin geben
Fragmentierungspuffer	200 mM Tris-Acetat, 500 mM Kaliumacetat 150 mM Magnesiumacetat, pH 8,1
Hämalaun nach Mayer	1,0 g Zitronensäure, 1,0 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumjodat, 50 g Aluminiumkaliumsulfat, 50 g Chloralhydrat, ad 1000 ml Aqua dest.
Hybridisierungspuffer (2 x MES-Puffer)	8,3 ml 12 x MES, 17,7 ml 5 M NaCl, 4,0 ml 0,5 M EDTA, 0,1 ml 10 % Tween20, 19,9 ml DEPC-H_2O
Lysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 ; 150 mM NaCl, 1 % Nonidet® P40, 0,5 % Sodium deoxycholat, 0,1 % SDS, 1 mM Na_3VO_4 (Phosphatase-Inhibitor), 1 Tablette Complete Mini pro 10 ml Puffer (Protease-Inhibitor-Lösung)
12 x MES-Puffer	70,4 g MES, 193,3 g MES Natriumsalz, ad 1000 ml Aqua dest., pH 6,5 – 6,7
10 x MOPS	0,2 M MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7,0
MTT-Solubilisierungspuffer	10 % SDS in 0,01N HCl
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl 4,3 mM $Na_2HPO_4x7H_2O$, 1,4 mM KH_2PO_4, pH 7,4
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Natriumzitrat·$2H_2O$, pH 7,0
10 x TAE	0,4 M Tris Base, 0,2 M Eisessig, 0,1 M EDTA, pH 8,4
Waschpuffer (stringent)	83,8 ml 12 x MES Puffer, 5,2 ml 5 M NaCl 1 ml 10 % Tween20, ad 1000 ml Aqua dest.
Waschpuffer (nicht-stringent)	600 ml 20 x SSPE, 2 ml 10% Tween20, ad 2000 ml Aqua dest.

1.3 Geräte

Geräte	Bezugsquelle
ABI PRISM 7700	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
CO_2-Brutschrank	Heraeus Instruments, München
Dampftopf „Multi-Gourmet“	Braun, Kronberg
Durchflußzytometer (FACScan®)	Becton Dickinson, Heidelberg
Einbettautomat Coveraid	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Elektrophoresekammer	Invitrogen, Leek, Niederlande
ELISA-Reader	Tecan, Crailsheim
Farbvideokamera, RTE/CCD - 1300 - Y/HS	Princeton Instruments, New Jersey, USA
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Gene AMP PCR System 9700	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA
Hewlett-Packard G2500A Gene Array Scanner	Affymetrix®, Santa Clara, USA
LightCycler™	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Elektrophorese-Kammer	Biorad, München
Spektrophotometer Uvikon 931	Kontron Instruments, Mailand, Italien
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl
Tischzentrifuge, 5415D	Eppendorf, Hamburg
UV-Stratalinker	Stratagene, Heidelberg
Western Blot Apparatur	Biorad, München

1.4 Fertige Lösungen und Reaktionssysteme

Fertige Lösungen und Reaktionssysteme	Bezugsquelle
Blocking Solution	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
CSPD	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DAB-Substrat	DAKO Corporation, Carpinteria , USA
DIG Easy Hyb	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Goat-Serum, IHC-Block, Envision™	DAKO Corporation, Carpinteria, USA
High Fidelity PCR Master	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
High Pure PCR Purification Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
LightCycler DNA Master SYBR Green I	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Lumi-Light Plus Western Blotting Substrate	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
NuPage MES SDS Running Buffer	Invitrogen, Leek, Niederlande
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Protease-Inhibitor-Lösung	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
QIAquick Gel-Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Lambda Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
3´RACE System for Rapid Amplification of	Invitrogen, Leek, Niederlande

cDNA Ends	
5` RACE System	Invitrogen, Leek, Niederlande
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
10 x Reveal	Biocarta Europe, Hamburg
RIPA Puffer Set	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Strip-EZ DNA – Random Primed StripAble DNA, Probe Synthesis & Removal Kit	Ambion, Cambridge, England
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande

1.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden bei MWG-Biotech (München) synthetisiert.

Name	5´-3´-Sequenz	Verwendung
B2	GTCGTCAAGATGCTACCGTTCAGGA	Affymetrix®-Hybridisierung
Oligo(dT_{24})	GGCCAGTAATTGTAATACGACTCACTATGGGAGGCGG-$(T)_{24}$	Affymetrix® Gesamt-RNS-Präparation
GAPDH-sense	CCCTTCATTGACCTCAACTAC	Northern-Blot-Hybridisierung
GAPDH-antisense	GATGATGACCCGTTTGGC	Northern-Blot-Hybridisierung
Mesothelin-sense	CTGGGATCTACACAGACCAT	Northern-Blot-Hybridisierung
Mesothelin-antisense	TCCCTGGGATCTACACAGA	Northern-Blot-Hybridisierung
Thrombomodulin-sense	TCGGCTTACAGCTAATGT	Northern-Blot-Hybridisierung
Thrombomodulin-antisense	AGACGCAGAGGTAGCTAGTTT	Northern-Blot-Hybridisierung
EST B8i-sense	CTGGGATCTTGACAAAGACACT	Northern-Blot-Hybridisierung
EST B8i-antisense	ATTTTTCCCTCGCCTAGTTC	Northern-Blot-Hybridisierung
EST C10i-sense	CCATCAGGAAGCATGCCAG	Northern-Blot-Hybridisierung
EST C10i-antisense	GCAACAGCTGACGCTCACTG	Northern-Blot-Hybridisierung
EST E2i-sense	ATCCTCTCAAAGGTGGTTCT	Northern-Blot-Hybridisierung
EST E2i-antisense	GGGATAGGGAATTCATTTCT	Northern-Blot-Hybridisierung
EST E19i-sense	GGCGGACACCGAAGTCAA	Northern-Blot-Hybridisierung
EST E19i-antisense	AGCGCCTCAACGGTA	Northern-Blot-Hybridisierung
EST B11d-sense	TGTAGAAGAGTGGAATTCTGG	Northern-Blot-Hybridisierung
EST B11d-antisense	TACACACTACACTCACTGCAAG	Northern-Blot-Hybridisierung
EST D1d-sense	CCAGTGTTGTGCGGTCATG	Northern-Blot-Hybridisierung
EST D1d-antisense	GCTGTGAGAGGAGCTGGACAT	Northern-Blot-Hybridisierung
EST D5d-sense	TTCAGATGATGGACAGTCTCTTCAA	Northern-Blot-Hybridisierung
EST D5d-antisense	ACAGACAGTGATTCGGATGCC	Northern-Blot-Hybridisierung
EST E1d-sense	CCTCGATCCTCTGCTCACTCA	Northern-Blot-Hybridisierung
EST E1d-antisense	CCTTGGCAGGTGGAATTCC	Northern-Blot-Hybridisierung
B9d-sense	TTCTCCTTTATTAGGCACAGGT	Northern-Blot-Hybridisierung
B9d-antisense	AAACCAGCTGCCTTTGTATCT	Northern-Blot-Hybridisierung
LKW1-sense	CCTGAGCACTAGGGCCTC	Taqman®-PCR

LKW1-antisense	TGGCCACAGGACAGACCC	Taqman®-PCR
XS13-sense	AGATCCGCATGTCCCTTC	Taqman®-PCR
XS13-antisense	CCTTGCGCATCATGGTGTT	Taqman®-PCR
LKW2-antisense	TCTCCTTTATTAGGCACAGG	5´RACE-PCR
LKW3-nested	AGTATGGACCTGGGATTGTGGA	5´RACE-PCR
LKW4-antisense	GGCCGACACTGGTACAAAG	5´RACE-PCR
LKW5-nested	CTGAGTATCTCAGGTCCCAC	5´RACE-PCR
LKW6-antisense	TCCTCTCACGGTCAGCGAAGA	5´RACE-PCR
LKW7-nested	AGGCAGTGGCCACAGCAGTT	5´RACE-PCR
abridged universal amplification primer AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	5´RACE-PCR
LKW8-sense	TCCACACACATGCAGTTCCT	LightCycler™-PCR
LKW8-antisense	AGGCCGACACTGGTACAAAG	LightCycler™-PCR
Calnexin-sense	ATTGTCAGATCGTTCATTGC	LightCycler™-PCR
Calnexin-antisense	ATGGAACAGGTAACCAGCAT	LightCycler™-PCR
LKW9-sense	ATGCGAGCCACCCCTCTG	Klonierung des Kinase-ORF in PCR2.1
LKW9-antisense	ACTGAAGGTTTGGCTCAGTT	Klonierung des Kinase-ORF in PCR2.1
B1i-sense	ATTCTCATTTCTAGGGTCCTG	α-[^{32}P]dATP-markierte Rezeptor-Sonde
B1i-antisense	CATCGTCTTCCTACAAACAGT	α-[^{32}P]dATP-markierte Rezeptor-Sonde
UKW1-sense	TTCTCTTTGACAGGTTCTGGGC	Taqman®-PCR
UKW1-antisense	GGTTGGAACCAGTAGGGCCTC	Taqman®-PCR
UKW2-sense	CCCCAGGAGTTTATGCTTGG	LightCycler™-PCR
UKW2-antisense	GCCTGGATACCACACTACCAG	LightCycler™-PCR
UKW3-sense	CTTTGCATGAAAAAGAGCCTTAG	DIG-markierte Rezeptor 3´UTR-Sonde
UKW3-antisense	TTGCAAAGTCAGTGGAATATGG	DIG-markierte Rezeptor 3´UTR-Sonde
UKW4-sense	GCTTCAGCTTCTCCTACAGTATCA	DIG-markierte Rezeptor 2.Screen-Sonde
UKW4-antisense	TGCTTCCTTCTGGTGTTAAGC	DIG-markierte Rezeptor 2.Screen-Sonde
UKW5-sense	ACATGTGTCTTCTATTCTGAC	DIG-markierte Rezeptor 3.Screen-Sonde
UKW5-antisense	TCCAGAAATATCTAGC	DIG-markierte Rezeptor 3.Screen-Sonde
UKW6-sense	GATCGGGATGTCCCTCCT	Klonierung des Rezeptor-ORF in PCR2.1
UKW6-antisense	CTGGTGACTTGAGCTCCAA	Klonierung des Rezeptor-ORF in PCR2.1
UKW7-sense	GCCGGTCGACATGTCCCTCCTCCTTCTCCTC	Klonierung des Rezeptor-ORF in pEGFP-N3
UKW7-antisense	GCCGGGATCCGACCGTTTGGAAGGCTCTGC	Klonierung des Rezeptor-ORF in pEGFP-N3
UKW8-sense	GCCGGGATCCATCGGGATGTCCCTCCTCCTT	Klonierung des Rezeptor-ORF in pBIG2i
UKW8-antisense	GCCGACTAGTGTAATTCAGACCGTTTGGAAGGC	Klonierung des Rezeptor-ORF in pBIG2i

1.6 Klone

Die folgenden Klone wurden von der Firma Incyte (Palo Alto, CA, USA) bezogen und nach Markierung mit α-[^{32}P]dATP als Sonden zur Northern-Blot-Hybridisierung eingesetzt.

Klon	Incyte-Klon-Nummer	Größe [bp]
Amphiregulin	1602249	900
Coagulation factor V	1304615	1350
Endothelial cell protein receptor	2136301	2100
Frizzled-7	2725790	2350
Maspin	1628341	600
Max interactor 1 (MX1)	1350457	1000
MMP-1	1553377	1600
PC6A Protease	1599529	700
PDGF-A	1677853	850
Serin-Protease	2599572	900
Thrombospondin-2	1906962	350
Tissue inhibitor of metalloproteases-2	905958	2050
Vimentin	855445	1150

1.7 Medien für das Screening einer cDNS-Bibliothek

Medium	Zusammensetzung
LB broth (pH 7,0)	10 g/l Bacto-tryptone, 5 g/l Bacto-yeast extract, 5 g/l NaCl
LB Agar + 10 mM $MgSO_4$	LB broth + 15 g/l Agar + 2,4 g/l $MgSO_4$
LB broth + 10 mM $MgSO_4$ + 0,2 % Maltose	LB broth + $MgSO_4$ nach dem Autoklavieren Zugabe von 0,2 % Maltose
10 x Lambda dilution buffer	58,3 g 1,0 M NaCl; 24,6 g 0,1 M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 350 ml 1,0 M Tris-HCl (pH 7,5)
Top Agarose + 10 mM $MgSO_4$	LB broth + 2,4 g/l $MgSO_4$ + 7,2 g/l Agarose
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0)
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl, 0,5 N NaOH

1.8 Plasmide und cDNS-Bibliothek

Plasmid	Bezugsquelle
pCR2.1	Invitrogen, Leek, Niederlande
pIRESneo2	Clontech, Heidelberg
pEGFP-N3	Clontech, Heidelberg
pBIG2i	Prof. Dr. T. Gress, Innere Medizin, Universität Ulm

cDNS-Bibliothek	Bezugsquelle
Humane Gebärmutter 5´-STRETCH cDNS Oligo(dT) + random primed	Clontech, Heidelberg

1.9 Antikörper

Antikörper	Verwendung	Bezugsquelle
Anti-Streptavidin Antikörper (Ziege), biotinyliert	Affymetrix®-Hybridisierung	Vector Laboratories, Peterborough, England
Kaninchen anti-human-UKW 1	Western-Blot	Eurogentec, Seraing, Belgien
Kaninchen anti-human-UKW 2	Western-Blot	Eurogentec, Seraing, Belgien
Ziege anti-rabbit IgG-HRP	Western-Blot	Biorad, Hercules, CA USA
Ziege anti-rabbit IgG-HRP	Immunhistochemie	DAKO Corporation, Carpinteria, USA
Maus anti-rabbit-GAPDH, monoclonal	Western-Blot	Chemicon, Temecula, CA USA

1.10 Bakterienstämme

E. coli Stamm	Genotyp	Verwendung
TOP10	F^-, mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG	Klonierung, Plasmid-Amplifikation
XL1-Blue Supercompetent Cells	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F´ proAB $lacI^qZ\Delta M15$ Tn10 (Tet^r)]	Klonierung, Plasmid-Amplifikation

1.11 Bakterienmedien

Medium	Zusammensetzung (1 Liter)
LB (Luria Broth)	10 g Bacto-Trypton (1 %); 5 g Bacto Hefe-Extrakt (0,5 %) 5 g NaCl (0,5 %) pH 7,4; bei Bedarf Zugabe von 100 µg/ml
LB Agar	LB broth + 15 g/l Bacto-Agar Ampicillin (100 µg/ml)

LB-Medium wurde für 20 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert. 100 µg/ml Ampicillin wurden, nach Abkühlen auf etwa 50°C, zugegeben.

1.12 Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen

Name	Bezugsquelle
D-MEM, Dulbecco´s Modifiziertes Eagle Medium (High Glucose)	Invitrogen, Leek, Niederlande
Doxycyclin	Clontech, Heidelberg
Fötales Rinderserum	Invitrogen, Leek, Niederlande
Fötales Kälberserum, Tetracyclin-frei	PAA Laboratories, Cölbe
FuGENE 6 Transfektionsreagenz	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Hygromycin B	PAA Laboratories, Cölbe
Lipofectin2000 Reagent	Invitrogen, Leek, Niederlande
Penicillin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Streptomycin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Leek, Niederlande

1.13 Zelllinienen und Zellen

Die mit * gekennzeichneten Zelllinien wurden selbst gezüchtet. Von allen anderen Zelllinien wurde die Gesamt-RNS zur Verfügung gestellt.

Zellinie	Bezugsquelle	Medium
Gewebe: Pankreas		
SUIT-2 007*	T. Gress, Innere Medizin, Univ. Ulm	DMEM, 10% FKS, 10 mM L-Gln
SUIT-2 028*	T. Gress, Innere Medizin, Univ. Ulm	DMEM, 10% FKS, 10 mM L-Gln
Panc-1*	T. Gress, Innere Medizin, Univ. Ulm	DMEM, 10% FKS
MIA PaCa-2	T. Gress, Innere Medizin, Univ. Ulm	DMEM, 10% FKS
CAPAN-1	T. Gress, Innere Medizin, Univ. Ulm	DMEM, 10% FKS
CAPAN-2	T. Gress, Innere Medizin, Univ. Ulm	DMEM, 10% FKS
PA-TU-8902	T. Gress, Innere Medizin, Univ. Ulm	DMEM, 10% FKS
PA-TU-8988S	T. Gress, Innere Medizin, Univ. Ulm	DMEM, 10% FKS
PA-TU-8988T	T. Gress, Innere Medizin, Univ. Ulm	DMEM, 10% FKS
IMIM-PC-1	T. Gress, Innere Medizin, Univ. Ulm	DMEM, 10% FKS
IMIM-PC-2	T. Gress, Innere Medizin, Univ. Ulm	DMEM, 10% FKS
BxPC-3*	ATCC #CRL-1687	RPMI, 10% FKS, 2 mM L-Gln
AsPC1*	ATCC #CRL-1682	RPMI, 10% FKS, 2 mM L-Gln
Gewebe: Brust		
MDA-MB-435 4A4	D. Tarin, Cancer Center, San Diego, USA	DMEM, 5% FKS, 2 mM L-Gln, 2 mM Na-Pyruvat
MDA-MB-435 2C5	D. Tarin, Cancer Center, San Diego, USA	DMEM, 5% FKS, 2 mM L-Gln, 2 mM Na-Pyruvat
T47-D	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
CAMA-1	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
MCF-7	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
ZR-75-1	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
SK-BR-3	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
UCAA-812	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
ZR-75-30	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
BT483	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
Du4475	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
MDA-MB-175	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
MDA-MB-361	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
MDA-MB-453	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
Hs 578T	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
BT-549	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
MDA-MB-436	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
MDA-MB-231	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
BT20	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
BT474	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
BT549	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
Hs578T	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
MCF-10A	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
MCF-12A	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
MDA-MB-157	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
MDA-MB-330	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS

MDA-MB-435	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
MDA-MB-468	R. Zeillinger, Univ. Wien, Österreich	MEM, 10% FKS
Gewebe: Kolon		
KM12C*	I. Fidler, Anderson Cancer Center Houston, USA	MEM, 10% FKS, L-Gln, Na-Pyruvat
KM12SM*	I. Fidler, Anderson Cancer Center Houston, USA	MEM, 10% FKS, L-Gln, Na-Pyruvat
KM12L4A*	I. Fidler, Anderson Cancer Center Houston, USA	MEM, 10% FKS, L-Gln, Na-Pyruvat
HCT 116*	N. Dimoudis, Roche Pharma, Penzberg	RPMI, 10% FKS, 2 mM L-Gln
HCT 116U5.5*	N. Dimoudis, Roche Pharma, Penzberg	RPMI, 10% FKS, 2 mM L-Gln
CX-1*	N. Dimoudis, Roche Pharma, Penzberg	RPMI, 10% FKS, 2 mM L-Gln

1.14 Gewebe

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

Patient	Gewebe	Normal/ Tumor	Dukes-Stadium	Klassifikation			Männlich (M) / Weiblich (W)
				T	N	M	
1	Rektum	normal	A				M
	Rektum	Primärt.	A	1	0	-	M
2	Rektum	normal	A				M
	Rektum	Primärt.	A	2	0	-	M
3	Rektum	normal	A				M
	Rektum	Primärt.	A	2	0	0	M
4	Kolon	normal	A				W
	Kolon	Primärt.	A	2	0	-	W
5	Flexura	normal	B				W
	Flexura	Primärt.	B	3	0	-	W
6	Rektum	normal	B				M
	Rektum	Primärt.	B	3	0	-	M
7	Rektum	normal	B				M
	Rektum	Primärt.	B	3	0	-	M
8	Kolon	normal	B				W
	Kolon	Primärt.	B	3	0	-	W
9	Kolon	normal	C				M
	Kolon	Primärt.	C	1	1	0	M
10	Kolon	normal	C				W
	Kolon	Primärt.	C	1	1	0	W
11	Kolon	normal	C				W
	Kolon	Primärt.	C	3	1	0	W
12	Kolon	normal	C				M
	Kolon	Primärt.	C	2	1	0	M

Patient	Gewebe	Normal/ Tumor	Dukes-Stadium	Klassifikation			Männlich (M) / Weiblich (W)
				T	N	M	
13	Kolon	normal	C				M
	Kolon	Primärt.	C	3	1	0	M
14	Rektum	normal	C				M
	Rektum	Primärt.	C	3	1	0	M
15	Kolon	normal	C				M
	Kolon	Primärt.	C	3	2	0	M
16	Rektum	normal	C				M
	Rektum	Primärt.	C	3	2	0	M
17	Flexura	normal	D				W
	Flexura	Primärt.	D	3	1	1	W
18	Rektum	normal	D				M
	Rektum	Primärt.	D	4	2	1	M
19	Kolon	normal	D				M
	Kolon	Primärt.	D	3	2	1	M
20	Koekum	normal	D				M
	Koekum	Primärt.	D	3	2	1	M
21	Rektum	normal	D				M
	Rektum	Primärt.	D	3	2	1	M
22	Rektum	normal	D				M
	Rektum	Primärt.	D	3	0	1	M
23	Rektum	normal	D				M
	Rektum	Primärt.	D	3	2	1	M
24	Rektum	normal	D				W
	Rektum	Primärt.	D	3	2	1	W

Die Pankreasgewebe (normales Gewebe, chronische Pankreatitis und Pankreastumorgewebe) wurden von T. Gress (Innere Medizin, Universität Ulm) zur Verfügung gestellt. Die Pankreaskarzinome wurden entsprechend der TNM-Klassifikation, nach ihrer Fähigkeit und Ausprägung Metastasen zu bilden, beurteilt.

Pankreastumorgewebe	TNM-Klassifikation	Beurteilung
T1	$T_2N_1M_o$	Regionale Metastasen
T2	$T_3N_3M_1$	Fernmetastasen
T3	$T_1N_0M_o$	Keine Metastasen
T4	$T_3N_0M_1$	Fernmetastasen
T5	$T_3N_xM_o$	Keine Metastasen
T6	$T_3N_xM_1$	Fernmetastasen
T7	$T_0N_xM_1$	Fernmetastasen
T8	$T_3N_1M_1$	Fernmetastasen
T9	$T_2N_0M_o$	Keine Metastasen
T10	$T_4N_1M_o$	Regionale Metastasen
T11	nicht bekannt	-
T12	$T_2N_0M_x$	Keine Metastasen
T13	$T_3N_1M_o$	Regionale Metastasen
T14	nicht bekannt	-
T15	nicht bekannt	-

Gewebeschnitte für die Immunhistochemie:

Gewebeschnitte	Organe	Bezugsquelle
BC3	Normalgewebe und Tumorgewebe (60 Schnitte)	Biocat, Heidelberg
MBN1	Normalgewebe zu MB1: Brust, Leber, Harnblase, Eierstock, Pankreas, Prostata	Biocat, Heidelberg
MB1	Tumorgewebe	Biocat, Heidelberg
MAN1	Normalgewebe zu MA1: Magen, Speiseröhre, Lunge, Rektum, Schilddrüse, Niere	Biocat, Heidelberg
MA1	Tumorgewebe	Biocat, Heidelberg

2. Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

Alle grundlegenden molekularbiologischen Methoden wurden entweder wie in Sambrook et al. (1989) oder unter Verwendung der oben aufgeführten Reaktionssysteme durchgeführt.
Alle RNS-Arbeiten wurden mit DEPC-H_2O behandelt.

2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNS

Für die Isolierung von Gesamt-RNS wird die RNeasy-Methode von Qiagen angewendet. Die Gesamt-RNS wird exakt nach Anleitung isoliert.

2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Methode wird zum einen verwendet, um für Northern Blot-Analysen Sonden herzustellen. Dazu wird eine Lösung aus den DNS-Polymerasen *Taq* und *Tgo* verwendet. In einem 50-µl-Ansatz werden je 20 pmol der entsprechenden Oligonukleotide und 100 ng ‚Template' eingesetzt und laut Herstellerangaben (High Fidelity PCR Master, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) $MgCl_2$, DNS-Polymerase und Desoxynukleotide zugesetzt.
Die cDNS-Proben wurden mit α-[^{32}P]dATP (spezifische Aktivität von 2 x 10^6 cpm/ml) unter Verwendung des ‚Strip-EZ^{TM} DNA Kit' (Ambion) nach Herstellerangaben markiert.
Zum anderen wurde für die meisten Klonierungen eine PCR durchgeführt.
Alle PCR-Ansätze wurden in einem ‚Gene Amp PCR System 9700-Gerät' durchgeführt.

2.1.3 RT-PCR

Um die volle Länge cDNS der neuen Gene *LKW* und *UKW* zu klonieren, wird eine RT-PCR unter Verwendung des ‚Titan One Tube RT-PCR Systems' durchgeführt. Mit diesem System ist eine Ein-Schritt-RT-PCR möglich, bei der cDNS-Synthese und PCR zwar nacheinander aber ohne erneute Zugabe von Reagenzien erfolgen können. Für die Erststrangsynthese wird die reverse Transkriptase des AMV-Virus (avian myeloblastosis virus) und für die PCR eine Mischung aus *Taq* und *Pwo*-Polymerase verwendet. Die Durchführung der RT-PCR erfolgt laut Hersteller unter Verwendung von 100 ng Gesamt-RNS.
Die RT-PCR wurde in einem „Gene Amp PCR System 9700-Gerät" durchgeführt.

2.1.4 TaqMan®-PCR

Quantitative Echtzeit-PCR wird mit der TaqMan®-PCR-Technologie unter Verwendung des ‚ABI PRISM 7700' Apparates durchgeführt. Aus Adenokarzinomen des Pankreas, chronischen Pankreatitiden und normalem Pankreasgewebe wird Gesamt-RNS isoliert. Für die cDNS-Synthese werden 10 µg Gesamt-RNS in 20 µl Gesamtvolumen eingesetzt. Die PCR wird mit einer Lösung aus 200 ng cDNS, 4 µl 10 x SYBR-Green-Puffer, 3 mM $MgCl_2$, 1 mM dNTP, 0,2 Einheiten Uracil-N Glycosylase, 1 Einheit AmpliTaq Gold und 300 nM Primer (40 µl Endvolumen) durchgeführt. Die Primer werden mit Hilfe der Primer Express Software PE Biosystems so gewählt, das sie ein Amplikon von 50 bp einrahmen. Folgende PCR-Konditionen werden verwendet: Initialschritt 2 Minuten bei 50°C, 10 Minuten bei 95°C, 40 Zyklen für 15 Sekunden bei 95°C und 60 Sekunden bei 60°C. Für jede cDNS wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Für die spätere Normalisierung dient das Haushaltsgen XS13 (Accession Nummer Z36785). Die Werte zu jeder einzelnen cDNS werden gemittelt und von diesen Mittelwerten wird der XS13-Wert subtrahiert. Durch den Mittelwert aller cDNS der normalen Gewebe werden die Differenzen der Werte für die cDNS der Pankreaskarzinom-, chronischen Pankreatitiden- und normalen Pankreasgewebe geteilt. Diese Quotienten werden in Potenz zur Basis 2 gesetzt. Diese Werte werden dann als Kehrwert geschrieben und stellen die relative Expression des zu bestimmenden Gens in der jeweiligen cDNS im Vergleich zur normalen cDNS dar.

$$FI = 2^{-((MW(CT_{\mathrm{Pr}obe}) - MW(CT_{Ktrl})) - (MW(CT_{\mathrm{Pr}obegesund}) - MW(CT_{Ktr\,\lg esund}))}$$

FI = Fold Increase (x-facher Anstieg im Vergleich zu (gesunden) Kontrollen)
CT = Cycle Threshold (Zyklusnummer, ab der das Fluoreszenzsignal signifikante Werte über der Hintergrundfluoreszenz erreicht)
MW = Mittelwert
CT_{Probe} = CT Werte des untersuchten Gens aus jeweiligem Proband
$CT_{ProbeGesund}$ = CT Werte des untersuchten Gens aus allen gesunden Probanden
CT_{Ktrl} = CT Werte von Housekeeping-Gen xs13 aus jeweiligem Proband
$CT_{KtrlGesund}$ = CT Werte von Housekeeping-Gen xs13 aus allen gesunden Probanden

2.1.5 Quantitative Echtzeit-PCR mittels LightCycler™

Die quantitative LightCycler™-PCR wird mittels LightCycler™-System durchgeführt. In entsprechende Kapillaren wird die Master-Lösung aus dem LightCycler DNA Master SYBR- Green I-Kit von Roche Molecular Biochemicals, der die Taq-DNA Polymerase, SYBR-Green I, Deoxyribonucleosid-Triphosphate enthält, gegeben. Die optimale Primer- und $MgCl_2$-Konzentration wurde vorweg getestet. Alle Analysen werden mit den Endkonzentrationen 0,5 µM (Primer) und 3 mM ($MgCl_2$) durchgeführt. 1 µg DNase-I-behandelte Gesamt-RNS wird eingesetzt. Die Durchführung der PCR erfolgte laut Herstellerangaben. Folgende PCR-Konditionen werden verwendet: 37 Zyklen Denaturierung (1 Sekunde bei 95°C), Annealing (5 Sekunden bei 58°C), Extension (8 Sekunden bei 72°C). Für die Temperaturübergänge wird eine Temperatur von 20°C pro Sekunde gewählt. Im Anschluss an die Amplifikation wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, bei der die PCR-Produkte bei 95°C denaturiert, bis 65°C abgekühlt und anschließend auf 95°C erhitzt werden. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt mit SYBR-Green I. Für jede cDNS wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Werte zu jeder einzelnen cDNS werden gemittelt. Zur Kontrolle der Primer-Dimerbildung wird in jedem Experiment eine Kontrolle ohne cDNS (Wasserkontrolle) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgt mit dem Haushaltsgen Calnexin. Von Calnexin wird eine Eichkurve in verschiedenen Verdünnungen erstellt. Als Referenzwert wird Calnexin parallel in einem PCR-Ansatz amplifiziert. Die Werte des zu bestimmenden Gens werden gegen Calnexin normalisiert und als so genannte relative Expression in der jeweiligen cDNS dargestellt.

Die quantitative PCR wurde mit dem LightCycler™-System am Forschungszentrum Penzberg der Roche Diagnostics GmbH durchgeführt. Für die Pankreasgewebe aus Ulm (T. Gress, Innere Medizin, Universität Ulm) wurde die dort implementierte und angewandte TaqMan®-PCR-Technologie verwendet.

2.1.6 5´-RACE-PCR

Mit der Methode der RACE-PCR ist es möglich, die noch unbekannten 5´- (5´-RACE) oder 3´-Enden (3´-RACE) von cDNS-Fragmenten zu identifizieren.

Die 5´-RACE-PCR wurde angewandt, um die 5´-cDNS des Transkripts *LKW* zu isolieren. Die Durchführung erfolgt laut Herstellerangaben (Invitrogen). Für die Erststrang-Synthese der cDNS wird DNase I-behandelte Gesamt-RNS unter Verwendung von genspezifischen Primern und SuperScript™ II-Polymerase eingesetzt. Anschließend wird die cDNS ‚getailed' um eine Bindestelle für den ‚Abridged Universal Amplification Primer'

(AUAP) zu generieren. Um störende Sequenzen und Nukleotide zu entfernen, wird nach der Erststrang-cDNS-Synthese das Produkt von nicht-inkorporierten dNTP und Primermolekülen gereinigt. An das 3´-Ende der aufgereinigten cDNS wird mit Hilfe der TdT ein Homopolymer aus Cytosinen synthetisiert. Die getailte cDNS wird dann mit einem genspezifischen nested-Primer, der 3´ des ersten Primers bindet, und dem Deoxyinosin enthaltenden Anker-Primer (AUAP) amplifiziert. Das 5´-RACE-Produkt wird über ein Agarosegel gereinigt, in den PCR 2.1-Vector (Invitrogen) kloniert und sequenziert.

2.1.7 Klonierung von cDNS in Plasmide

Zur Spaltung von Plasmid-DNS werden 1-2 µg DNA für 1 h mit 1-5 U der geeigneten Restriktionsendonukleasen in einem Gesamtvolumen von 20 µl versetzt. Die Inkubation der Restriktionsansätze erfolgt bei der Enzym-spezifischen Temperatur und mit den vom Hersteller empfohlenen optimalen Reaktionspuffern. Zur gleichzeitigen Spaltung von DNS mit zwei Restriktionsendonukleasen wird ein Reaktionspuffer verwendet, in dem beide Enzyme optimale Aktivität besitzen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese.
Für die Klonierung wird entweder der TOPO TA Cloning Kit verwendet und die Klonierung exakt nach Anleitung durchgeführt, oder die Ligation und Transformation werden nach folgendem Protokoll durchgeführt. Für die Ligation werden Fragment und Vektor in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:3 miteinander vermischt. Die einzusetzende Fragmentmenge berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Fragmentmenge (ng)} = (1\text{-}3) \times \frac{\text{Länge des Fragments (bp)} \times 50 \text{ ng Vektor}}{\text{Länge des Vektors (bp)}}$$

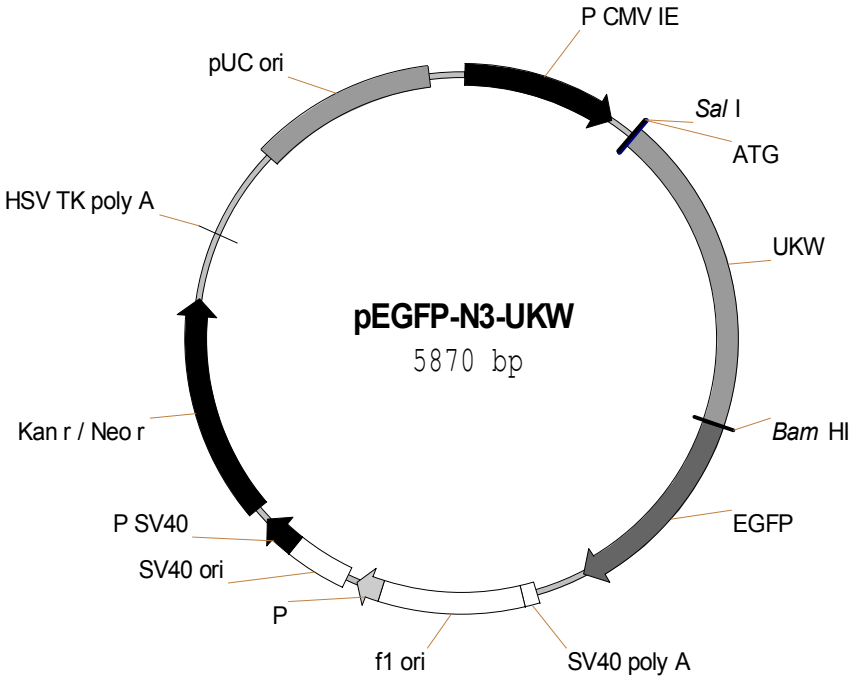
Das gewählte Verhältnis richtet sich nach der Fragmentgröße. Die Ligation wird mit 1x Ligationspuffer und 1 U T4-DNS-Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 µl angesetzt. Der Ligationsansatz wird bei 4°C über Nacht inkubiert.
Für die Transformation werden 10 µl des Ligationsansatzes, 40 µl 20 mM Tris pH 7.5 und 120 µl XLI blue Ca^{2+}-Zellen eingesetzt. Dieser Reaktionsansatz wird für 20 min auf Eis inkubiert, 1 min bei 42°C temperiert und 5 min bei RT belassen. Anschließend wird nach Zugabe von 1 ml LB-Medium dieser Ansatz für 1 h bei 37°C unter ständigem, leichtem Schütteln inkubiert. Danach wird der Ansatz auf eine LB-Agarplatte (mit entsprechendem Antibiotikum versehen) ausgestrichen und bei 37°C über Nacht

inkubiert. Am nächsten Tag werden 10 einzelne Klone dieser Agarplatte entnommen und in je 5 ml LB-Medium (enthält entsprechendes Antibiotikum) angeimpft und ebenso bei 37°C über Nacht schüttelnd inkubiert. Anschließend wird diese Bakterienkultur abzentrifugiert.

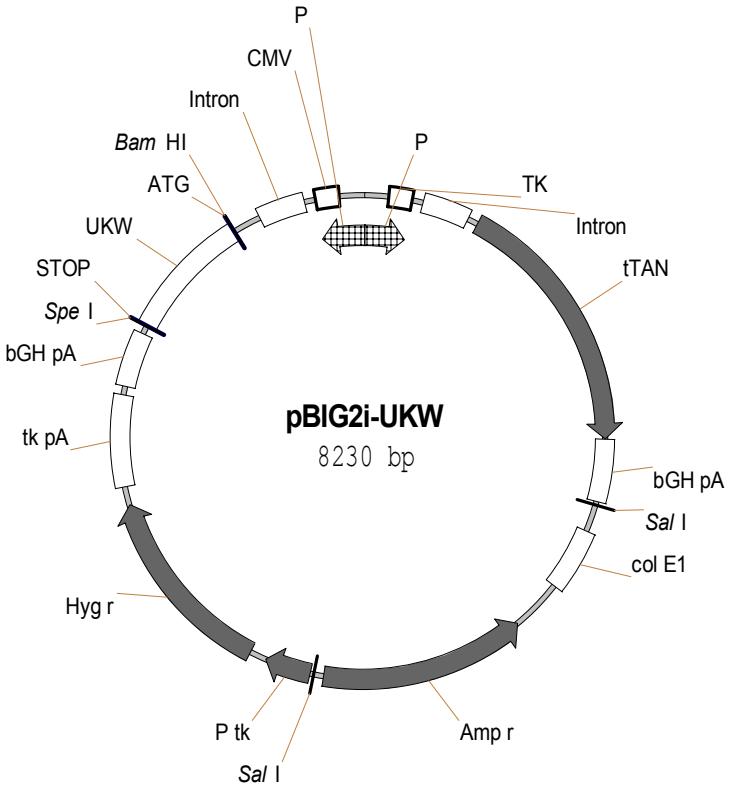
Die *UKW*-cDNS wurde mittels PCR aus pCR2.1 in den Expressionsvektor pEGFP-N3 (Clontech) bzw. den Vektor pBIG2i (Prof. Dr. T. Gress, Innere Medizin, Universität Ulm) kloniert. Die resultierenden Plasmide wurden als pEGFP-N3-UKW und als pBIG2i-UKW bezeichnet.

Die Erklärungen für die in den Plasmidkarten verwendeten Abkürzungen lauten:

pEGFP-N3: $P_{CMV\ IE}$: Cytomegalovirus immediate-early Enhancer/Promotor; EGFP: Enhanced green fluorescent protein Gen; SV40 pA: SV40 Polyadenylierungssignal; Kan^r/Neo^r: Kanamycin/Neomycin Resistenzgen; HSV TK pA: Herpes simplex virus thymidine kinase Polyadenylierungssignal; pUC ori: Plasmid replication origin.



pBIG2i: P_{TK}: Tetracycline-responsive herpes simplex virus thymidine kinase Promotor; tTAN: Tetracycline-responsive Transaktivator; bGH pA: Bovine growth hormone Polyadenylierungssignal; col E1: Origin of replication; Amp^r: Ampicillin Resistenzgen; P_{tk}: Thymidinkinase Promotor; Hyg^r: Hygromycin phosphotransferase Resistenzgen; tk pA: Thymidinkinase Polyadenylierungssignal; P_{CMV}: Cytomegalovirus immediate-early Enhancer/Promotor.



2.1.8 Affymetrix GeneChip®

2.1.8.1 Das Prinzip der Microarrays

Die Microarray-Technik beruht auf der komplementären Basenpaarung von Nukleotidsequenzen. Liegt ein Nukleinsäuresegment als Einzelstrang vor, so kann nur der zu diesem Segment komplementäre Strang binden. Ist nun die genaue Sequenz eines Stranges bekannt, so kennt man im Falle der Bindung auch die Sequenz des gebundenen Nukleotidstranges. Ist es nach Reaktion einer bekannten Nukleinsäure (Sonde) mit einer Mischung unbekannter Nukleinsäuren zur Bindung gekommen, müssen in der Mischung Nukleinsäuremoleküle vorhanden sein, deren Basensequenz komplementär zu jener der Sonde ist.

Bei Affymetrix-Microarrays handelt es sich um kleine Glasträger ca. in der Größenordnung von 1,3 x 1,3 cm. Auf dieser Oberfläche befinden sich bis zu 300.000 voneinander abgetrennter Zellen (Spots). Auf jedem dieser Spots ist eine DNS-Probe bekannter Sequenz als Sonde fest angeheftet. Die DNS-Sonden werden durch PCR oder Klonen hergestellt und dann mittels eines Roboters zielgenau auf die richtige Zelle des Microarrays aufgebracht. Die dabei entstehenden cDNS-Arrays werden vor allem zur Genexpressionsanalyse eingesetzt.

Der Array wird mit zu testender RNS versetzt. Anschließend wird der Array gewaschen. Dadurch verbleiben nur die gebundenen Nukleinsäuren der Testsubstanz auf dem Spot und lassen sich nach dieser als Hybridisierung bezeichneten Phase auf dem Array nachweisen. Der Nachweis ist möglich, da die Nukleinsäuren der Testsubstanz vor der Hybridisierung mit Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden. In der Literatur über Microarrays werden die beiden miteinander in Wechselwirkung tretenden Nukleotidsequenzen in verschiedener Funktion als ‚Probe' und ‚Target' bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit soll für die fest auf dem Array verankerte DNS (Sonde) mit bekannter Sequenz der Begriff ‚Probe' und für die markierte Testsubstanz mit unbekanntem Sequenzspektrum die Bezeichnung ‚Target' reserviert sein.

Um Verwirrungen zu vermeiden, soll noch erwähnt werden, dass es sich bei dem Begriff GenChip® lediglich um eine Analogie zum Chip der Mikroelektronik handelt. Hiermit soll verdeutlicht werden, dass in Anlehnung an die Transistoren des elektronischen Chips auf kleinstem Raum eine unvorstellbar große Anzahl von biologischen 'Bauelementen' - nämlich den DNS-Sonden - untergebracht ist.

2.1.8.2 Genexpressionsanalyse mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie

Bei der Affymetrix GeneChip® Array Technologie werden im Wesentlichen folgende Schritte durchlaufen. Eine schematische Übersicht gibt Abbildung 2.

(1) Auswahl der zu untersuchenden Zellpopulation

(2) Isolierung der mRNS und Reverse Transkription

(3) Markierung

(4) Hybridisierung

(5) Scannen des Microarrays

(6) Analyse, Interpretation der gewonnenen Daten

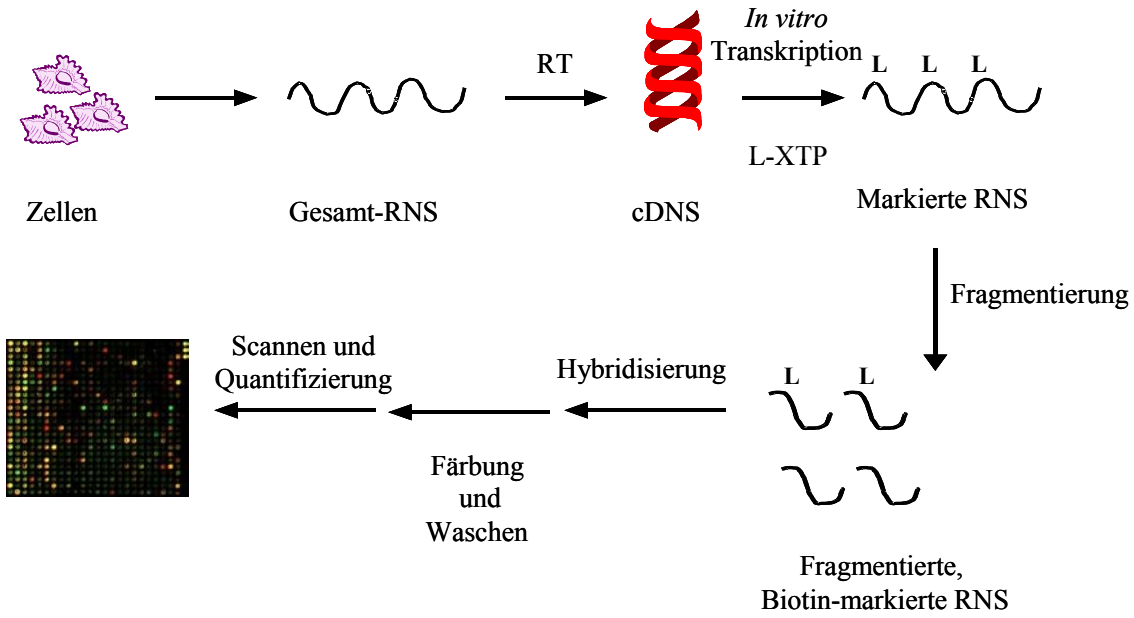


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Ablaufs eines Microarrayversuches.

Ziel des Experimentes ist die Untersuchung der Genexpression bestimmter Zellen, d.h. man möchte wissen, welche Gene in diesen Zellen transkribiert und damit aktiviert sind. Die zu untersuchenden Zellen entstammen Zellkulturen, Blut, chirurgischen oder pathologischen Gewebspräparaten. In diesen Zellen vorkommende mRNS wird mit Hilfe der Affymetrix GeneChip® Array Technologie quantitativ erfasst. Nur exprimierte Gene führen zur Bildung einer entsprechend komplementären mRNS, also lässt sich die Expression dieser Gene nachweisen.

Zunächst muss die in der Zellpopulation vorliegende mRNS von den restlichen Zellbestandteilen und anderer RNS isoliert bzw. gereinigt werden. Ein Problem ist die oft sehr geringe Menge der verfügbaren mRNS, welche auf alle Arrayspots verteilt werden muss. Da RNS sehr instabil ist und innerhalb kürzester Zeit enzymatisch gespalten wird, muss sie vor der Hybridisierung in die stabile DNS zurück geschrieben werden. Das wird mit dem Enzym Reverse Transkriptase bewerkstelligt. Die durch die reverse Transkription entstehende DNS wird als cDNS bezeichnet.
Der Array wird mit den markierten cDNS-Targets versetzt. Bei Komplementarität zwischen Probe und Target erfolgt die Bindung.
Um die am Affymetrix GeneChip® Array gebundene cDNS nachweisen zu können, wird sie nach der Hybridisierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Anschließend wird jeder Spot in einem konfokalen Lasermikroskop ausgewertet.

2.1.8.3 Gesamt-RNS-Präparation

Die Gesamt-RNS wird aus gefrorenen Zellen unter Verwendung des 'RNeasy Mini Kit' (Qiagen) isoliert (s. 2.1.1) und anschließend wird mit dem 'cDNA Synthesis System Kit' (Roche Diagnostics) die cDNS synthetisiert. Hierfür wird ein Oligo(dT_{24}) Primer, welcher eine T7-RNS-Polymerase-Promotorstelle aufweist, verwendet. Die Doppelstrang-cDNS wird mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (pH 8,0) und anschließender Ethanol-Präzipitation (über Nacht, -20°C) gereinigt. Die Reinigungsschritte wurden anhand des entsprechend modifizierten Protokolls des ‚High Pure RNA Tissue Kit' (Roche Diagnostics) durchgeführt. Die Synthese der biotinylierten komplementären RNS erfolgt durch *in vitro* Transkription (IVT) mittels T7 RNS Polymerase unter Zusatz von Biotin-11-CTP und Biotin-16-UTP. Die Biotin-markierte cRNS wird über ‚RNeasy-Mini-Spin' Säulen (Qiagen) gereinigt und anschließend in 50 bp-RNS fragmentiert. Hierfür wird die cRNS in Fragmentierungs-puffer bei 94°C für 35 Minuten inkubiert. Der Hybridisierungslösung wird eine Mischung aus vier Kontroll-cRNS für Bakterien- und Phagen-Gene (BioB, BioC, BioD und Cre, je 1,5, 5, 25 und 100 pM) zugesetzt, die der Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Arrays und der Hybridisiereffizienz dienen. Das Biotin-markierte Oligonukleotid B2 wird ebenso auf den Affymetrix GeneChip® Array hybridisiert. Es hybridisiert an den Ecken des Arrays und ermöglicht so ein genaues Ausrichten und Zuordnen der gespotteten Oligonukleotide.

2.1.8.4 Array-Hybridisierung und Scannen des Oligonukleotid-Chips

Die Hybridisierungslösung wird zuerst für 5 Minuten bei 99°C denaturiert und danach für 5 Minuten bei 45°C temperiert und anschließend 5 Minuten bei 14.000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Ein Aliquot der Hybridisierungslösung (10 µg fragmentierte cRNS in 200 µl Hybridisierungslösung) wird für 16 Stunden bei 45°C unter ständigem Rotieren auf den Affymetrix GeneChip® Array hybridisiert. Laut Herstellerangaben (Affymetrix®) wird der Array mehreren Waschschritten unterzogen und hintereinander in einer 'Sandwich-Reaktion' mit Streptavidin, biotinyliertem Ziege anti-Streptavidin Antikörper und Streptavidin-Phycoerythrin in der ‚Affymetrix® Fluidics Station' gefärbt. Der Array wird dann mit einem Argon-Laser gekoppelten konfokalen Mikroskop eingescannt.

2.1.8.5 Auswertung der Affymetrix®-Daten

Die digitalisierten Abbildungen werden mittels ‚Affymetrix® Microarray Suite 4.0 Software' ausgewertet. Die Qualität der cRNS wird bestimmt, indem die Hybridisierungseffizienz über die Hybridisierverhältnisse an Oligonukleotide für 5´-, Mitte- und 3´-β-Actin und GAPDH ermittelt wird. Voraussetzung für eine gute cRNS-Qualität ist ein 3´/5´-Verhältnis das maximal 3 beträgt. Für jede Zelllinie werden Dreifachbestimmungen durchgeführt. In Vergleichsanalysen mit der ‚Roche-Affymetrix-Chip-Experiment-Analysis-Software' (RACE-A) wird die Fluoreszenz-Intensität eines jeden Arrays identischen Typs auf eine einheitliche Intensität normalisiert. Der mRNS-Expressionslevel eines Transkripts wird in Bezug gebracht zu dem Wert der ‚Average Difference' (avg diff) des Hybridisierungssignals. Die ‚Average Difference' misst den Mittelwert der Fluoreszenzintensität zwischen dem sogenannten ‚Perfect Match' und dem ‚Missmatch' eines Oligonukleotidpaares. Zur Ermittlung differentiell exprimierter bekannter Gene wird eine ‚Fold Change' von $\geq$ 2,5 und $\leq$ 2,0 gewählt. Die ‚Fold Change' beträgt für die Ermittlung der ‚expressed sequence tags' I3I. Die ‚Change Factor Quality' (chgfq) beträgt $\geq$ 2. Im Falle eines Anstiegs der Expression wird die ‚Fold Change' wie folgt berechnet: [avg_diff_n_avg_'cond2']/[avg_diff_n_avg_'cond1'-1]. Im Falle einer Abnahme wird die ‚Fold Change' ermittelt als: -[avg_diff_n_avg_'cond1']/[avg_diff_n_avg_'cond2'+1]. Avg_diff_n_avg ist der Durchschnitt der normalisierten und avg_diff der Durchschnitt aller Dreifachbestimmungen. Die Chgfq gibt das Verhältnis [avg diff change zwischen zwei cRNS-Proben]/[Summe der beiden avg diff Standardabweichungen] für jedes Oligonukleotidpaar an.

2.1.9 Isolierung von cDNS-Klonen aus einer cDNS-Bank

Das Durchmustern einer cDNS-Phagen-Bibliothek wird exakt nach dem ‚Lambda Library User Manual' (Clontech) durchgeführt. Es wird dafür eine kommerzielle cDNS-Bank aus der Gebärmutter in Vektor λgt11 verwendet.

Zunächst werden 10 ml LB-Medium, 10 mM $MgSO_4$,und 0,2 % Maltose mit kompetenten Bakterien *E.coli* Y1090r$^-$ in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben bei 37°C über Nacht inkubiert. Eine Verdünnungsreihe aus einem Aliquot der Phagen-Bibliothek (10^{-2} bis 10^{-6}) wird in ‚Lambda Dilution Puffer' hergestellt. Die einzelnen Verdünnungsstufen werden auf LB-Agar-$MgSO_4$-Platten (10 mM) ausplattiert und für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch die Lyse der Bakterien entstehen charakteristische Phagenplaques (pfu = plaque forming units), so dass anhand des Verdünnungsfaktors der Titer der Phagen-Bibliothek errechnet werden kann. Das Ausplattieren der Phagen auf 82-mm-Petrischalen ist identisch zur Vorgehensweise bei der Bestimmung des Titers. Eine definierte Phagenkonzentration (10.000 pfu/Platte) wird in 100 µl ‚Lambda Dilution Puffer' und 200 µl *E.coli*-Übernachtkultur für 15 Minuten bei 37°C inkubiert, danach mit 50°C temperierter LB-Soft-Top-Agarose versetzt und nach Ausplattieren auf eine LB-Agar-$MgSO_4$-Platte bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wird die Phagen-DNS zur Doppelbestimmung auf 2 Nitrocellulosefilter transferiert. Diese Nitrocellulosefilter werden für 5 Minuten mit Denaturierungslösung und Neutralisierungslösung und danach für 10 Minuten mit 2 x SSC behandelt. Die Fixierung der Phagen-DNS auf die Filter erfolgt mittels UV-Bestrahlung im Transiluminator. Die Hybridisierung und Analyse der Filter wird mit einer DIG-markierten Sonde durchgeführt und zur Visualisierung ein Röntgenfilm aufgelegt. Entsprechend der positiven Signale, die durch Doppelbestimmung ermittelt werden, werden die zugehörigen Phagenplaques auf den Agarplatten identifiziert und mit einer Pasteurpipette gepickt. Diese Phagen-DNS wird in 1 ml ‚Lambda Dilution Puffer' aufgenommen, mit 10 µl Chloroform versetzt und bei 4°C über Nacht kann die Phagen-DNA in den Puffer diffundieren. Von dieser Suspension werden Verdünnungsreihen (10^{-4} bis 10^{-6}) hergestellt und erneut ‚gescreent'. Dieser Prozess wird so oft wiederholt bis ein Einzelklon sicher isoliert werden kann. Zur Herstellung der Phagenlysate werden die Phagen zur 90%igen Konfluenz auf 150-mm-Agarplatten ausplattiert und für 7 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 12 ml ‚Lambda Dilution Puffer' werden die Agarplatten bei 4°C über Nacht geschüttelt. Der Phagen-DNS-enthaltende ‚Lambda Dilution Puffer' wird nach dem Qiagen-Protokoll für die Lambda-DNS-Präparation weiterbearbeitet und die isolierte DNS sequenziert.

2.1.10 Analyse mit DIG-markierten Sonden

Die Membran wird zunächst für eine Stunde bei 42°C mit ‚DIG Easy Hyb' prähybridisiert. Die unter Verwendung des ‚PCR DIG Probe Synthesis Kit' hergestellten DIG-Sonden werden 5 Minuten bei 95°C denaturiert, sofort in frische Hybridisierungslösung gegeben (10 ng/ml ‚DIG Easy Hyb') und die Membran in dieser Lösung über Nacht bei 42°C inkubiert. Die Membran wird anschließend zweimal für 5 Minuten mit 2 x SSC, 0,1 % SDS bei Raumtemperatur und zweimal für 15 Minuten mit 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei 68°C gewaschen.

Die weiteren Schritte zur Detektion der DIG-markierten Sonden erfolgt wie vom Hersteller für das ‚DIG Wash and Block Buffer Set' beschrieben. Als Substrat dient 0,25 mM CSPD, welches durch die an die DIG-spezifischen Antikörper konjugierte alkalische Phosphatase (AP) umgesetzt wird und dabei Lumineszenz aussendet. Das Substrat wird direkt auf die Membran pipettiert, der Blot eingeschweißt und zur Visualisierung ein Röntgenfilm aufgelegt.

2.1.11 Northern-Blot-Analyse

10 µg Gesamt-RNS der zu untersuchenden Proben werden in parallelen Spuren auf ein 1%iges denaturierendes Formaldehyd-Agarosegel aufgetragen und in 1 x MOPS bei 100 V elektrophoretisch getrennt. Die RNS wird mittels Kapillartransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran ‚BrightStar-Plus™' übertragen. Nach dem Transfer wird die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen und im Stratalinker UV-fixiert. Die Hybridisierung der Membran erfolgt mit α-[^{32}P]dATP markierten cDNS-Proben, mit einem Einbau von mindestens 40 % und einer spezifischen Aktivität von 2 x 10^6 cpm/ml, unter Verwendung des ‚Strip-EZ™ DNA Kit' (Ambion). Die Vorhybridisierung (30 Minuten) und Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Probe wird mit der ‚ExpressHyb™ Hybridization Solution' bei 68°C über Nacht durchgeführt. Die Membran wird in Lösung 1 (2 x SSC, 0,05 % SDS) bei Raumtemperatur für 30 – 40 Minuten unter ständigem Schütteln und mehrmaligem Wechseln der Waschlösung gewaschen. Ein Waschschritt mit Lösung 2 (0,1 x SSC, 0,1 % SDS) bei 50°C für 40 Minuten folgt. Nach dem Waschen wird die Membran in Folie eingeschweißt und ein Röntgenfilm Cronex Medical X-Ray Film (Sterling Diagnostic Imaging Inc.) bei –70°C für 1 bis 72 Stunden exponiert. Um einen Northern Blot erneut hybridisieren zu können, wird die DNS-Sonde vom Blot gestrippt. Dazu wird die Membran für 10 Minuten bei 95°C im Wasserbad in 0,1 x SDS geschwenkt, anschließend in 2 x SSC gewaschen und entweder erneut hybridisiert oder bei -2 0°C gelagert.

Identische Mengen an aufgetragener und transferierter RNS werden durch Rehybridisierung der Membran mit α-[^{32}P]dATP markierter GAPDH-cDNS bestätigt.

2.1.12 Genexpressionsanalysen mittels kommerzieller Blots

Um zelllinien- und gewebespezifische Expressionsprofile der neu identifizierten Gene zu evaluieren, werden verschiedene kommerziell erhältliche Blots verwendet.
Mit dem ‚Human Multiple Tissue Expression Array' (MTE^{TM}) (Clontech) ist es möglich, die relative Expression eines Transkripts in einem großen Spektrum an fötalen und adulten Geweben sowie in Tumorzelllinien zu untersuchen. Der MTE^{TM} Blot enthält 76 gewebespezifische Poly-(A$^+$)-RNS.
Die verschiedenen Blots werden mit einer α-[^{32}P]dATP markierten cDNS-Sonde nach Herstellerangaben hybridisiert und zur Kontrolle mit einer Ubiquitin-Probe rehybridisiert. Auf dem ‚Cancer Profiling Array' (Clontech) sind 240 Paare normaler cDNS und korrespondierender Tumor-cDNS von 13 verschiedenen Geweben aufgetragen. Die Hybridisierung und die Detektion erfolgt wie unter 2.1.11 beschrieben.

2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.1 Gesamtproteinextraktion aus Zellen

Um aus Säugetierzellen Lysate zu gewinnen, werden die entsprechenden Zellen in T-75-Flaschen ausgesät und bis zu einer 80%igen Konfluenz wachsen gelassen. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS erfolgt die Lyse des Zellrasens mit 500 µl RIPA-Puffer.
Die Zellen werden mit Hilfe eines Schabers vom Boden gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zu einer vollständigen Lyse der Zellen werden die Zellsuspensionen für 15 min unter gemäßigtem Schütteln bei 4°C inkubiert und anschließend unlösliche Fragmente in einem Zentrifugationsschritt bei 14 000 rpm, 4°C für 30 min abgetrennt. Die Lysate werden in frische Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert oder sofort nach Bestimmung des Proteingehaltes in eine SDS-PAGE eingesetzt.

2.2.2 Bestimmung des Proteingehaltes von Zelllysaten

Zur Quantifizierung des Proteingehaltes in Zelllysaten wird der ‚BCA Protein Assay Kit' von Pierce eingesetzt. Er basiert auf dem Prinzip der Reduktion eines Chromogens in einer schnellen Reaktion mit den aromatischen Aminosäuren Tyr und Trp (Peterson et al., 1983) und in einer langsamen Reaktion mit Kupfer-Chelatkomplexen der Aminosäureseitenketten und polaren Seitengruppen (Lowry et al., 1951). Zur Bestimmung der Eichreihe wird parallel zu den Proben BSA in 8 Verdünnungen (0,025 bis 2 mg/ml) eingesetzt. Reagenz A und B werden im Verhältnis 50:1 gemischt, mit Proteinproben versehen und nach 30 min Inkubation unter Lichtabschluss im *ELISA*-Plattenlesegerät bei 590 nm gemessen.

2.2.3 Western-Blot-Analyse

Die zu analysierenden Proteingemische werden zunächst in einer SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Dazu werden 4-12%ige Bis/Tris Fertiggele (Invitrogen) verwendet. Die Proben werden mit 5 µl 4 x-Ladepuffer und 2 µl ‚NuPAGE sample reducing agent' versetzt, denaturiert (10 Minuten bei 70°C) und auf das entsprechende Bis/Tris-Gel aufgetragen. Als Größenstandard dient der ‚Multicolored Proteinmarker' (Invitrogen). Die Elektrophorese erfolgt bei 100 V in 20 x Laufpuffer NuPAGE MES/SDS.

Anschließend werden die aufgetrennten Proteine mit der ‚Semidry-Blotting-Methode' unter Verwendung von Transferpuffer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, um mit spezifischen Antikörpern analysiert werden zu können. Die Membran wird unter Verwendung von 5 % Magermilch (in TBS) 2 Stunden blockiert, anschließend bei 4°C über Nacht mit dem entsprechenden Erstantikörper (in TBSM) inkubiert und nach viermaligem Waschen für je 5 Minuten in TBSTM mit dem POD-konjugierten Zweitantikörper (in TBSM) für 1,5 Stunden inkubiert. Der Blot wird viermal für je 5 Minuten in TBSTM und zweimal in TBS gewaschen. Spezifisch gebundene Antikörper werden mit dem ‚Lumi-Light Western Blotting Substrate' (Roche Molecular Biochemicals) unter Erzeugung eines chemilumineszenten Signals detektiert.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Zellkulturführung

Alle Zellen und Zelllinien werden in den unter 1.10 angegebenen Medien bei 37°C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bilden die adhärenten Zellen einen zu etwa 80 % konfluenten Zellrasen, werden sie mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst. Ein Teil der Zellen wird in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit frischem Medium versorgt und weiter kultiviert.
Zum Einfrieren der Zellen werden jeweils 2 x 10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (eiskalte Mischung aus 90 % FKS und 10 % DMSO) resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und in einem Kryobehälter bei -80°C eingefroren. Danach werden die Zellen in einem Stickstofftank gelagert.

2.3.2 Ermittlung der für die Selektion notwendigen Hygromycin-Konzentration

Für die Ermittlung der zur Selektion notwendigen Hygromycin-Konzentration, werden 1 x 10^5 SUIT-2 028-Zellen in mehrere 6-Lochplatten ausgesät. Nach 24 Stunden wird jeder 6-Lochplatte Hygromycin in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1-1,1 mg/ml) zugesetzt und die Zellen bei 37°C weiterkultiviert. Das Selektionsmedium wird täglich durch frisches ersetzt um abgestorbene Zellen zu entfernen. Nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen wird durch Auszählen der vitalen Zellen in einer Neubauer-Zählkammer untersucht, ab welcher Konzentration die Zellen sterben. Dieser Effekt trat ab einer Konzentration von 0,3 mg/ml auf, so dass zur Selektion der Transfektanten Medium mit einer Hygromycin-Konzentration von 0,3 mg/ml verwendet wurde.

2.3.3 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen mittels Lipofectamin2000

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Transfektionsmethode mit dem Lipofectamin2000-Transfektionsreagenz liegt das Prinzip der Lipofektion zugrunde. Die zu transfizierenden Zellen werden einen Tag vor Transfektion in eine WillCo-Schale™ mit Glasboden (17 mm Durchmesser; 2 x 10^5 Zellen pro Schale) ausgesät, so dass sie dann etwa 70 - 80 % konfluente Zellrasen bilden.
Für eine Transfektion werden je 250 µl serumfreies Medium mit 2 µl Lipofectamin2000 und 1 bzw. 2 µg Plasmid-DNS versetzt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die beiden Lösungen werden gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen werden mit Medium gewaschen und 500 µl serumfreies Medium zugegeben. Die Mischung wird schließlich tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert. Nach

6 Stunden Inkubation wird das Medium mit 1 ml serumhaltigem Medium aufgestockt und die Zellen für weitere 18 Stunden inkubiert. Die Transfektion wird mit Hilfe eines GFP-Expressionsvektors in der Durchflusszytometrie kontrolliert.

2.3.4 Herstellung stabil transfizierter SUIT-2 028-tet-on-Klone

Zur Herstellung stabil transfizierter SUIT-2 028-Klone, die den Rezeptor UKW unter der Kontrolle eines durch Doxycyclin-induzierbaren Promotors exprimieren, werden SUIT-2 028-Zellen verwendet. 2 x 10^6 SUIT-2 028-Zellen werden in mehrere T-75-Flaschen ausgesät, so dass sie 50 % konfluente Zellrasen bilden. Nach 24 Stunden wird für jeden Ansatz Lösung A (7,5 µg pBIG2i-UKW DNS, 1,9 ml serumfreies DMEM) und B (15,2 µl Lipofectamin 2000, 1,9 ml serumfreies DMEM) vorbereitet, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, beide Lösungen gemischt und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Nach Zugabe von 3,8 ml serumfreiem DMEM werden die mit DMEM gewaschenen Zellen damit überschichtet und bei 37°C inkubiert. Nach 6 Stunden wird die DNS-haltige Lösung mit 7,6 ml serumhaltigem DMEM aufgestockt. Auf den Zusatz antimikrobieller Zusätze wird während der Transfektion verzichtet. 24 Stunden nach der Transfektion wird durch Zusatz von Hygromycin (0,3 mg/ml) zum Kulturmedium mit der Selektion begonnen. Das Medium wird dann zum Entfernen abgestorbener Zellen regelmäßig gewechselt. Sind nach etwa zwei bis drei Wochen gut gewachsene Einzelkolonien zu sehen, werden diese mit Hilfe von Klonierungszylindern vereinzelt. Dazu werden die Zellen auf den Schalen vorsichtig mit PBS gewaschen. Über einzelne Klone werden dann die Zylinder gesetzt. Anschließend werden die Zellen mit einem Tropfen Trypsin/EDTA abgelöst und in eine 96-Lochplatte transferiert.

2.3.5 Proliferationstest

Um die Proliferation zu untersuchen, werden stabile SUIT-2 028-Transfektanten mit einer Konzentration von 1 x 10^4 Zellen/Loch in eine 96-Loch-Platte mit bzw. ohne Zugabe von Doxycyclin (2 µg/ml) ausgesät. In Anwesenheit von Doxycyclin wird *UKW* exprimiert. Die Zellzahl wird indirekt durch einen WST-1-Test (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Molecular Biochemicals) bestimmt. Von den Zellen wird bei diesem Test das Farbsubstrat WST-1, ein Tetrazolium-Salz, durch mitochondriale Dehydrogenasen in ein lösliches Formazanderivat umgesetzt, dessen Absorption photometrisch bestimmt werden kann. Die Absorption bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 620 nm) korreliert mit der Enzymaktivität und damit mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen.
Die Durchführung des Tests erfolgt wie vom Hersteller beschrieben.

2.3.6 Bestimmung der Generationszeiten

Die Generationszeiten werden durch Erstellen von Wachstumskurven mit Hilfe des WST-Tests ermittelt. Der WST-Test ermöglicht die indirekte Bestimmung von Zellzahlen.
Zum Erstellen der Wachstumskurven werden in einer 96-Lochplatte Dreifach-bestimmungen durchgeführt. 1 x 10^5 Zellen pro Vertiefung werden ausgesät und daraus 1:2 Verdünnungsschritte angelegt, bis zu einer Zellzahl von 195 Zellen pro Vertiefung. Insgesamt werden die Zellen in sechs Mikrotiterplatten pipettiert. Nach 24, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden nach dem Aussäen der Zellen wird ein WST-Test wie vom Hersteller angegeben durchgeführt. Nach Zugabe des Substrats WST-1 werden die Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend im *ELISA*-Reader die Absorption bei 450 nm gemessen.
Die bestimmten Absorptionswerte werden logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen und aus den daraus resultierenden Wachstumskurven die Generationszeit (g) mit folgender Formel berechnet:

$g = lg2\ (t_x - t_0) / lgA_x - lgA_0$, wobei A_x und A_0 die Absorption zu den Zeitpunkten t_x und t_0 sind.

2.3.7 Transwell-Migrationstest

Die Migrationsexperimente werden unter Verwendung der stabilen Transfektanten in Transwell-Kammern, wie von Manes et al beschrieben, durchgeführt (Manes et al., 1999). Die in dieser Arbeit verwendeten Transwell-Kammern (Costar, Cambridge, USA) bestehen aus einer 12-Loch-Zellkulturplatte und Filtereinsätzen, die eine Porengröße von 12 µm aufweisen.
Die Expression von *UKW* wird 24 h vor Beginn des Experiments mit 2 µg/ml Doxycyclin induziert. Die Zellen werden mit Trypsin-EDTA von dem Flaschenboden abgelöst und in serumfreiem Medium in der An- bzw. Abwesenheit von 2 µg/ml Doxycyclin resuspendiert. Je 1 x 10^5 Zellen (in 0,5 ml Medium) werden in die obere Kammer der Transwell-Platte ausgesät. In die untere Kammer wird 1,5 ml DMEM-Medium, das 5 % FKS enthält, mit bzw. ohne 2 µg/ml Doxycyclin gefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 72 h bei 37°C wird zur Quantifizierung der gewanderten Zellen für die obere Kammer (Filtereinsatz) und die untere Kammer (Platte) ein MTT-Test durchgeführt. Mit einem MTT-Test kann indirekt die Zellzahl bestimmt werden. Das Prinzip dieses Tests ist vergleichbar mit dem WST-1-Test. Durch die Umsetzung des Tetrazolium-Salzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) entsteht ein unlöslicher

Formazankristall, der mit einer Isopropanol-Lösung gelöst wird. Zur Durchführung des MTT-Tests werden 1/10 VT einer 5 mg/ml MTT-Lösung (in PBS) in die obere und untere Kammer gegeben. Die Platten werden für 4 h bei 37°C inkubiert. Die Formazankristalle, die sich an der Ober- und Unterseite der Membran bilden, werden anschließend in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, pelletiert und in 500 µl MTT-Solubilisierungspuffer über Nacht bei 37°C gelöst.
Die Absorption der solubilisierten Formazankristalle wird bei 550 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) in einem *ELISA*-Reader photometrisch bestimmt.

2.3.8 Matrigel-Invasionstest

Für den *in vitro* Invasionstest wird ein abgewandelter ‚Boyden-Kammer Test' in sogenannten Transwell-Platten durchgeführt. Diese bestehen aus einer 24-Loch-Zellkulturplatte und Filtereinsätzen, die eine Membran mit einer Porengröße von 8 µm aufwiesen. Zum Beschichten der Filtereinsätze wird Matrigel in eiskaltem PBS verdünnt, so dass die gewünschte Konzentration in einem Gesamtvolumen von 250 µl pro Vertiefung erreicht wird. Die Verdünnungen werden luftblasenfrei auf die Membran gegeben und durch Klopfen gleichmäßig verteilt. Die Transwells mit der Matrigelschicht werden über Nacht unter der Sterilbank getrocknet. Am nächsten Tag wird zum Rekonstituieren des Matrigels auf jeden Filtereinsatz 200 µl Medium gegeben, über die gesamte Oberfläche verteilt und 1 bis 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wird in die untere Kammer (Zellkulturplatte) des Transwells je 1,5 ml Medium gefüllt. Die Expression von *UKW* wird 24 h vor Beginn des Experiments mit 2 µg/ml Doxycyclin induziert. Die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und unter Verwendung von 0,4 % EDTA, 0,1 % BSA vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Die Zellen werden in 15-ml-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Danach werden diese zweimal mit PBS gewaschen, in einer adäquaten Menge Medium resuspendiert und 1×10^5 Zellen pro Filter (0,5 ml Medium) ausgesät. In die untere Kammer wird 1,5 ml DMEM-Medium, das 5 % FKS enthält, mit bzw. ohne 2 µg/ml Doxycyclin gefüllt. Die Ansätze werden für 72 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.
Im Anschluss wird zur Quantifizierung der gewanderten Zellen für die obere ‚Kammer' (Filtereinsatz) und die untere ‚Kammer' (Platte) ein MTT-Test durchgeführt. Dazu werden 150 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) in die untere Kammer und 50 µl in die obere Kammer pipettiert. Die Transwells werden für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Danach werden die an der oberen und unteren Membran gebildeten Formazankristalle zusammen mit dem Medium der entsprechenden Kammer in separate 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 1400 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die

Formazankristalle werden in je 500 µl Isopropanol durch Schütteln gelöst und jeweils 200 µl davon in eine Mikrotiterplatte überführt. Die Absorption wird bei 550 nm (Referenzfilter 690 nm) in einem *ELISA*-Reader gemessen. Nach Abzug des Absorptionswertes einer Hintergrundkontrolle (Ansatz ohne Zellen) wird die Invasionsfähigkeit der Zellen als ‚% Invasion' wie folgt berechnet:

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

2.3.9 Adhäsionstest

Die Expression von *UKW* wird 24 h vor Beginn des Experimentes mit 2 µg/ml Doxycyclin induziert. Die verschiedenen zu testenden Substrate (Kollagen I, Kollagen IV, Laminin, Fibronectin, Vitronectin) werden bis zur Konzentration von 40 µg/ml in PBS verdünnt, 50 µl davon in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben und zur Beschichtung bei 37°C im Brutschrank für eine Stunde inkubiert. Danach werden die Vertiefungen durch Zugabe von 100 µl 3 % BSA in PBS blockiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen werden dann mittels 0,4 % EDTA, 0,1 % BSA vom Flaschenboden gelöst und in einem Röhrchen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen werden gezählt, in serumfreiem Medium in einer Konzentration von 5 x 10^6 Zellen/ml resuspendiert, versehen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein (10 µM) und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Calcein ist ein zytoplasmatischer Zellmarker, der nach Einbau in die Zellen fluoresziert. Die markierten Zellen werden zweimal in serumfreiem Medium (37°C) gewaschen. Anschließend werden pro beschichtete Vertiefung 2,5 x 10^4 Zellen in der An- bzw. Abwesenheit von 2 µg/ml Doxycyclin (Dreifachbestimmung) ausgesät und zur Adhäsion für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Danach werden die nicht adhärierten Zellen sofort mit dem Medium von der Platte abgegossen, die Vertiefungen zweimal vorsichtig mit serumfreiem Medium gewaschen, 200 µl serumfreies Medium hinzugefügt und die Zahl der angehafteten Zellen durch Messen der Fluoreszenz ermittelt. Eine zweite Platte, in die parallel dieselben Zellen eingesät werden, dient dabei zur Bestimmung der Ausgangszellzahl. Die Absorption des gebildeten Calcein-Zellkomplexes wird bei 494 nm (Referenzwellenlänge 517 nm) im ELISA-Reader gemessen. Die Adhäsionsfähigkeit an ein bestimmtes Substrat wird in ‚% Adhäsion' wie folgt berechnet:

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

2.3.10 Poly-HEMA-Assay

Poly-HEMA wird in der Konzentration 0,5 % in 95 % EtOH verdünnt. 100 µl dieser Lösung (10 mg/ml Poly-HEMA) werden in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und 3 Tage bei 40°C verdampft. Die Platten werden danach zweimal mit PBS gewaschen und jeweils 200 µl Zellsuspension (1,5 x 10^3 und 3 x 10^3 Zellen) in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben. Die Zellen werden für 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 und 192 h bei 37°C inkubiert, anschließend zur Bestimmung der Zellzahl 20 µl WST-1-Reagenz zugegeben und nach 1h Inkubation bei 37°C vermessen.

2.3.11 Durchflusszytometrie

Zunächst wird ein GFP-Vektor in die Zellen transfiziert. Zur Messung der Transfektionseffizienz verschiedener Transfektionsreagenzien (FuGene, Lipofektin, Lipofectamin2000 und LipofectaminPlus) durch GFP-Expression wird der Durchfluss-zytometer FACScan von Becton Dickinson verwendet und die Ergebnisse in CellQuest ausgewertet.
Zur Quantifizierung GFP-positiver Zellen nach einer Transfektion werden diese geerntet, 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und anschließend in 500 µl Medium resuspendiert. Die Messung der GFP-Fluoreszenz erfolgt bei 488 nm und 100 mW. Tote Zellen werden mittels Negativkontrolle eliminiert und so der Anteil der GFP-positiven Zellen bestimmt.

2.3.12 Immunfluoreszenz

Der Nachweis der Expression von UKW-Protein erfolgt nach der Transfektion von Zellen mittels Immunfluoreszenz.
2 x 10^5 Zellen werden pro Schale ausgesät und am darauf folgenden Tag transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden 100 µl Medium entnommen, die Fluoreszenz-farbstoffe Hoechst (blaues Signal) und Bodipy TR (beide 5 µM in PBS) (rotes Signal) zugesetzt und das Medium wieder auf die Zellen pipettiert. Nach 5 Minuten Inkubation bei 37°C werden die Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen um überschüssigen Farbstoff und tote Zellen als mögliche Störeffekte beim späteren Mikroskopieren zu eliminieren.

Die Auswertung erfolgt am Fluoreszenz-Mikroskop Zeiss Axiovert 135, wobei GFP-Signale bei einer Absorptions-/Emissionswellenlänge von 488/507 nm und einer 64-fachen Vergrößerung analysiert werden. Der Hoechst-Farbstoff wird bei einer Absorptions-/Emissionswellenlänge von 350/461 nm und Bodipy TR bei 589/617 nm vermessen. Die Signale werden mit einer 3-CCD-Farbvideokamera aufgenommen und mit der Software MetaMorph ausgewertet.

2.4 Immunhistochemische Analyse

2.4.1 Herstellung artifizieller Gewebeschnitte für die histochemische Auswertung

1 x 10^8 Zellen werden in einer T175-Flasche kultiviert, trypsiniert und für 30 Sekunden bei 1000 rpm in einem Greinerröhrchen zentrifugiert. Das überstehende Medium wird entfernt und die Zellen in 0,5 ml humanem Plasma resuspendiert. Im Anschluss werden sofort 250 Units Rinderthrombin zugefügt, woraufhin ein Zellklumpen entsteht. Diese Zellklumpen werden über Nacht in gepufferter 4 % iger Formaldehydlösung fixiert und in einem Gewebeeinbettautomaten (Shandon, Frankfurt) weiter behandelt. Dort durchlaufen sie einen Entwässerungsvorgang und werden über Xylol in Paraffin überführt. Das verwendete Programm beinhaltet mehrere Schritte, wie sie unter 2.4.2 aufgeführt sind. Mit dem Unterschied, dass die Immersion jeweils 1,5 Stunden beträgt und im Anschluss an die Xylol-Behandlung zwei Paraffinschritte folgen. Im Anschluss daran werden die Organe in Paraffinblöcke eingebettet. Dies geschieht an einer Ausbettstation (Tissue-Tek, Niederlande), die im Wesentlichen aus einem heißen Paraffinbad, einer Kühlplatte und vorgeheizten Pinzetten und Metallförmchen besteht. Von dem in Paraffin eingebetteten Gewebe werden mit einem Schlittenmikrotom 2-4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf SuperfrostPlus-Objektträger aufgezogen, über Nacht bei 37°C getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

2.4.2 H & E Färbung

Es ist notwendig vor der Färbeprozedur, die in Paraffin eingelegten Schnitte zu entparaffinieren und zu rehydrieren. Hierfür werden die Schnitte 2 x 10 min in Färbeküvetten in Xylol deparaffiniert und anschließend jeweils 2 min in einer Ethanolreihe mit absteigender Konzentration (100 %, 90 %, 80 %, 70 %) inkubiert. Danach werden die Schnitte 2 x 2 min in Aqua dest. gewaschen.

Für die Färbung werden die Schnitte 20 min in Hämalaun nach Mayer getaucht und anschließend so lange mit Leitungswasser gespült (bläuen), bis die überschüssige Farbe entfernt ist. Danach werden die Schnitte kurz in Aqua dest. getaucht und zwischen 30

sec und 5 min (je nach Frische der Lösung) in Eosin-Lösung gefärbt. Um überschüssige Färbelösung zu entfernen, werden die Schnitte kurz in Aqua dest. gespült. Die Schnitte werden dann jeweils für 2 min in einer Ethanolreihe mit steigender Ethanolkonzentration (70 %, 80 %, 90 %, 2 x 100 %) dehydriert. Nach Inkubation für 2 x 5 min können die Schnitte in Tissue-Tek® SCA™ Coverslipper-Gerät eingedeckt und unter dem Mikroskop betrachtet werden.

2.4.3 Immunhistochemischer Nachweis

Die Paraffinschnitte werden wie bereits unter 2.4.2 beschrieben entparaffiniert und rehydriert. Zur Demaskierung der Antigene werden die Gewebeschnitte in 1 x Reveal für 20 min im Dampfgarer behandelt. Im Anschluß daran werden endogene Peroxidasen durch die Inkubation mit 3 % H_2O_2 für 5 min inaktiviert.

Da der verwendete Antikörper aus der Ziege stammt, wird für die Färbung das Goat-Serum ICH-Block Envision™ von DAKO verwendet. Dies verhindert eine unspezifische Bindung des Antikörpers. Hierzu werden die Schnitte 20 min bei RT inkubiert und anschließend das Blocking Serum vom Objektträger abgeschüttelt. Die Antikörperfärbung erfolgt über Nacht bei 4 °C mit dem in DAKO Antibody Diluent 1:30 verdünnten UKW-Antikörper.

Die Schnitte werden 10 min mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, dem Envision™ Anti-Rabbit IgG, inkubiert. Die Schnitte werden für 30 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert und anschließend 3 x 1 min mit TBST gewaschen. Für den Antikörpernachweis werden die Schnitte so lange mit DAB inkubiert, bis eine optimale Färbung erkennbar wird. Die Schnitte werden anschließend mit Hämalaun nach Mayer für 10 sec bis 1 min (je nach Frische der Lösung) gegengefärbt. Nach Behandlung mit Ethanol in der umgekehrten Reihenfolge der oben beschriebenen Alkoholreihe können die Schnitte mittels Coverslipper-Gerät eingeschlossen werden.

Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten neue und im Speziellen pankreastumorspezifische Gene gefunden und isoliert werden, die sich durch ihre differentielle Expression in dem humanen Pankreastumor-Modellsystem SUIT-2 007 und SUIT-2 028 auszeichnen. Solche pankreastumorspezifischen Gene sollten dann in Bezug auf ihre Funktion untersucht werden.

1. Erstellung eines Transkriptionsprofils bekannter Gene für das Zellsystem SUIT-2 007 und SUIT-2 028 mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie

Die beiden verwendeten isogenen Zelllinien unterscheiden sich in ihrem Metastasierungsgrad. SUIT-2 007 weist ein starkes Metastasierungspotenzial auf. SUIT-2 028 hingegen metastasiert nicht. Zunächst wurde das Pankreastumor-Modellsystem SUIT-2 007 und 028 durch Erstellung eines Transkriptionsprofils mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie unter Verwendung des HG-U-95-A-Arrays auf dessen Eignung zur Identifizierung von metastasierungs- und invasionsassoziierten Genen getestet. Auf diesem Chip sind Oligonukleotide von 12.000 Genen bekannter Funktion ‚gespottet'. Von den beiden Subklonen SUIT-2 007 und SUIT-2 028 wurde die mRNS in drei unabhängigen Isolierungen gewonnen und jeweils drei Hybridisierungen von SUIT-2 007 und SUIT-2 028 auf den Arrays durchgeführt. Es wurden damit insgesamt 6 Arrays hybridisiert. Um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren, wurde das Hybridisierungsmuster und die Intensität verglichen. Dabei wurde SUIT-2 028 als ‚Baseline' definiert. Insgesamt wurden so 9 Vergleiche angestellt und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse überprüft. Alle Gene, die in der metastasierenden Pankreastumorzelllinie SUIT-2 007 hochreguliert waren und eine ‚Fold Change' größer 2,5 aufwiesen bzw. Gene die im Vergleich zur nicht-metastasierenden Zelllinie SUIT-2 028 herunterreguliert waren und eine ‚Fold Change' kleiner -2,0 aufwiesen, wurden selektiert (siehe Material und Methoden). Von den 12.000 analysierten bekannten Genen waren 188 Gene in SUIT-2 007 überexprimiert und 119 Gene herunterreguliert. Diese differentiell exprimierten Gene wurden in folgende 11 funktionelle Klassen gruppiert und in den Kreisdiagrammen in Abbildung 3 dargestellt: Immunantwort, Proteasen/Inhibitoren, Koagulation/Angiogenese, Adhäsion, Zytoskelett, Transkription, Zellzyklus/Apoptose/Differenzierung, Rezeptoren, Signaltransduktion, Enzyme und Sonstige.

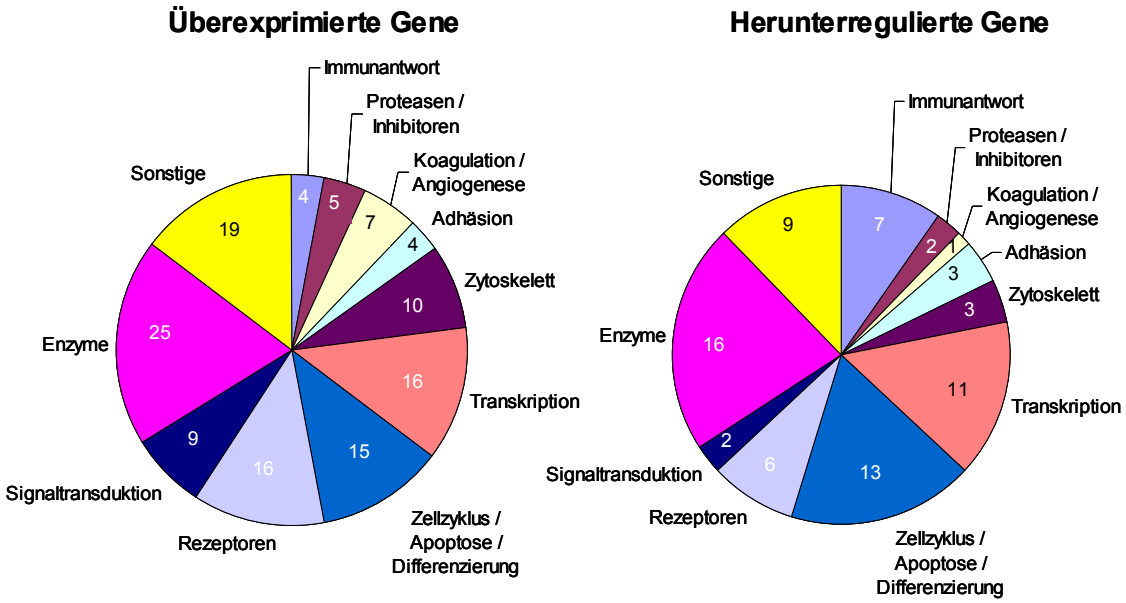


Abbildung 3: Kreisdiagramme zu dem Transkriptionsprofil der Zelllinie SUIT-2 028 im Vergleich zu SUIT-2 007. Nach Isolierung der mRNS der beiden Pankreastumorzelllinien SUIT-2 007 und SUIT-2 028 wurden deren Transkriptionsprofile mittels Array Technologie erstellt. Insgesamt wurden 12.000 Oligonukleotide von korrespondierenden Genen bekannter Funktion untersucht. Die beiden Zelllinien wurden sowohl anhand der Hybridisierungsmuster als auch anhand der Stärke der differentiell exprimierten Gene insgesamt neunmal miteinander verglichen, wobei SUIT-2 028 als Baseline gewählt wurde. Die bekannten Gene wurden in 11 funktionelle Klassen eingruppiert. Das linke Kreisdiagramm stellt die insgesamt 188 in der Zelllinie SUIT-2 007 überexprimierten Gene dar. Die 119 in der Zelllinie SUIT-2 007 herunterregulierten bekannten Gene sind im rechten Kreisdiagramm dargestellt.

Alle hochregulierten Gene der verschiedenen Kategorien sind in der Tabelle im Anhang Kapitel 2 wiedergegeben. Es zeigte sich, dass 4 Proteasen, darunter 2 Serin-Proteasen, in der metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 hochreguliert waren. Auffallend war die sehr hohe ‚Fold Change' von 88,8 der Matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1). Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist außerdem die Herunterregulierung des Inhibitor von Metalloproteinasen TIMP-3 mit einer Fold Change von -9,6. In der Kategorie Koagulation/Angiogenese sind die Gene Thrombomodulin, Koagulationsfaktor V, VEGF165R2 und dessen Ligand Semaphorin E stark überexprimiert, wohingegen der Inhibitor Thrombospondin-2 herunterreguliert ist. In die Kategorie Adhäsion wurden N-Cadherin und P-Selektin, ein Mediator der Adhäsion, eingruppiert. Zur gleichen Kategorie, jedoch in der metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 schwächer exprimiert, gehören die Mucine ‚pancreatic mucin' und ‚polymorphic epithelial mucin' (PEM). Eine sehr starke Überexpression des Mikrofilamentproteins, charakterisitisch für mesenchymales Gewebe, wurde für Vimentin in der Zelllinie SUIT-2 007 beobachtet. In der Kategorie Zellzyklus/Apoptose/Differenzierung wurde der Plättchenwachstumsfaktor (PDGF-A) mit einer Fold Change von 6,8 in der metastasierenden Zelllinie als

überexprimiert nachgewiesen. Die mRNS für Amphiregulin, TGF-β, beides Inhibitoren von Tumorwachstum, und Nip3 ein Apoptose induzierendes Protein, sind in der metastasierenden Zelllinie herunterreguliert (Plowman et al., 1990; Chen et al., 1997). Unter den Rezeptoren ist Mesothelin mit einer Fold Change von 6,5 hervorzuheben. Die mRNS für das Tumorsuppressorgen N33 ist in der metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 mit einer Fold Change von -2,5 herunterreguliert.
Mit diesen Ergebnissen konnte somit gezeigt werden, dass sich dieses Pankreastumor-Modellsystem zur Identifizierung neuer metastasierungs- und invasionsassoziierter Gene eignet.

1.1 Bestätigung der Microarray-Ergebnisse mittels Northern-Blot-Analyse

Beim Vergleich der Pankreastumorzelllinien SUIT-2 007 und SUIT-2 028 waren 188 Gene als hochreguliert und 119 Gene als herunterreguliert nachgewiesen worden. Als Qualitätskontrolle, für die mittels Microarray-Technologie generierten Daten, wurde die differentielle Expression einiger interessanter Gene mittels Northern-Blot-Analyse verifiziert. Dazu wurde die aus den beiden Pankreastumorzelllinien stammende Gesamt-RNS mittels Northern-Blot wie beschrieben auf einer Membran immobilisiert. Die Filter wurden mit α-[^{32}P]dATP markierten Gen-spezifischen Sonden hybridisiert (siehe Material und Methoden). Abbildung 4 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Northern-Blots der 6 von insgesamt 10 untersuchten Genen, welche in der metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 überexprimiert waren (siehe Anhang Tabelle 7). Die Affymetrix-Ergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben und die zugehörigen Northern-Blot-Resultate darunter. Es zeigte sich, dass die mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie generierten Ergebnisse auf Northern-Blot-Ebene bestätigt werden konnten. Sehr stark wurde die Matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1) ausschließlich in der metastasierenden SUIT-2 007-Zelllinie und nicht in der nicht-metastasierenden SUIT-2 028-Zelllinie exprimiert (Abbildung 4 A). Einen ebenso sehr hohen mRNS-Spiegel in der SUIT-2 007-Zelllinie zeigte die Serinprotease wie in Abbildung 4 B dargestellt. Eine weitere auf Northern-Blot-Ebene überprüfte Deregulation wurde für die PC6A-Protease gezeigt. Laut Affymetrix-Daten wurde der Koagulationsfaktor V nur in der Zelllinie SUIT-2 007 exprimiert. Auch dieses Ergebnis konnte bestätigt werden. Abbildung 4 D zeigt keine detektierbare Expression in der nicht-metastasierenden Zelllinie SUIT-2 028. Mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie wurde ermittelt, dass der PDGF-A in der SUIT-2 028-Zelllinie eine schwache Expression aufwies, in der SUIT-2 007-Zelllinie hingegen 6,8-fach stärker exprimiert wurde. Wie aus Abbildung 4 E ersichtlich konnte dies

verifiziert werden. Desweiteren ist erkennbar, dass Vimentin in beiden Pankreastumorzelllinien exprimiert wurde, allerdings in Zelllinie SUIT-2 007 wesentlich stärker. Diese 25,2-fach stärkere Expression wurde auch auf den Microarrays beobachtet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie ermittelte, in SUIT-2 007 verglichen zu SUIT-2 028, hochregulierte Gene und deren ‚Fold Change'.

Gen	MMP-1	Serin-protease	Serin-protease PC6A	Koagulierungs-faktor V	PDGF-A	Vimentin
AC	M13509	D87258	U56387	M16967	X06374	Z19554
Fold Change	88,8	3,8	3,5	6,3	6,8	25,2
In SUIT-2 028	nicht exprimiert	exprimiert	exprimiert	nicht exprimiert	exprimiert	exprimiert

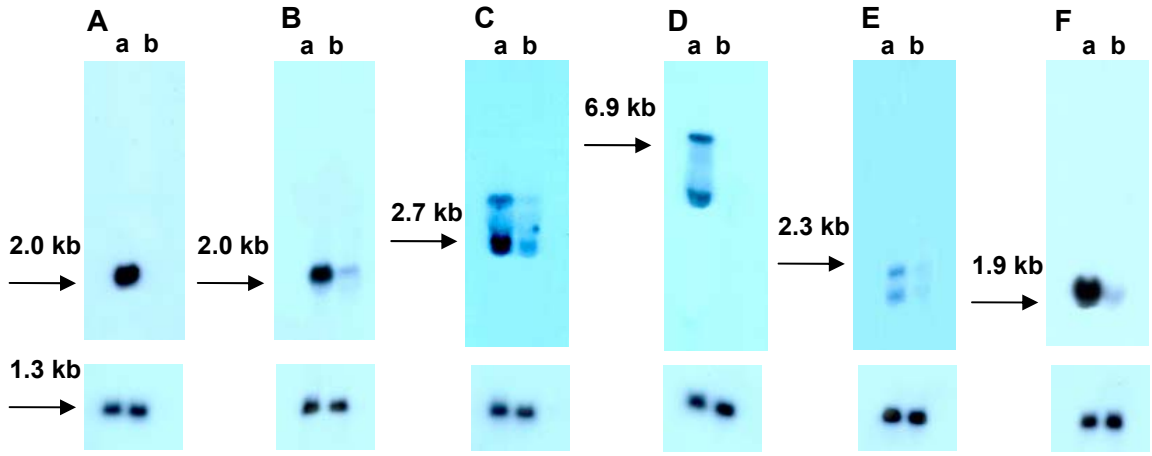


Abbildung 4: Northern-Blot hochregulierter Gene in der Zelllinie SUIT-2 007 zur Überprüfung der mittels Microarray-Technologie ermittelten differentiell exprimierten Gene. Pro Spur wurden 10 µg Gesamt-RNS der Pankreastumorzelllinien SUIT-2 007 (a) und SUIT-2 028 (b) aufgetragen und der Northern-Blot mit α-[^{32}P]dATP markierten Gen-spezifischen Sonden hybridisiert (siehe Material und Methoden). Untersucht wurden folgende Gene: MMP-1 (A), Serinprotease (B), Serinprotease PC6A (C), Koagulationsfaktor V (D), PDGF-A (E), Vimentin (F). Anschließend wurde der Blot zur Kontrolle der RNS-Menge gestrippt und mit einer GAPDH-spezifischen Sonde hybridisiert (1,3 kb). Die entsprechenden Accession Nummern (AC) der Gene wurden in der oben stehenden Tabelle angegeben.

In dieser Arbeit wurden ebenso Expressionsanalysen mittels Northern-Blot zu herunterregulierten Genen in der metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 zum Überprüfen der Affymetrix-Daten durchgeführt. Die Expression wurde von insgesamt 5 herunterregulierten Genen überprüft und konnte in allen bestätigt werden (siehe Anhang Tabelle 8). In Abbildung 5 sind exemplarisch 3 verifizierte differentiell exprimierte bekannte Gene dargestellt. Auch hier konnten die Affymetrix-Ergebnisse bestätigt werden. Die mRNS von Metalloproteinase TIMP-3 war laut Transkriptionsprofil, das mittels Microarray-Technologie im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurde, um das 9,6-fache schwächer in der metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 als in der nicht-metastasierenden Zelllinie SUIT-2 028. Dies ist in Abbildung 5 A und Tabelle 2 dargestellt. Die geringere Menge des Transkripts für den Tumorsuppressor MXI-1 aus der Affymetrix-Analyse konnte auch auf Northern-Blot-Ebene gezeigt werden. Gleiches bestätigte sich für Amphiregulin, ein Inhibitor aggressiven Tumorwachstums. Die Expression war auch hier sichtlich in der metastasierenden SUIT-2 007-Zelllinie im Vergleich zu SUIT-2 028 herunterreguliert. Auf dem Affymetrix GeneChip® Array wurde für Amphiregulin eine 2,8-fach geringere Expression ermittelt (Tabelle 2). Dies wurde rein visuell auf dem Northern-Blot verifiziert.

Tabelle 2: Mittels Microarray-Technologie ermittelte, in SUIT-2 007 verglichen zu SUIT-2 028, herunterregulierte Gene und deren ‚Fold Change'.

Gen	TIMP-3	MXI-1	Amphiregulin
AC	U14394	L07648	M30704
Fold Change	-9,6	-8,7	-2,8

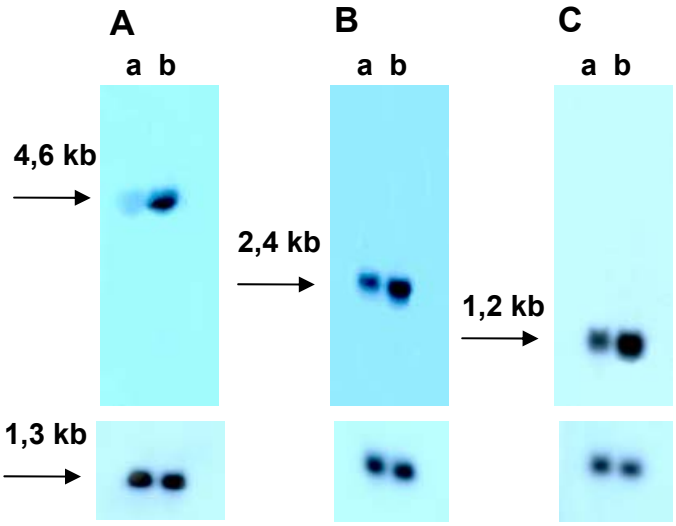


Abbildung 5: Northern-Blot zur Untersuchung herunterregulierter Gene in der Zelllinie SUIT-2 007. Pro Spur wurden 10 µg Gesamt-RNS der Pankreastumorzelllinien SUIT-2 007 (a) und SUIT-2 028 (b) aufgetragen und der Northern-Blot mit α-[^{32}P]dATP markierten Gen-spezifischen Sonden hybridisiert (siehe Material und Methoden). Untersucht wurden folgende Gene: Inhibitor von Metalloproteinasen-3 (TIMP-3) (A), MXI-1(B), Amphiregulin (C). Die Accession Nummern (AC) dieser Gene wurden in der oben stehenden Tabelle angegeben. Zur Kontrolle der RNS-Menge wurde anschließend der Blot gestrippt und mit einer GAPDH-spezifischen Sonde hybridisiert.

1.2 Die mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie identifizierten neuen Gene B1i (*UKW*) und B9d (*LKW*)

Nachdem sich das Pankreastumor-Modellsystem SUIT-2 007 und SUIT-2 028 wie in Kapitel 1.1 gezeigt, zur Identifizierung von Metastasierungs-assoziierten Genen als geeignet erwiesen hat, wurde das HG-U-95-Array-Set von Affymetrix hybridisiert. Dieses Array-Set, bestehend aus 4 Arrays, enthält insgesamt 50.000 expressed sequence tags (ESTs). Zunächst wurde die mRNS der beiden Subklone SUIT-2 007 und SUIT-2 028 isoliert und je Subklon drei unabhängige Hybridisierungen auf den 4 Arrays durchgeführt. Um Informationen über die Deregulation von 50.000 ESTs zu erhalten wurden somit 24 Arrays hybridisiert und ausgewertet. Die Vorgehensweise war identisch mit der bereits in Kapitel 1 beschriebenen, d.h. das Transkriptionsprofil der stark metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 wurde mit dem der nicht-metastasierenden SUIT-2 028-Zelllinie verglichen. Differentiell exprimierte Gene, die eine ‚Fold Change' von größer 3 und

kleiner -3 aufwiesen, wurden selektiert. Diese Grenze hatte sich bei den bekannten Genen als sinnvoll herausgestellt und wurde deshalb auch für die EST-Auswertung gewählt. Das erhaltene Expressionsprofil lieferte eine Liste mit 89 hochregulierten und 73 herunterregulierten ESTs, die als potenzielle Kandidatengene in Frage kamen (siehe Anhang Tabelle 9 und 10). Als nächstes Selektionskriterium galt die gewebespezifische Verteilung der ESTs. Da im Rahmen dieser Arbeit nach pankreastumorspezifischen Genen gesucht wurde, kamen ESTs, die hauptsächlich aus Pankreasgewebe isoliert wurden, in die engere Wahl. Ein weiteres Merkmal das bei der Auswahl funktionell nicht charakterisierter DNS-Abschnitte herangezogen wurde, war zum einen deren ausschließliche Expression in der metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 aber zum anderen auch deren Herunterregulierung. Denn die Analyse der bekannten Gene zeigte, dass nicht nur in der metastasierenden Zelllinie hochregulierte Gene eine interessante und mitunter entscheidende Rolle bei der Progression von Pankreastumoren spielen, sondern auch wichtige Gene herunterreguliert waren. Im Folgenden wurden die mittels Microarray-Technologie generierten differentiell exprimierten Gene auf deren Richtigkeit mittels Northern-Blot-Analysen überprüft. Von den 14 auf Northern-Blot-Ebene getesteten ESTs bestätigten sich 10 (B1i, B8i, C10i, E19i, E2i, B9d, B11d, D1d, D5d, E1d). Bei den restlichen 4 Transkripten korrelierten die Northern-Blot-Ergebnisse nicht mit den Affymetrix-Ergebnissen (B21i, E8i, B5d, C16d). Von den 10 bestätigten ESTs sind 5 in der metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 hochreguliert und 5 herunter-reguliert. Die zugehörigen Northern-Blots für die hochregulierten Gene B1i, E2i, B8i, C10i, und E19i sind in Abbildung 6 dargestellt. Die Transkripte der analysierten Gene hatten unterschiedliche Größen von 1,7 kb bis 5,1 kb, wobei das Gen zu C10i 3 Transkripte aufwies. Für die Gene B1i, E2i und B8i wurde bestätigt, dass sie nur in der metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 exprimiert werden. Abbildung 6 zeigt für diese Gene keine Expression in der nicht-metastasierenden Zelllinie SUIT-2 028. Für die Gene C10i und E19i ist hingegen eine schwache Expression in SUIT-2 028 zu verzeichnen. Die stärkste Hochregulierung zeigt Gen B1i sowohl auf dem Northern-Blot, als auch in der Affymetrix mit einer ‚Fold Change' von 98,7 (Tabelle 3). Aufgrund der starken Deregulation des B1i-Transkripts sollte im Rahmen dieser Arbeit die vollständige cDNS dieses neuen Gens, im Folgenden als *UKW* bezeichnet, isoliert werden.

Tabelle 3: In der Zelllinie SUIT-2 007 hochregulierte ESTs und deren ‚Fold Change'.

EST	B1i	E2i	B8i	C10i	E19i
AC	AA044830	AI656044	AF063527	AA469071	AI951161
Fold Change	98,7	13,5	9,3	4,9	3,5
In SUIT-2 028	nicht exprimiert	nicht exprimiert	nicht exprimiert	exprimiert	exprimiert

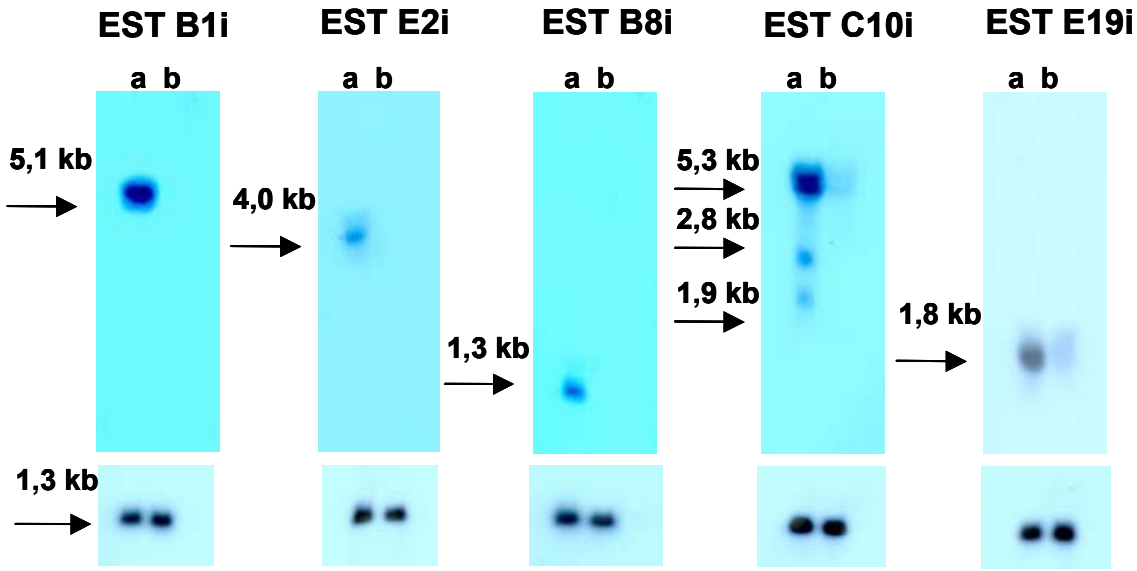


Abbildung 6: Northern-Blot hochregulierter ESTs in der Zelllinie SUIT-2 007 zur Überprüfung der mittels Microarray-Technologie ermittelten differentiell exprimierten unbekannten Gene. Die Accession Nummern der hier dargestellten ESTs wurden in der Tabelle 3 wiedergegeben. Pro Spur wurden 10 µg Gesamt-RNS der Pankreastumorzelllinien SUIT-2 007 (a) und SUIT-2 028 (b) aufgetragen und der Northern-Blot mit EST-spezifischen α-[^{32}P]dATP markierten Sonden hybridisiert (siehe Material und Methoden). Untersucht wurde die Deregulation und Größe des Transkripts von 5 funktionell nicht charakterisierten cDNS. Zur Kontrolle der RNS-Menge wurde der Blot mit einer α-[^{32}P]dATP markierten GAPDH-spezifischen Sonde hybridisiert. Die GAPDH-Sonde wurde in einer PCR unter Verwendung der Primer GAPDH-sense und GAPDH-antisense hergestellt.

Die Northern-Blots für die in der metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 herunter-regulierten Gene sind in Abbildung 7 dargestellt. Gen E1d zeigte 2 Transkripte der Größen 1,7 und 4,0 kb. Alle anderen Sonden wiesen nur ein Transkript nach. Gen B11d wurde nur äußerst schwach in der metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 exprimiert. Für Gen B9d wurde mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie eine ‚Fold Change' von -11,8 ermittelt. Dieser ‚Shift' ging auch deutlich, wie in Abbildung 7 zu sehen ist, auf Northern-Blot-Ebene hervor. Die Gene B11d, D1d und D5d waren ebenso in dem Pankreastumor-Zellsystem SUIT-2 007 und SUIT-2 028 mit einer Fold Change von -1,1, -8,6 und -4,9 stark dereguliert (Tabelle 4). Die mittels Microarray-Technologie

generierten Ergebnisse konnten somit in den Northern-Blot-Analysen bestätigt werden. Der Fokus wurde im Folgenden auf das B9d-Transkript gelegt, welches eine Größe von 2,3 kb aufwies und am stärksten in dem Pankreastumor-Zellsystem SUIT-2 007 und SUIT-2 028 herunterreguliert war. Dieses Gen wurde als *LKW* bezeichnet.

Tabelle 4: Mittels Microarray-Technologie ermittelte in der Zelllinie SUIT-2 007 herunterregulierte ESTs und deren Fold Change.

EST	E1d	B9d	B11d	D1d	D5d
AC	AA535031	AI949781	AI075039	AI744130	AA737831
Fold Change	-19,3	-11,8	-11,1	-8,6	-4,9

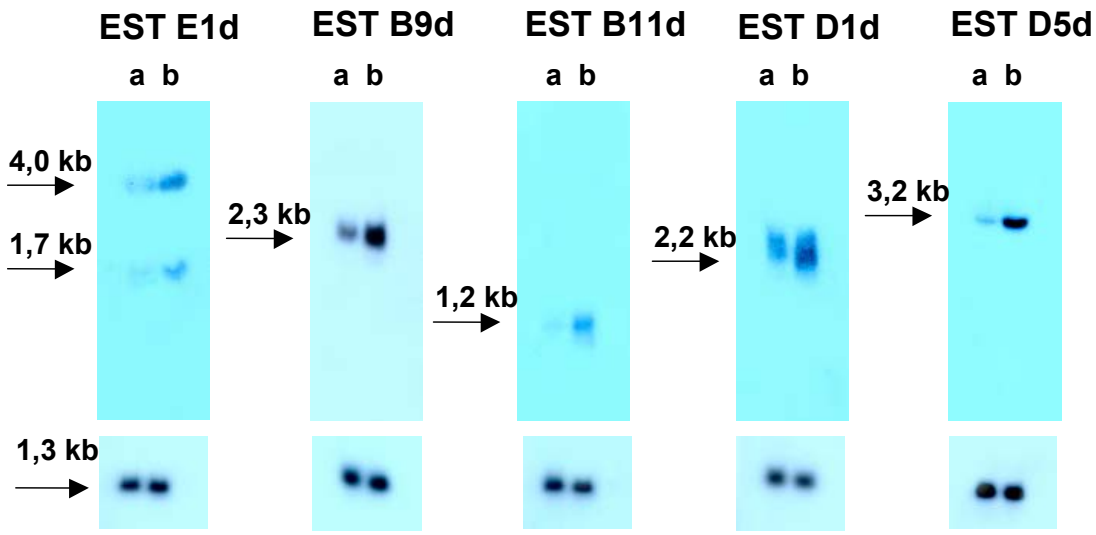


Abbildung 7: Northern-Blot zur Untersuchung herunterregulierter ESTs in der Zelllinie SUIT-2 007. Pro Spur wurden 10 µg Gesamt-RNS der Pankreastumorzelllinien SUIT-2 007 (a) und SUIT-2 028 (b) aufgetragen und der Northern-Blot mit α-[^{32}P]dATP markierten EST-spezifischen Sonden hybridisiert (siehe Material und Methoden). Untersucht wurde die Deregulation und Größe des Transkripts von 5 funktionell nicht charakterisierten cDNS (Accession Nummern (AC) in oben stehender Tabelle). Zur Kontrolle der RNS-Menge wurde der Blot mit einer α-[^{32}P]dATP markierten GAPDH-spezifischen Sonde hybridisiert. Die GAPDH-Sonde wurde in einer PCR unter Verwendung der Primer GAPDH-sense und GAPDH-antisense hergestellt.

2. Isolierung der vollständigen cDNS von *LKW* mittels 5´-RACE-PCR

Zunächst sollte die vollständige cDNS des in der metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 herunterregulierten Gens *LKW*, für welches das B9d-EST korrespondierte, isoliert werden. Da die vollständige cDNS von *LKW* aus Datenbankeinträgen in EMBL und GenBank nicht zusammengesetzt werden konnte, wurde die 586 bp cDNS-Sequenz des ESTs B9d (AC AI949781, EMBL Datenbank) als Grundlage zur 5´-RACE-PCR genommen, um die vollständige cDNS zu isolieren. Bei Durchführung einer 3´-RACE-PCR wurde bereits festgestellt, dass es sich bei dem EST um den 3´UTR des neuen Gens handelt. Deshalb wurden Oligonukleotide ausgesucht, die im 5´-Bereich des ESTs hybridisierten.

Das Oligonukleotid LKW2-antisense wurde in der Erststrangsynthese unter Verwendung von Gesamt-RNS von DNase-verdauten SUIT-2 028-Zellen eingesetzt. Die Zelllinie SUIT-2 028 wurde deshalb gewählt, da das Gen *LKW* in dieser Zelllinie stärker exprimiert wurde. Für die PCR wurde das Oligonukleotid LKW3-nested verwendet. Es wurden zwei Fragmente erhalten, welche in den Vektor pCR2.1 kloniert und anschließend sequenziert wurden (siehe Material und Methoden). Diese Sequenzanalysen zeigten, dass das größere Fragment mit einer Länge von 1250 nt nicht der cDNS von *LKW* entsprach, allerdings überlappte das kleinere Fragment mit einer Länge von 870 nt (Abbildung 8A) mit der cDNS des ESTs und enthielt das Stop-Codon nt 1397-1399 der *LKW*-cDNS. Somit konnte die cDNS von *LKW* von ursprünglich 586 bp auf 1365 bp verlängert werden. Da mit diesem Fragment in Datenbankrecherchen keine überlappenden Sequenzen gefunden wurden, wurden neue 5´-Primer für eine weitere 5´-RACE-PCR konzipiert.

Mittels der Primer LKW4-antisense und LKW5-nested wurden mehrere Produkte (390 nt, 538 nt, 749 nt, 1054 nt) generiert, deren Größe durch Auftrennung in einem Agarose-Gel bestimmt wurde (Abbildung 8B). Nach Isolierung dieser RACE-PCR-Fragmente und Klonierung in den pCR2.1-Vektor sowie anschließender Sequenzierung zeigte sich, dass das 538 nt-Fragment mit dem RACE-1-Produkt überlappte und das 3´-Ende des ORF enthielt. Mit diesem RACE-2-Produkt konnte die cDNS auf 1879 nt verlängert werden. Da diese Sequenz noch nicht das Start-Codon enthielt wurde eine dritte 5´-RACE-PCR mit den 5´-Primern LKW6-antisense und LKW7-nested durchgeführt.

Der Primer LKW6-antisense diente zur Erststrangsynthese und der Primer LKW7-nested wurde in der PCR eingesetzt. Es wurden zwei Produkte unterschiedlicher Größe (269 nt, 391 nt) amplifiziert (Abbildung 8C), wobei aus der Verlängerung der bisher generierten Sequenz mit dem 391 nt-Fragment der vollständige ORF hervorging. Die *LKW*-cDNS hat

somit eine Länge von 2304 nt und die kodierende Sequenz umfasst nt 326-1399. Alle in der 5´-RACE-PCR und zum Klonieren der *LKW*-Sequenz verwendeten Oligonukleotide wurden in die im Anhang stehende Sequenz eingezeichnet (Kapitel 7).

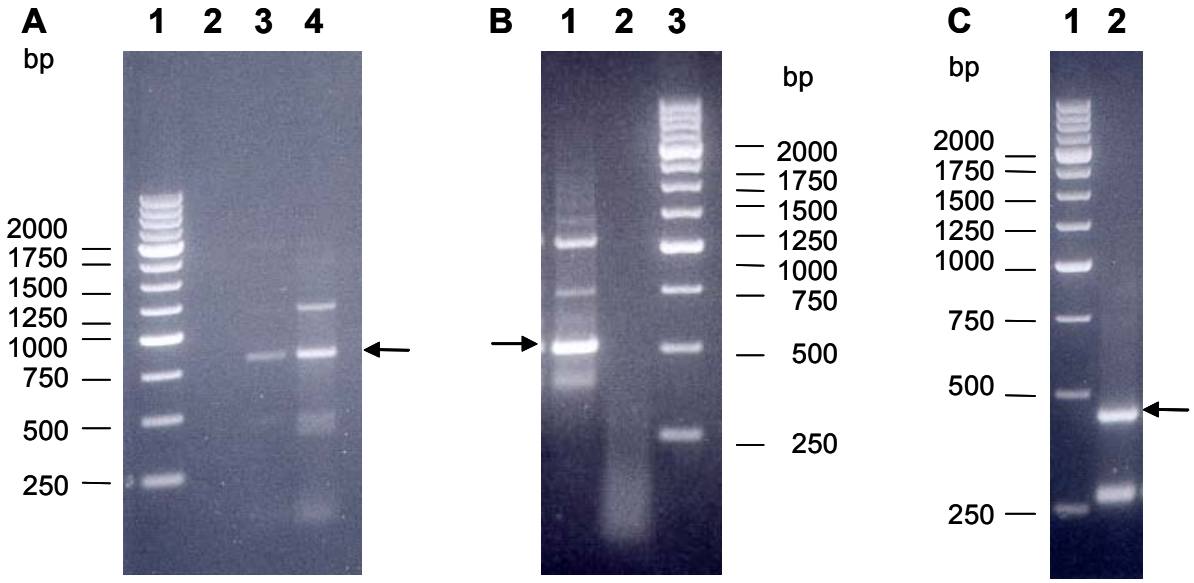


Abbildung 8: Agarose-Gelelektrophorese der 5´-RACE-PCR, durch die die cDNS von LKW generiert wurde. In der 5´-RACE-PCR wurde Gesamt-RNS von DNase-verdauten SUIT-2 028-Zellen eingesetzt. Die erhaltenen RACE-PCR-Fragmente wurden isoliert, in den pCR2.1-Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Die RACE-PCR-Produkte sind in den Abbildungen A (Spur 4), B (Spur 1) und C (Spur 2) mit Pfeilen gekennzeichnet.

A: Produkte der ersten 5´-RACE-PCR. In der ersten Spur wurde der DNS-Größenstandard XVI aufgetragen. Fragmente in den Spuren 2 und 3 wurden für diesen Versuch nicht verwendet. Spur 4 zeigt das nach der ersten 5´-RACE-PCR gewonnene Fragment mit der Größe von 870 nt.

B: Produkte der zweiten 5´-RACE-PCR. In der ersten Spur ist das nach der zweiten 5´-RACE-PCR erhaltene 538 nt-große Fragment zu erkennen. Spur 2 hat keine Aussagekraft. In der Spur 3 wurde der Größenstandard XVI aufgetragen.

C: Produkte der dritten 5´-RACE-PCR. Zur Ermittlung der Größe der erhaltenen Fragmente wurde in Spur 1 der Größenstandard XVI aufgetragen. Mit dem aus der dritten 5´-RACE-PCR gewonnene 391 nt-Fragment (Spur 2) konnte die *LKW*-cDNS auf eine Länge von 2304 nt vervollständigt werden.

2.1 Klonierung von *LKW*-ORF mittels RT-PCR

Um diese Sequenz über RT-PCR zu klonieren, wurden Oligonukleotide generiert, die im 5´- und 3´-Bereich des offenen Leserahmens hybridisierten. Als 5´- und 3´-Oligonukleotide wurden LKW9-sense (nt 326-343) und LKW9-antisense (nt 1478-1497) eingesetzt.
Diese Oligonukleotide wurden in einer RT-PCR unter Verwendung von DNase-verdauter Gesamt-RNS von SUIT-2 028-Zellen eingesetzt und ergaben eine Größe von 1173 nt. Die kodierende Sequenz wurde in den pCR2.1-Vektor kloniert und anschließend zur Überprüfung sequenziert.

2.2 Beschreibung der dual-spezifischen Kinase LKW

Das Gen *LKW* wird als 2,3 kb großes Transkript exprimiert. Es enthält nach dem 325 Basen umfassenden 5´untranslatierten Bereich (5´UTR) einen 1074 bp großen offenen Leserahmen, der für ein Protein mit 358 Aminosäuren kodiert (‚Algorithmus Translate'). Dieses Protein hat ein errechnetes Molekulargewicht von 40 kD.
Eine PROSITE-Analyse der Aminosäuresequenz von LKW ergab, dass LKW eine putative katalytische Serin/Threonin-Proteinkinasedomäne im Bereich 80-315 Aminosäuren und eine katalytische Tyrosinkinasedomäne im Bereich 141-305 Aminosäuren beinhaltet (siehe Anhang Abbildung 51). Aufgrund dieser Proteinstruktur und der starken Sequenzhomologie konnte LKW der Familie der dual-spezifischen Kinasen zugeordnet werden. Zu dieser Familie gehören neben den am besten untersuchten Proteinen ERK1 und ERK2 auch die Proteine SKIP, SPK1 und PYT. Gemeinsam sind diesen dual-spezifischen Proteinkinasen die konservierten Subdomänen II, VIA, VIB, VIII, IX und XI. Auf Proteinebene hat LKW mit SKIP1 die höchste Homologie in der katalytischen Domäne von 54,6 %. Des Weiteren wies LKW Sequenzhomologien auf mit ERK2 von 38,1 %, mit PYT von 35,5 %, mit SPK1 von 35,2 % und mit ERK1 von 34,1 %, wie in Abbildung 9 dargestellt.

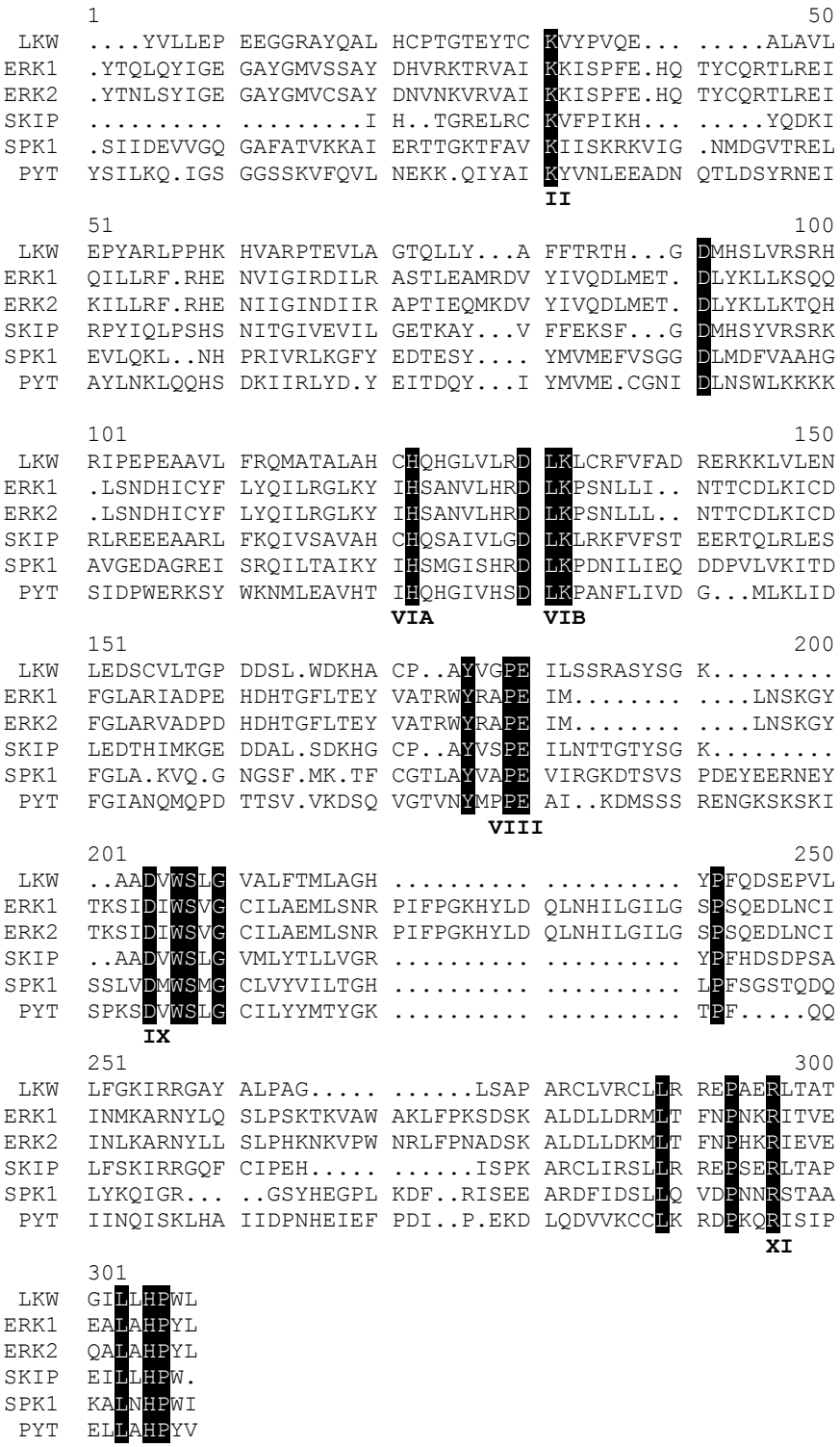


Abbildung 9: LKW als Mitglied einer dual-spezifischen Kinase-Genfamilie. Starke Homologiebereiche zu LKW finden sich zwischen den katalytischen Domänen von humanem ERK1, ERK2, SKIP, *S. cerevisae* SPK1 und humanem PYT. Identische Aminosäuren zwischen allen sechs homologen Proteinen sind schwarz unterlegt. Die römischen Ziffern unterhalb der Sequenzen beziehen sich auf die konservierten Subdomänen der dual-spezifischen Proteinkinasen. Die Punkte innerhalb der Sequenzen stellen Platzhalter dar, um die Sequenzhomologie zu veranschaulichen.

Aus der PROSITE-Analyse der Aminosäuresequenz von LKW (Abbildung 10) wurde ersichtlich, dass LKW sowohl fünf putative Protein Kinase-C-Phosphorylierungsstellen und fünf putative Caseinkinase II-Phosphorylierungsstellen beinhaltet. Desweiteren weist die Aminosäuresequenz ein putatives aktives Zentrum einer Serinprotease und Tyrosin-spezifischen Proteinphosphatase auf.

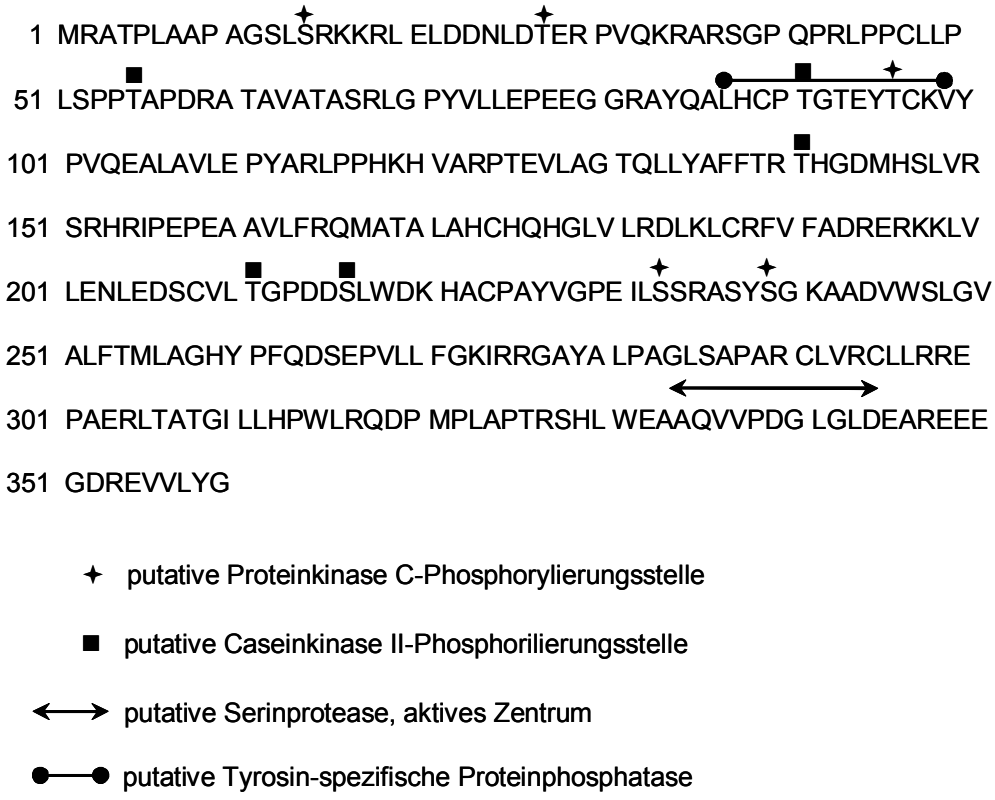


Abbildung 10: PROSITE-Analyse der Aminosäuresequenz von LKW.

2.3 Exon-Intron-Organisation von *LKW*

Die Exon-Intron-Organisation wurde mittels Recherche in genomischen Datenbanken analysiert. Die *LKW*-cDNS wird durch 4 Exons kodiert (257 bp, 290 bp, 292 bp and 1361 bp) getrennt durch 3 Introns (6842 bp, 2986 bp and 4619 bp). Die dual-spezifische Kinase LKW ist auf Chromosom 20p12.2-p13 lokalisiert und erstreckt sich über einen Bereich von 17 kb. *LKW* weist zu den Genen der homologen Proteine keine vergleichbare Exon-Intron-Organisation auf.

3. Expressionsstudien zu *LKW*

Wie in Kapitel 1.2 dargestellt, wurde *LKW* um das 11,8-fache in der metastasierenden Pankreastumorzelllinie SUIT-2 007 schwächer exprimiert als in der nicht-metastasierenden Pankreastumorzelllinie SUIT-2 028. In dieser Arbeit sollten deshalb weiterführende Expressionsanalysen zum Vorkommen des Transkripts in verschiedenen humanen Zelllinien und Geweben durchgeführt werden.

3.1 Expressionsstudien zu *LKW* in humanen Dickdarmkrebszelllinien

Bisher wurde gezeigt, dass das LKW-Transkript in der metastasierenden Pankreastumorzelllinie SUIT-2 007 schwächer exprimiert wird als in der nicht-metastasierenden Zelllinie SUT-2 028. Pankreastumore werden nur in sehr seltenen Fällen operiert. Aus diesem Grund gibt es kaum etablierte korrespondierende Zelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungsgrad. Da die *LKW*-Sequenz in dem oben genannten Modellsystem nachgewiesen wurde, könnte es eine Rolle bei der Metastasierung spielen. Deshalb wurde die Expression von *LKW* mittels Northern-Blot in zur Verfügung stehenden humanen Dickdarmkrebszelllinien unterschiedlichen Metastasierungspotenzials untersucht. Dazu wurde die aus den Zelllinien stammende, aufgetrennte Gesamt-RNS mittels Northern-Blot auf einer Membran immobilisiert. Diese wurde mit der α-[^{32}P]dATP markierten *LKW*-spezifischen Sonde, hergestellt mittels RT-PCR unter Verwendung der Oligonukleotide B9d-sense und B9d-antisense, hybridisiert. In Abbildung 11 ist das Ergebnis dieser Hybridisierung dargestellt. Das 2,3 kb große LKW-Transkript wurde am stärksten in den beiden Zelllinien KM 12C und KM 12L4A nachgewiesen. Wesentlich schwächer wurde das LKW-Transkript in der Zelllinie KM 12SM exprimiert. Die beiden Zelllinien KM 12SM und KM 12L4A leiten sich von der Zelllinie KM 12C ab und besitzen im Unterschied zur Ausgangszelllinie die Eigenschaft zu metastasieren. Die Dickdarmzelllinien HCT 116 und HCT 116U5.5 wiesen eine deutlich niedrigere LKW-mRNS-Expression auf. Dennoch war eine differentielle Expression zu erkennen. In der Zelllinie HCT 116, die aus dem Primärtumor stammt, war eine stärkere Expression festzustellen als in dem Metastasen-Klon HCT 116U5.5. Die Northern-Blot-Analysen ergaben also, dass bis auf die starke *LKW*-Expression in der metastasierenden Zelllinie KM 12L4A, das LKW-Transkript in den metastasierenden Zelllinien, die sich von den primären Zelllinien KM 12C und HCT 116 ableiten, wesentlich schwächer exprimiert wurde als in den entsprechenden nicht-metastasierenden Ausgangszelllinien.

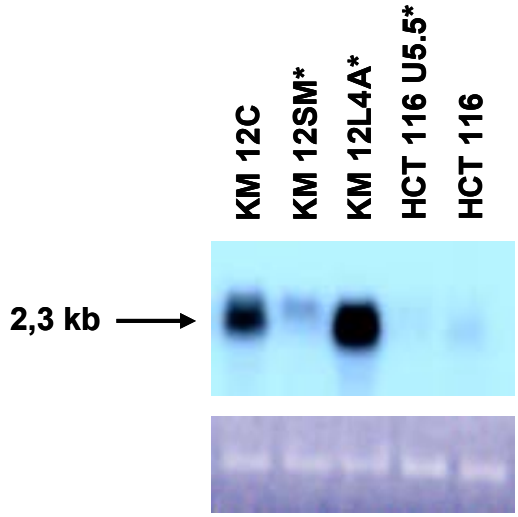


Abbildung 11: Northern-Blot zur Untersuchung der *LKW*-Expression in Dickdarmkrebszelllinien. Auf den Northern-Blot wurden 10 µg Gesamt-RNS pro Spur aus humanen Tumorzelllinien des Dickdarms aufgetragen. Der Blot wurde mit der *LKW*-spezifischen α-[^{32}P]dATP markierten Sonde über Nacht bei 68°C hybridisiert (Primer B9d-sense, B9d-antisense). Nach dem Waschen des Blots wurde ein Röntgenfilm bei -70°C für 2 Stunden exponiert. Zur Kontrolle der RNS-Menge wurde die 28S-rRNS fotografiert. Die metastasierenden Zelllinien sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

3.2 mRNS-Expression von *LKW* in humanen Brustkrebszelllinien

Die LKW-mRNS-Expression wurde in verschiedenen Brustkrebszelllinien, welche auf ihr Invasionspotenzial in *in vitro* Assays getestet worden waren, untersucht (Tong et al., 1999). Folgende Zelllinien wurden als invasiv beurteilt: BT-2 0, BT 474, BT 549, Hs 578T, MCF-10A, MCF-12A, MDA-MB-157, MDA-MB-231, MDA-MB-330, MDA-MB-435 und MDA-MB-436. Nicht-invasiven Phänotyp zeigten die Brustkrebszelllinien BT 483, CAMA-1, MDA-MB-175, MDA-MB-361, MDA-MB-453, SK-BR-3, T47D, UCAA-812, ZR-75-1 und ZR-75-30. Mittels quantitativer LigthCycler^{TM}-PCR und der Primer LKW8-sense und LKW8-antisense, welche ein 198 bp langes Produkt amplifizieren, wurden 13 invasive und 8 nicht-invasive humane Brustkrebszelllinien auf deren LKW-mRNS-Expression analysiert. Wie aus der Abbildung 12 hervorgeht, wurde das LKW-Transkript in den nicht-invasiven Brustkrebszelllinien stärker nachgewiesen als in den invasiven. Die relative Menge an LKW-mRNS war in den nicht-invasiven Zelllinien höher im Vergleich zu den invasiven Zelllinien. Das höchste LKW-mRNS-Niveau unter den nicht-invasiven Zelllinien besaßen MDA-MB-175 und MDA-MB-361, wohingegen die Zelllinie

T47D mit einer relativen Expression von 0,18 nur eine geringe mRNS Menge aufwies. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die LKW-mRNS-Expression mit einem nicht-invasiven Phänotyp in Brustkrebszelllinien korrelieren kann.

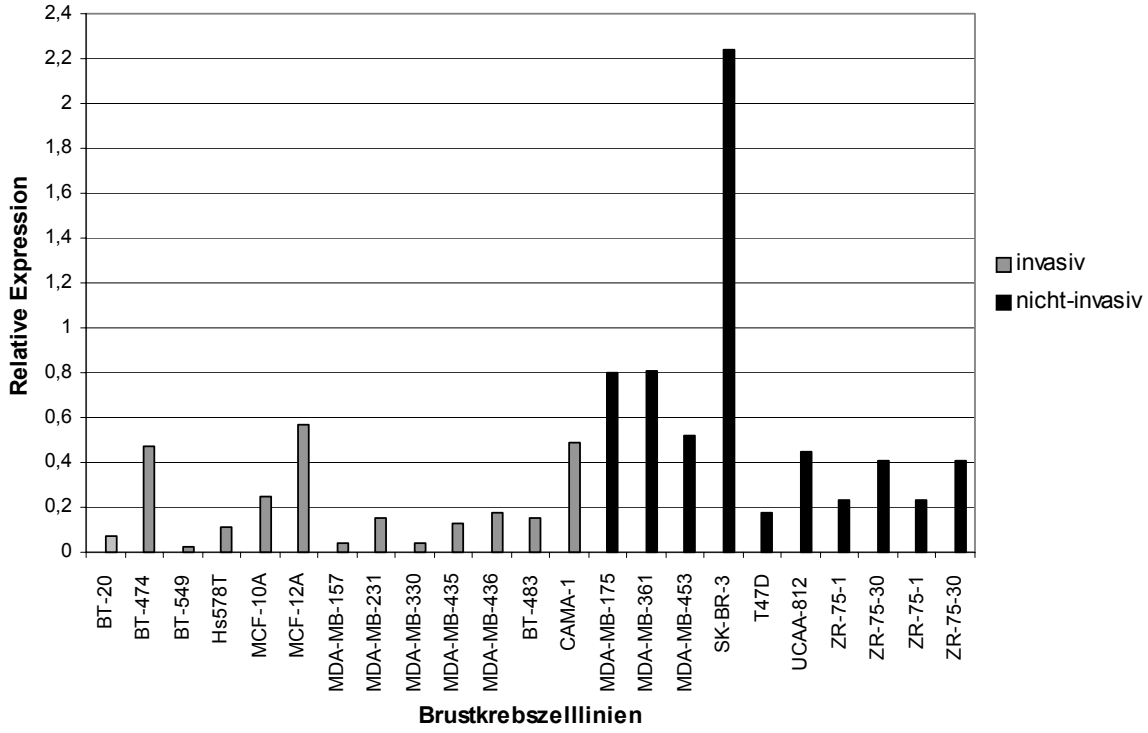


Abbildung 12: Relative Expression der mRNS für Gen *LKW* in Brustkrebszelllinien mittels LightCycler™-PCR. 1 µg DNase-I-behandelte Gesamt-RNS wurde in die quantitative PCR eingesetzt. Die Analysen wurden mit den Endkonzentrationen 0,5 µM (Primer LKW8-sense, LKW8-antisense) und 3 mM ($MgCl_2$) durchgeführt. Untersucht wurden insgesamt 21 Brustkrebszelllinien, sowohl invasiven als auch nicht-invasiven Potenzials. Zur Kontrolle der Primer-Dimerbildung wurde eine Kontrolle ohne cDNS (Wasserkontrolle) durchgeführt. Als Referenzwert diente das Gen Calnexin. Die Ergebnisse der Expression von LKW-mRNS stammen aus zwei unabhängigen Experimenten und sind als relative Werte dargestellt (siehe Material und Methoden). Im Balkendiagramm sind invasive Zelllinien grau und nicht-invasive Zelllinien schwarz wiedergegeben.

3.3 Expression von *LKW*-mRNS in humanen Geweben

Mittels Northern-Blot wurde die Expression des LKW-Transkripts in humanen Geweben untersucht. Dazu wurde ein Multiple Tissue Expression (MTE) Array (Clontech) mit der 1173 bp großen α-[^{32}P]dATP markierten *LKW*-spezifischen Sonde, die die gesamte cDNS abdeckte, hybridisiert (Primer LKW9-sense, LKW9-antisense). Der MTE-Array enthält eine größere Anzahl punktuell aufgetragener Poly-(A^+)-RNS von humanen Geweben und Zelllinien. Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 13 dargestellt. Bemerkenswerterweise zeigten nur die epithelialen Drüsengewebe wie Pankreas, Nebennierenrinde, Schilddrüse, Speicheldrüse und Brustdrüse (Spalte 9) eine schwache Expression des Transkripts. In Leber (A9) war die höchste Menge der LKW-mRNS zu beobachten. Auffallend war der wesentlich höhere mRNS-Spiegel in allen analysierten Tumorzelllinien. Eine starke Expression konnte in HeLa S3, Leukämie-Zelllinien K-562 und MOLT-4, Burkitt´s Lymphom-Zelllinie Daudi, und den Zelllinien kolorektales Adenokarzinom SW480 und Lungenkarzinom A549 (Spalte 10) festgestellt werden. Zur Kontrolle der RNS-Menge wurde der Blot gestrippt und anschließend mit einer Ubiquitin-spezifischen Sonde hybridisiert (Anhang Kapitel 10).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	whole brain	cerebellum, left	substantia nigra	heart	esophagus	colon, transverse	kidney	lung	liver	leukemia, HL-60	fetal brain	yeast total RNA
B	cerebral cortex	cerebellum, right	accumbens nucleus	aorta	stomach	colon, desending	skeletal muscle	placenta	pancreas	HeLa S3	fetal heart	yeast tRNA
C	frontal lobe	corpus callosum	thalamus	atrium, left	duodenum	rectum	spleen	bladder	adrenal gland	leukemia, K-562	fetal kidney	*E. coli* rRNA
D	parietal lobe	amygdala	pituitary gland	atrium, right	jejunum		thymus	uterus	thyroid gland	leukemia, MOLT-4	fetal liver	*E. coli* DNA
E	occipital lobe	caudate nucleus	spinal cord	ventricle, left	ileum		peripheral blood leukocyte	prostate	salivary gland	Burkitt's lymphoma, Raji	fetal spleen	Poly r(A)
F	temporal lobe	hippo-campus		ventricle, right	ilocecum		lymph node	testis	mammary gland	Burkitt's lymphoma, Daudi	fetal thymus	human C_0t-1 DNA
G	p. g.* of cerebral cortex	medulla oblongata		inter-ventricular septum	appendix		bone marrow	ovary		colorectal adeno-carcinoma SW480	fetal lung	human DNA 100 ng
H	pons	putamen		apex of the heart	colon, ascending		trachea			lung carcinoma, A549		human DNA 500 ng

* paracentral gyrus

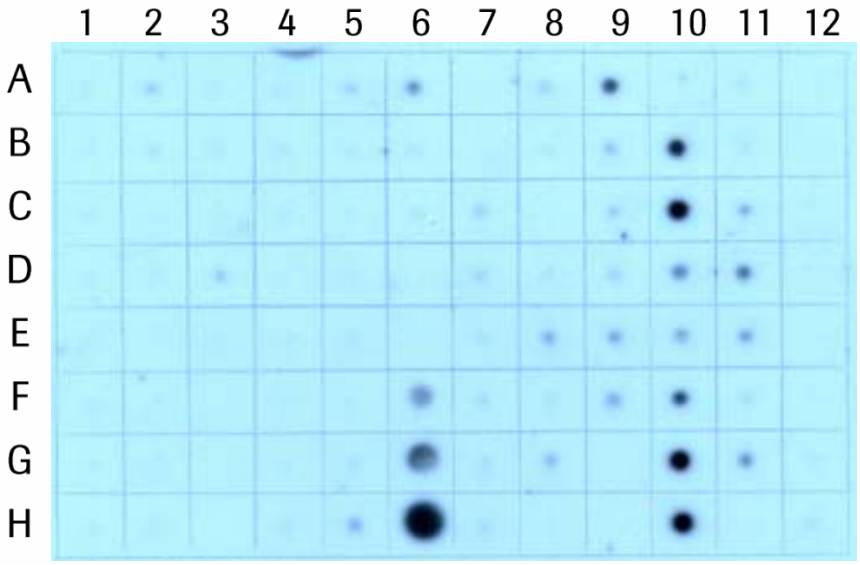


Abbildung 13: Multiple Tissue Expression Array zum Nachweis der *LKW*-Expression in normalen humanen Geweben. Zum Vergleich der Expressionsstärke wurden 1 µg, 5 µg und 10 µg Gesamt-RNS der *LKW*-exprimierenden SUIT-2 028-Zelllinie auf den MTE-Array aufgetragen (F6, G6, H6). Der MTE-Blot wurde mit der 1173 bp großen α-[^{32}P]dATP markierten *LKW*-spezifischen Sonde unter Verwendung der ‚ExpressHyb™ Hybridization Solution' bei 68°C über Nacht hybridisiert. Die *LKW*-spezifische Sonde wurde in einer RT-PCR unter Verwendung der Primer LKW9-sense und LKW9-antisense amplifiziert. Der MTE-Blot wurde für je 40 Minuten mit der Waschlösung 1 (2 x SSC, 0,05 % SDS; RT) und 2 (0,1 x SSC, 0,1 % SDS; 50°C) gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Membran in eine Folie eingeschweißt und ein Cronex Medical X-Ray Film bei –70°C für 26 Stunden exponiert. Das Schema, das die Art und die Position der Poly-(A^+)-RNS wiedergibt, ist über dem Blot dargestellt.

3.4 ‚Cancer Profiling Array'

Die Ergebnisse des Multiple Tissue Expression Arrays sollten mittels eines ‚Cancer Profiling Arrays' bestätigt werden, der korrespondierende cDNS normalen Gewebes und Tumorgewebes von 13 verschiedenen Geweben repräsentiert. Der Cancer Profiling cDNS Filter, der Proben von 241 Patienten enthält, wurde mit einer α-[^{32}P]dATP markierten *LKW*-spezifischen Sonde hybridisiert. Es bestätigte sich die gewebespezifische *LKW*-Expression wie sie bereits auf dem Multiple Tissue Array in Kapitel 3.3 gezeigt wurde. In Abbildung 14 ist erkennbar, dass das LKW-Transkript fast ausschließlich in Tumorgewebe nachweisbar war. Die LKW-mRNS wurde vorwiegend in Tumorgewebe des Dickdarms, der Niere, der Brust und des Eierstocks exprimiert. Weder in Tumor- noch in normalem Gewebe des Magens, der Lunge, des Mastdarms, der Schilddrüse und der Prostata konnte das LKW-Transkript nachgewiesen werden. Zusätzlich sind auf dem Array noch drei korrespondierende Normal-, Tumorgewebe und Metastasen des Dickdarms aufgetragen. Es konnte in allen drei analysierten Metastasen eine schwächere Expression der LKW-mRNS im Vergleich zum Primärtumor festgestellt werden. Im normalen Dickdarmgewebe der gleichen Patienten war keine detektierbare Expression des Transkripts zu beobachten. Da im Pankreastumor-Modellsystem SUIT-2 007 und SUIT-2 028 in der metastasierenden Zelllinie (SUIT-2 007) ebenfalls eine Herunterregulation von *LKW* nachgewiesen wurde und sich ein gleiches Expressionsmuster von *LKW* in den Dickdarm-Metastasen auf dem Cancer Profiling Array ergab, sollten als nächstes weitere Metastasen des Dickdarms auf deren LKW-mRNS-Expression untersucht werden.

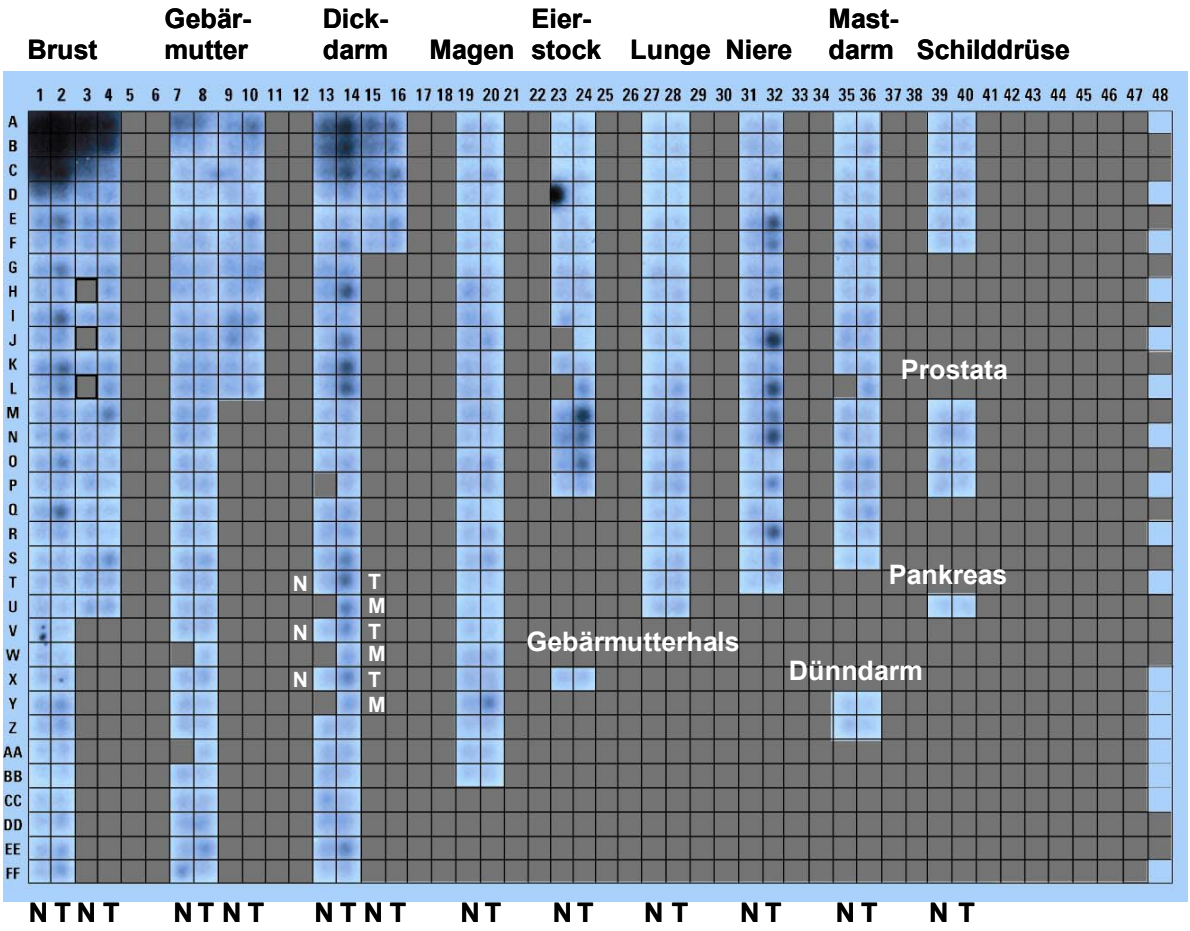


Abbildung 14: Array zur Untersuchung der *LKW*-Expression in humanen Normal- und Tumorgeweben. Ein cDNS-Filter wurde mit der α-[^{32}P]dATP markierten *LKW*-spezifischen Sonde, welche sich über die kodierende Sequenz erstreckt, hybridisiert. Für die Herstellung der Sonde mittels RT-PCR wurden die Primer LKW9-sense und LKW9-antisense verwendet. Untersucht wurden folgende Gewebe: Brust, Gebärmutter, Dickdarm, Magen, Eierstock, Lunge, Niere, Mastdarm, Schilddrüse, Gebärmutterhals, Prostata, Pankreas und Dünndarm. RNS aus korrespondierendem Normal- (N) und Tumorgewebe (T) ist nebeneinander aufgetragen. Die weißen Buchstaben auf dem Blot repräsentieren Normal- (N), Tumorgewebe (T) und Metastasen (M) des gleichen Patienten. Außer Metastasen des Dickdarmgewebes sind auch Metastasen von Geweben der Brust (3), Gebärmutter (2) und des Eierstocks (2) auf der Membran aufgetragen. Die Expressionsmuster der genannten Gewebe weisen keine Unterschiede auf. Zur Kontrolle der cDNS-Menge wurde der Blot gestrippt und anschließend mit einer Ubiquitin-spezifischen Sonde hybridisiert (Anhang Kapitel 11).

3.5 Expression von Gen *LKW* in humanen kolorektalen Karzinomen

Anschließend wurde untersucht, ob die Menge an LKW-mRNS mit der Malignität von Kolonkarzinomen korreliert. Die Kolontumore werden in verschiedene Duke-Stadien in Abhängigkeit von ihrem Metastasierungspotenzial eingeteilt. Duke A und B bedeutet, dass der Primärtumor noch keine Metastasen ausbildet. Primärtumore mit Duke-Stadium C metastasieren bereits in regionale Lymphknoten. Primärtumore hingegen, für die Metastasen in fern liegenden Organen nachgewiesen wurden, werden dem Duke D-Stadium zugeordnet. Mittels quantitativer LightCycler^{TM}-PCR wurden je 24 normale Gewebe als auch Kolonkarzinomgewebe analysiert. Die Expression des LKW-Transkripts wurde in 4 Tumoren mit Duke A-Stadium, 4 Tumoren mit Duke B-, 8 Tumoren mit Duke C- und 8 Tumoren mit Duke D-Stadium untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt. In allen normalen Geweben wurde keine bzw. eine sehr geringe Menge der LKW-mRNS nachgewiesen. In den Tumorgeweben lies sich eine bis zu 400-fache Überexpression von LKW-mRNS im Vergleich zu normalen Geweben feststellen. In allen vier Primärtumoren des Duke A-Stadiums zeigte sich eine homogene 150-fache relative Expression. Die Primärtumore des Duke B-Stadiums zeigten eine sehr heterogene Verteilung von 250- bis 390-facher Überexpression. Es ist erkennbar, dass die relative Expression der LKW-mRNS in den analysierten Kolontumoren des Duke C-Stadiums deutlich niedriger als in den Tumoren des Duke B-Stadiums war. Es konnte in diesen 8 untersuchten Tumoren eine relative LKW-mRNS-Expression von 40 bis 107 nachgewiesen werden. Bemerkenswerterweise zeigten die Tumore des Duke D-Stadiums eine noch geringere Expression des LKW-Transkripts als die Tumore des nicht-metastasierenden Duke A-Stadiums. Mit Zunahme des Metastasierungspotenzials eines Kolonkarzinoms verringert sich also die Expression der LKW-mRNS.

Als Ergebnis ist bisher festzuhalten, dass Normalgewebe keine bis schwache LKW-mRNS-Expression aufwiesen und in den untersuchten Tumoren hingegen eine größere Menge LKW-mRNS enthalten war. In den Metastasen wiederum war ein geringeres LKW-mRNS-Niveau als in den Primärtumoren festzustellen.

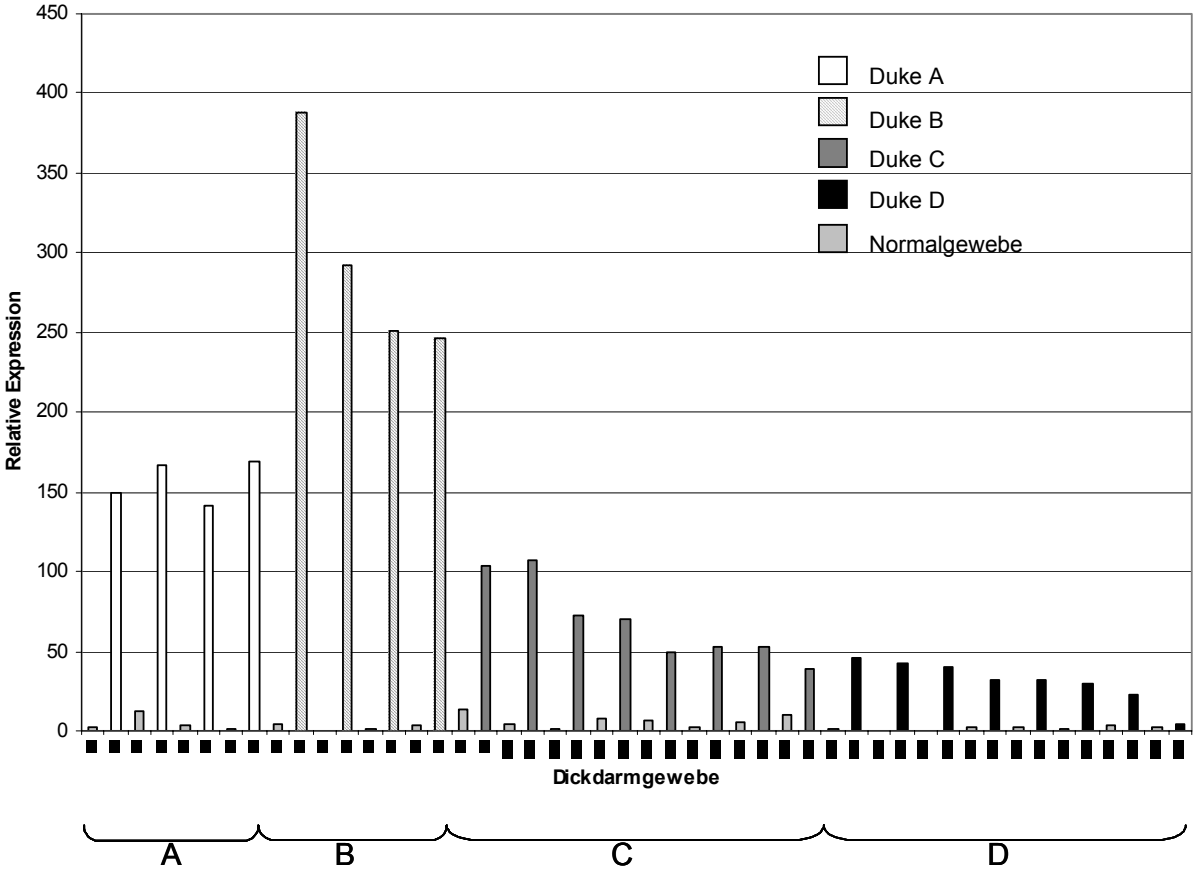


Abbildung 15: Relative Expression der mRNS für das Gen *LKW* in normalen Geweben und Tumorgeweben unterschiedlicher Tumorstadien des Dickdarms. Je 1 µg Gesamt-RNS von normalen Dickdarmgeweben und Dickdarmtumorgeweben verschiedener Duke-Stadien wurde in die quantitative PCR eingesetzt. Untersucht wurden insgesamt 48 Gewebe. Folgende Bedingungen wurden für die PCR ausgewählt: 0,5 µM Primer, 3 mM $MgCl_2$, Annealing bei 58 °C für 5 sec., Elongation bei 72 °C für 8 sec. Für die Quantifizierung von LKW-mRNS wurden die Primer LKW8-sense und LKW8-antisense verwendet. Als Negativkontrolle diente Wasser und als Referenzwert wurde Calnexin parallel in einem PCR-Ansatz amplifiziert. Die Ergebnisse der Expression von LKW-mRNS stammen aus zwei unabhängigen Experimenten und sind als relative Werte dargestellt. Die Abkürzung N bezieht sich auf Normalgewebe und die Abkürzung T auf Tumorgewebe. Die Nummerierungen 1-4 stellen Tumore des Stadiums Duke A dar, 5-8 Duke B, 9-16 Duke C und 17-24 Duke D.

3.6 Expression von *LKW* in humanen normalen Pankreasgeweben, chronischen Pankreatitiden und Pankreastumorgeweben

Das Ergebnis der Hybridisierung einer *LKW*-spezifischen Sonde auf den Multiple Tissue Expression Array zeigte stärkere Signale in allen analysierten Tumorzelllinien und keine bzw. nur sehr schwache in normalen Geweben. Um festzustellen ob die Expression des *LKW*-Gens mit der Tumorgenese von verschiedenen humanen Pankreastumorgeweben korreliert, wurde das Expressionsmuster im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe bestimmt. Die Expression von *LKW* wurde mittels quantitativer RT-PCR, unter Anwendung der TaqMan®-Technologie, untersucht. Insgesamt wurde die mRNS in 4 normalen Pankreasgeweben, 4 chronischen Pankreatitiden und 6 Pankreaskarzinomen quantifiziert. Die Gesamt-RNS aus den verschiedenen Geweben wurde isoliert, anschließend die cDNS-Synthese durchgeführt und dann je 200 ng cDNS in die PCR eingesetzt, welche ein 50-bp-cDNS-Fragment ergab. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis der quantitativen TaqMan®-PCR aus unterschiedlichen Stadien der Pankreasgewebe. Die quantitativen RT-PCR-Analysen wiesen höhere LKW-mRNS-Mengen in Pankreastumorproben nach. In 2 von 6 Tumoren wurden drastisch erhöhte Transkriptspiegel gefunden. In Pankreatitiden war die LKW-mRNS entsprechend gering nachweisbar wie auch in Normalgeweben.

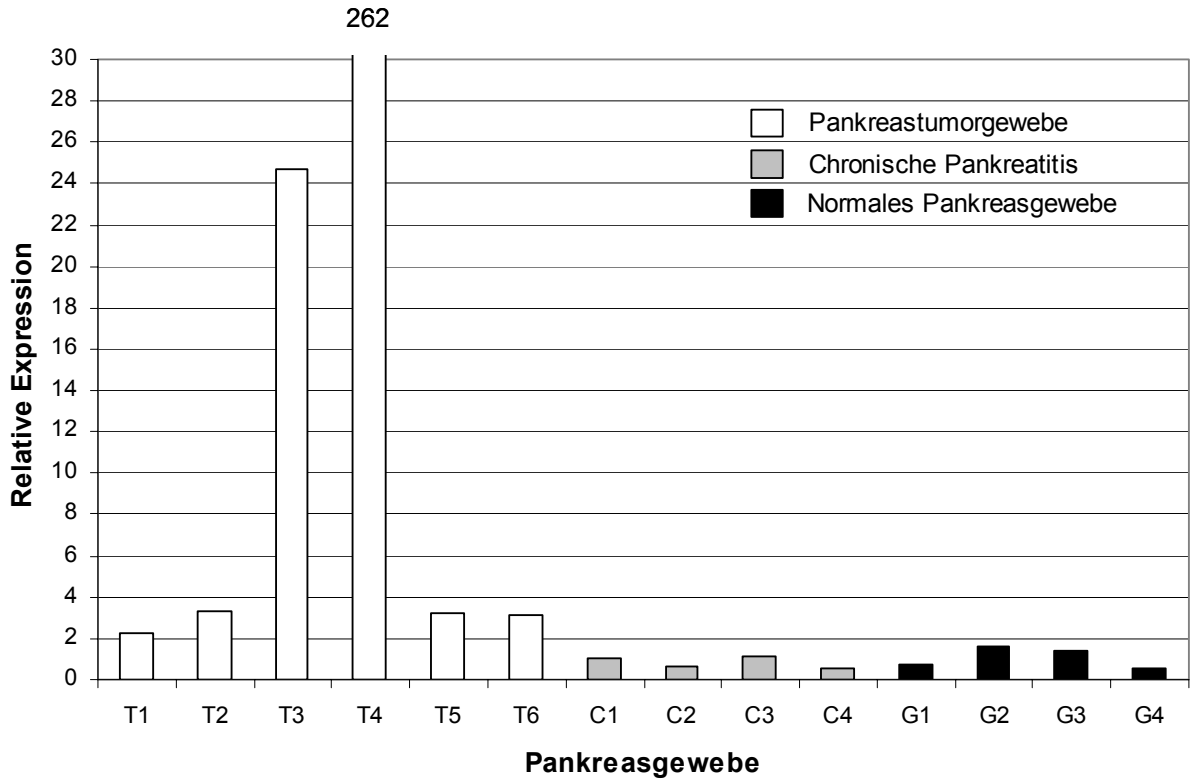


Abbildung 16: Relative Expression der mRNS-Expression von *LKW* in normalen Pankreasgeweben, chronischen Pankreatitiden und Pankreastumorgeweben. Aus Adenokarzinomen des Pankreas, chronischen Pankreatitiden und normalem Pankreasgewebe wurde Gesamt-RNS isoliert und davon jeweils 10 µg Gesamt-RNS in 20 µl Gesamtvolumen für die cDNS-Synthese eingesetzt. Für die quantitative Echtzeit-PCR wurden 200 ng cDNS und die Primer LKW1-sense und LKW1-antisense eingesetzt. Folgende PCR-Konditionen wurden verwendet: Initialschritt 2 min bei 50°C, 10 min bei 95°C, 40 Zyklen für 15 sec bei 95°C und 60 sec bei 60°C. Für jede cDNS wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen XS13 herangezogen. Untersucht wurden folgende humane Gewebe: 4 gesunde Pankreasgewebe (G 1 - 4), 4 chronische Pankreatitiden (C 1 - 4) und 6 Tumorgewebe des Pankreas (T 1 - 6). Dargestellt ist die relative Expression von *LKW* des entsprechenden Gewebes im Vergleich zur mRNS-Expression in normalen Geweben (siehe Material und Methoden).

4. Isolierung von *UKW* mittels Screening einer humanen cDNS-Bibliothek

In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich zu dem *LKW*-Gen ein in der metastasierenden Pankreastumorzelllinie SUIT-2 007 stark überexprimiertes Transkript identifiziert, für welches die komplette cDNS isoliert werden sollte.
Nachdem durch Hybridisierung einer α-[^{32}P]dATP markierten cDNS-Probe, basierend auf der EST-Sequenz AC AA044830, auf Northern-Blot-Ebene in der Zelllinie SUIT-2 007 die Größe des Transkripts von 5,1 kb ermittelt wurde und bei der Recherche in öffentlichen (EMBL-, GenBank-) Datenbanken keine Homologien zur 590 bp-Sequenz des EST ermittelt werden konnten, wurde eine humane cDNS-Bibliothek zur Generierung der vollständigen cDNS durchsucht. Dazu wurde eine humane Oligo(dT) und *random* markierte 5´-stretch-cDNS-Bibliothek aus der Gebärmutter (Clontech) verwendet. Zunächst wurde die cDNS-Bibliothek, die im Phagen λgt11 vorlag, mit einer 280 bp Digoxygenin(DIG)-markierten EST-spezifischen Sonde hybridisiert. Nach einem Amplifikationsschritt wurden insgesamt 2,5 x 10^6 Plaques auf LB-Agar-$MgSO_4$-Platten ausplattiert. So wurden bei dem ‚Screen' 6 Positivklone identifiziert und deren DNS isoliert sowie sequenziert. Die Klone wiesen unterschiedliche Größen von 850 bp bis 1500 bp auf. Nach diesem Screen ließ sich die DNS von 590 bp aufgrund der kleinen Größe der Klone auf nur 1277 bp verlängern. Es zeigte sich, dass die EST-Sequenz im 3´-untranslatierten Bereich des 5,1 kb Transkripts lag. Zur Verlängerung dieser Sequenzinformation durch einen zweiten ‚Screen', wurde eine neue DIG-markierte Sonde mittels PCR aus den Primern UKW4-sense und UKW4-antisense generiert. Bei diesem zweiten Durchmustern der cDNS-Bibliothek konnten 8 Positivklone identifiziert werden. Diese wiesen Größen von 1000 bp bis 1900 bp auf. Allerdings waren von den 8 Positivklonen manche identisch oder entsprachen der 3´-Sequenz des gesuchten Gens. Somit gelang es lediglich die Sequenz des Gens um 1850 bp auf insgesamt 3127 bp zu verlängern. Diese Nukleotidsequenz wurde mittels ‚MAP-Programm' in die Aminosäuresequenz umgeschrieben und potenzielle offene Leserahmen postuliert. Eine fortlaufende cDNS konnte jedoch noch nicht festgestellt werden. Dies bedeutete, dass in den verbleibenden 1993 bp der ORF enthalten sein musste. Basierend auf der bisher ermittelten Sequenz wurden in deren 5´-Bereich Primer für einen dritten ‚Screen' konzipiert. Mittels PCR wurde eine 312 bp-DIG-markierte Sonde mit den Primern UKW5-sense und UKW5-antisense amplifiziert. Das Durchmustern der Gebärmutter-cDNS-Bibliothek wurde so lange wiederholt bis ein Einzelklon sicher isoliert werden konnte. Bei diesem dritten ‚Screen' wurden 13 Klone als positiv identifiziert, wobei von den 4 größten Klonen die DNS isoliert und sequenziert wurde. Es zeigte sich, dass mit dem größten, 2,3 kb langen

Klon die volle-Länge-cDNS generiert werden konnte. Das Transkript war, wie im Northern-Blot bereits nachgewiesen, 5,1 kb groß und der offene Leserahmen hatte eine Größe von 1122 bp (nt 366-1487). Nach Abschluss des Durchmusterns der Gebärmutter-cDNS-Bibliothek ergab sich das in Abbildung 17 dargestellte Bild.

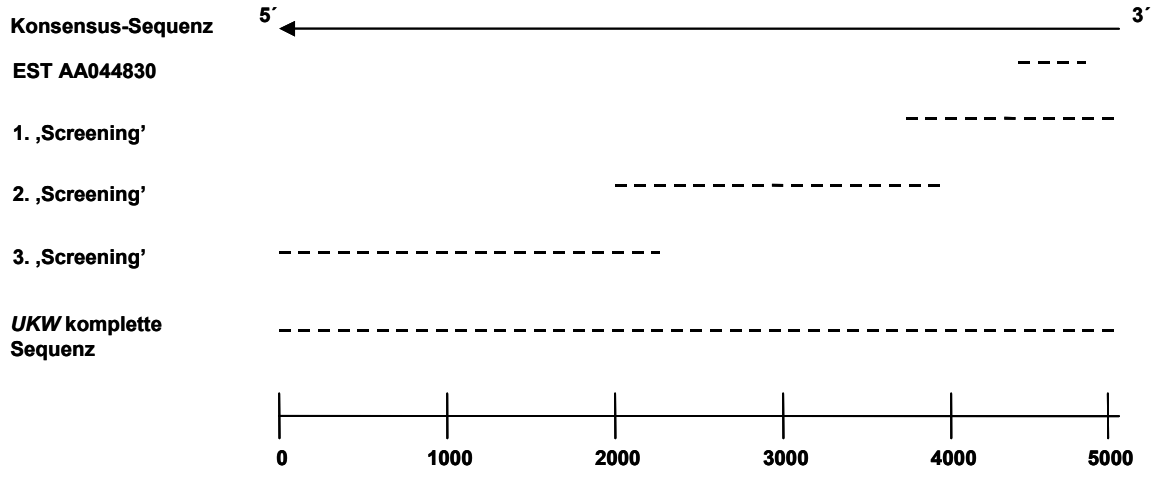


Abbildung 17: Generierung der *UKW*-Konsensus-Sequenz mit Hilfe der identifizierten cDNS aus dem cDNS-Bibliothek-Screening. Zur Generierung der cDNS von *UKW* wurde eine humane Oligo(dT) und *random* markierte 5´-stretch-cDNS-Bibliothek aus der Gebärmutter durchsucht. Nach Identifizierung zahlreicher Positivklone wurde deren DNS isoliert und sequenziert. Die vollständige Sequenz des 5,1 kb Transkripts wurde nach 3 ‚Screens' erhalten. Die zusammengesetzte Konsensus-Sequenz von *UKW* ist in Fettschrift in 5´-3´-Richtung dargestellt. In der untersten Reihe ist die Größe der Sequenz in bp angegeben.

4.1 Klonierung von *UKW*-ORF mittels RT-PCR

Da die im cDNS-Bibliothek-Screening isolierten Klone nicht für die gesamte Aminosäuresequenz des Proteins kodierten, wurde für weitere Untersuchungen die volle-Länge-cDNS von *UKW* mittels RT-PCR kloniert. Als ‚Template' wurde die Gesamt-RNS der *UKW*-exprimierenden Zelllinie SUIT-2 007 verwendet. Als 5´- und 3´-Oligo-nukleotide wurden UKW6-sense (nt 359-376) und UKW6-antisense (nt 1550-1568) eingesetzt. Damit wurde in der PCR die kodierende Sequenz von *UKW* (nt 366-1487) mit der Größe von 1122 bp amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde durch Klonierung in den pCR2.1-Vektor gesichert und seine Sequenz durch Sequenzanalyse bestätigt.

4.2 Charakterisierung des transmembranständigen Proteins UKW

Das *UKW*-Gen wird als 5,1 kb großes Transkript exprimiert und enthält nach dem 365 Basen umfassenden 5´untranslatierten Bereich (5´UTR) einen offenen Leserahmen, der für ein Protein mit 374 Aminosäuren kodiert. Basierend auf der computergestützten TMHMM-Analyse (Programm des ‚Center for Biological Sequence Analysis, The Technical University of Denmark') wurde für UKW ein stark hydrophober Bereich vorhergesagt. Daraus ergab sich eine Struktur, die aus einem Transmembranbereich (23 Aminosäuren), einer 215 Aminosäure umfassenden N-terminalen extrazellulären Domäne und einer 177 Aminosäure großen zytoplasmatischen Region besteht. Ein Signalpeptid mit 1-18 AS wurde mit dem Programm SignalP 1.1 postuliert. Somit kann UKW eine Funktion als Rezeptor zugesprochen werden. In der extrazellulären Domäne liegen die Asparaginreste an den Positionen 74 und 197, beide in einer Konsensus-Sequenz für eine potenzielle N-Glykosylierung. Da der Asparaginrest 197 in der UKW-Sequenz und den Sequenzen des ‚Cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses' von Mensch, Maus und Zebrafisch konserviert ist, kann angenommen werden, dass hier bevorzugt eine Glykosylierung stattfindet. Die zytoplasmatische Domäne zeichnet sich durch eine serinreiche Region aus. Die extrazelluläre Domäne weist zwei Immunglobulin C2-Typ Domänen bestehend aus 93 Aminosäuren (nt 26-118) und 72 Aminosäuren (nt 144-215) auf (Abbildung 18). Dieser Rezeptor lässt sich somit der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie zuordnen.

Aufgrund der Proteinstruktur und starken Sequenzhomologien konnte UKW einer Familie von Proteinen zugeordnet werden, welche eine gemeinsame Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie bilden könnte. Zu dieser gehört unter anderem das am besten untersuchte humane Protein Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptor (hCAR; Acc.-Nr. U90716) und dessen Homologon mCAR (Acc.-Nr. Y10320). Auch die Proteine mAsp-5 (Acc.-Nr. NP598494), hA33 (Acc.-Nr. U79725), hESAM (Acc.-Nr. AF361746) und hBT-IgSF (Acc.-Nr. AB079879) sowie das etwas entfernter verwandte Protein ‚Junctional adhesion molecule' (JAM; Acc.-Nr. U89915) zählen zu dieser Gruppe.

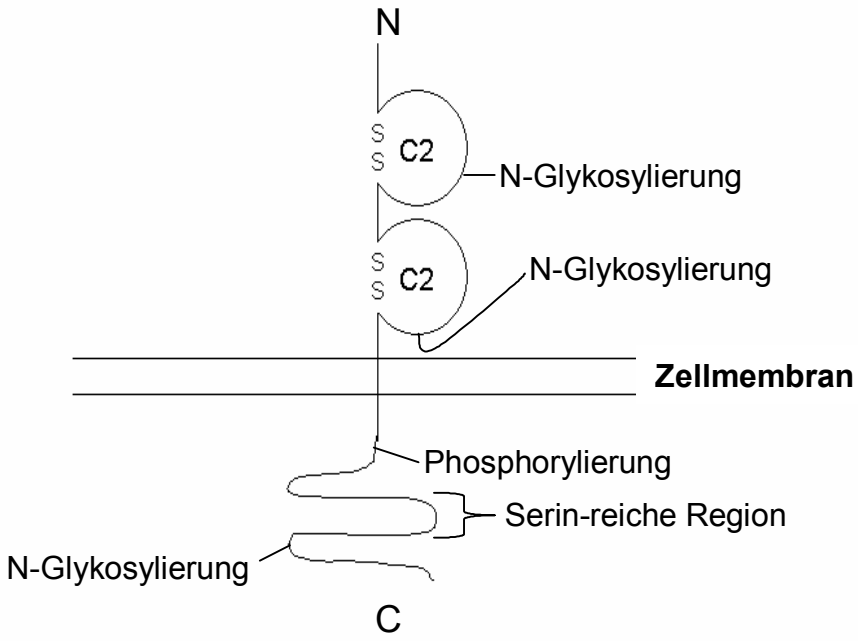
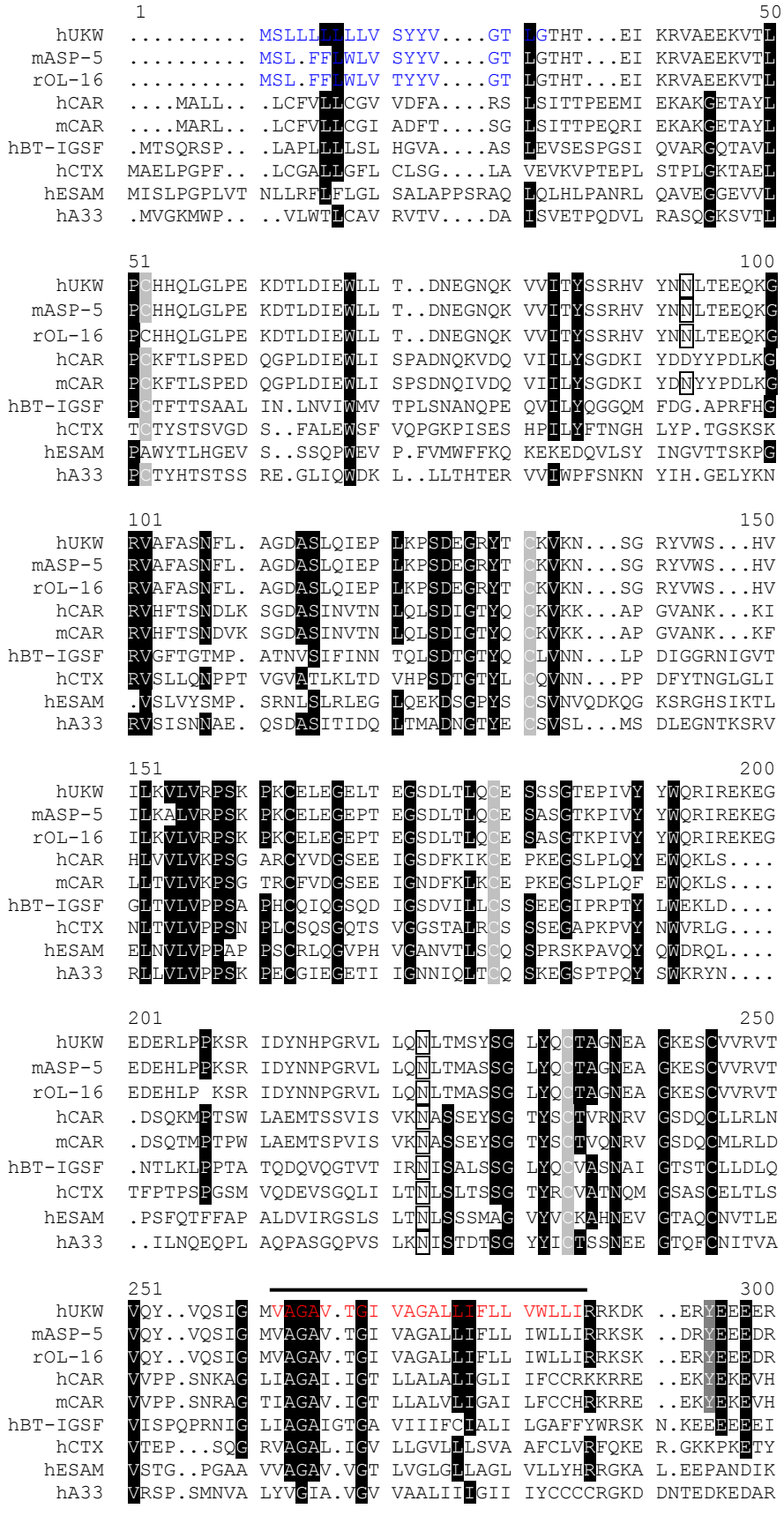


Abbildung 18: Schematische Darstellung von UKW. UKW verfügt typischerweise wie die Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie über eine Transmembrandomäne, die das Molekül in einen kleineren intrazellulären und einen größeren extrazellulären Bereich teilt. Die Familienzugehörigkeit wird durch die sogenannten Immunglobulin-Domänen des extrazellulären Bereichs festgelegt (durch Loopstrukturen und SS im Schema angedeutet). Dies sind Abschnitte, die durch Disulfidbrücken in einer beta-Faltblattstruktur zusammengehalten werden. UKW besitzt drei potenzielle N-Glykosylierungsstellen an Position 74, 197 und 352 und eine potenzielle Phosphorylierungsstelle. Die zytoplasmatische Domäne zeichnet sich durch eine serinreiche Region aus.

In all diesen Proteinen ist die Struktur der Eintransmembrandomäne stark konserviert. Auf Proteinebene hat UKW mit murinem ‚Adipocyte-specific protein-5' (mAsp-5) die größte Sequenzhomologie von 93 % (Tabelle 5). Sehr wahrscheinlich handelt es sich bei Asp-5 um das murine Homologe zu humanem UKW. Bei rOL-16 (Acc.-Nr. NM173154) könnte es sich um das Ratten-Homologe zu humanem UKW handeln, da dieses eine Sequenzhomologie von 91 % zu hUKW aufweist. Das UKW-Protein ist zudem identisch zu humanem Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptor (hCAR-Protein) mit 35 %, zu murinem pCAR mit 33 % und zu humanem pBT-IgSF mit 32 %. Die Sequenzhomologien sind in Abbildung 19 und Tabelle 5 dargestellt. Auch die Struktur der Genloci ist sehr stark konserviert. Daraus lässt sich die Herkunft durch mögliche Duplikation eines gemeinsamen ancestralen Gens schließen.


1 50
hUKW ..... MSLLLLLLLV SYYV....GT LGTHT...EI KRVAEEKVTL
mASP-5 ..... MSL.FFLWLV SYYV....GT LGTHT...EI KRVAEEKVTL
rOL-16 ..... MSL.FFLWLV TYYV....GT LGTHT...EI KRVAEEKVTL
hCAR ....MALL.. .LCFVLLCGV VDFA....RS LSITTPEEMI EKAKGETAYL
mCAR ....MARL.. .LCFVLLCGI ADFT....SG LSITTPEQRI EKAKGETAYL
hBT-IGSF .MTSQRSP.. .LAPLLLLSL HGVA....AS LEVSESPGSI QVARGQTAVL
hCTX MAELPGPF.. .LCGALLGFL CLSG....LA VEVKVPTEPL STPLGKTAEL
hESAM MISLPGPLVT NLLRFLFLGL SALAPPSRAQ LQLHLPANRL QAVEGGEVVL
hA33 .MVGKMWP.. ..VLWTLCAV RVTV....DA ISVETPQDVL RASQGKSVTL
51 100
hUKW PCHHQLGLPE KDTLDIEWLL T..DNEGNQK VVITYSSRHV YNNLTEEQKG
mASP-5 PCHHQLGLPE KDTLDIEWLL T..DNEGNQK VVITYSSRHV YNNLTEEQKG
rOL-16 PCHHQLGLPE KDTLDIEWLL T..DNEGNQK VVITYSSRHV YNNLTEEQKG
hCAR PCKFTLSPED QGPLDIEWLI SPADNQKVDQ VIILYSGDKI YDDYYPDLKG
mCAR PCKFTLSPED QGPLDIEWLI SPSDNQIVDQ VIILYSGDKI YDNYYPDLKG
hBT-IGSF PCTFTTSAAL IN.LNVIWMV TPLSNANQPE QVILYQGGQM FDG.APRFHG
hCTX TCTYSTSVGD S..FALEWSF VQPGKPISES HPILYFTNGH LYP.TGSKSK
hESAM PAWYTLHGEV S..SSQPWEV P.FVMWFFKQ KEKEDQVLSY INGVTTSKPG
hA33 PCTYHTSTSS RE.GLIQWDK L..LLTHTER VVIWPFSNKN YIH.GELYKN
101 150
hUKW RVAFASNFL. AGDASLQIEP LKPSDEGRYT CKVKN...SG RYVWS...HV
mASP-5 RVAFASNFL. AGDASLQIEP LKPSDEGRYT CKVKN...SG RYVWS...HV
rOL-16 RVAFASNFL. AGDASLQIEP LKPSDEGRYT CKVKN...SG RYVWS...HV
hCAR RVHFTSNDLK SGDASINVTN LQLSDIGTYQ CKVKK...AP GVANK...KI
mCAR RVHFTSNDVK SGDASINVTN LQLSDIGTYQ CKVKK...AP GVANK...KF
hBT-IGSF RVGFTGTMP. ATNVSIFINN TQLSDIGTYQ CLVNN...LP DIGGRNIGVT
hCTX RVSLLQNPPT VGVATLKLTD VHPSDIGTYL CQVNN...PP DFYTNGLGLI
hESAM .VSLVYSMP. SRNLSLRLEG LQEKDSGPYS CSVNVQDKQG KSRGHSIKTL
hA33 RVSISNNAE. QSDASITIDQ LTMADNGTYE CSVSL...MS DLEGNTKSRV
151 200
hUKW ILKVLVRPSK PKCELEGELT EGSDLTLQCE SSSGTEPIVY YWQRIREKEG
mASP-5 ILKALVRPSK PKCELEGEPT EGSDLTLQCE SASGTKPIVY YWQRIREKEG
rOL-16 ILKVLVRPSK PKCELEGEPT EGSDLTLQCE SASGTKPIVY YWQRIREKEG
hCAR HLVVLVKPSG ARCYVDGSEE IGSDFKIKCE PKEGSLPLQY EWQKLS....
mCAR LLTVLVKPSG TRCFVDGSEE IGNDFKLKCE PKEGSLPLQF EWQKLS....
hBT-IGSF GLTVLVPPSA PHCQIQGSQD IGSDVILLCS SEEGIPRPTY LWEKLD....
hCTX NLTVLVPPSN PLCSQSGQTS VGGSTALRCS SSEGAPKPVY NWVRLG....
hESAM ELNVLVPPAP PSCRLQGVPH VGANVTLSCQ SPRSKPAVQY QWDRQL....
hA33 RLLVLVPPSK PECGIEGETI IGNNIQLTCQ SKEGSPTPQY SWKRYN....
201 250
hUKW EDERLPPKSR IDYNHPGRVL LQNLTMSYSG LYQCTAGNEA GKESCVVRVT
mASP-5 EDEHLPPKSR IDYNNPGRVL LQNLTMASSG LYQCTAGNEA GKESCVVRVT
rOL-16 EDEHLP KSR IDYNNPGRVL LQNLTMASSG LYQCTAGNEA GKESCVVRVT
hCAR .DSQKMPTSW LAEMTSSVIS VKNASSEYSG TYSCTVRNRV GSDQCLLRLN
mCAR .DSQTMPTPW LAEMTSPVIS VKNASSEYSG TYSCTVQNRV GSDQCMLRLD
hBT-IGSF .NTLKLPPTA TQDQVQGTVT IRNISALSSG LYQCVASNAI GTSTCLLDLQ
hCTX TFPTPSPGSM VQDEVSGQLI LTNLSLTSSG TYRCVATNQM GSASCELTLS
hESAM .PSFQTFFAP ALDVIRGSLS LTNLSSSMAG VYVCKAHNEV GTAQCNVTLE
hA33 ..ILNQEQPL AQPASGQPVS LKNISTDTSG YYICTSSNEE GTQFCNITVA
251 300
hUKW VQY..VQSIG MVAGAV.TGI VAGALLIFLL VWLLIRRKDK ..ERYEEEER
mASP-5 VQY..VQSIG MVAGAV.TGI VAGALLIFLL IWLLIRRKSK ..DRYEEEDR
rOL-16 VQY..VQSIG MVAGAV.TGI VAGALLIFLL IWLLIRRKSK ..ERYEEEDR
hCAR VVPP.SNKAG LIAGAI.IGT LLALALIGLI IFCCRKKRRE ..EKYEKEVH
mCAR VVPP.SNRAG TIAGAV.IGT LLALVLIGAI LFCCHRKRRE ..EKYEKEVH
hBT-IGSF VISPQPRNIG LIAGAIGTGA VIIIFCIALI LGAFFYWRSK N.KEEEEEEI
hCTX VTEP...SQG RVAGAL.IGV LLGVLLLSVA AFCLVRFQKE R.GKKPKETY
hESAM VSTG..PGAA VVAGAV.VGT LVGLGLLAGL VLLYHRRGKA L.EEPANDIK
hA33 VRSP.SMNVA LYVGIA.VGV VAALIILGII IYCCCCRGKD DNTEDKEDAR

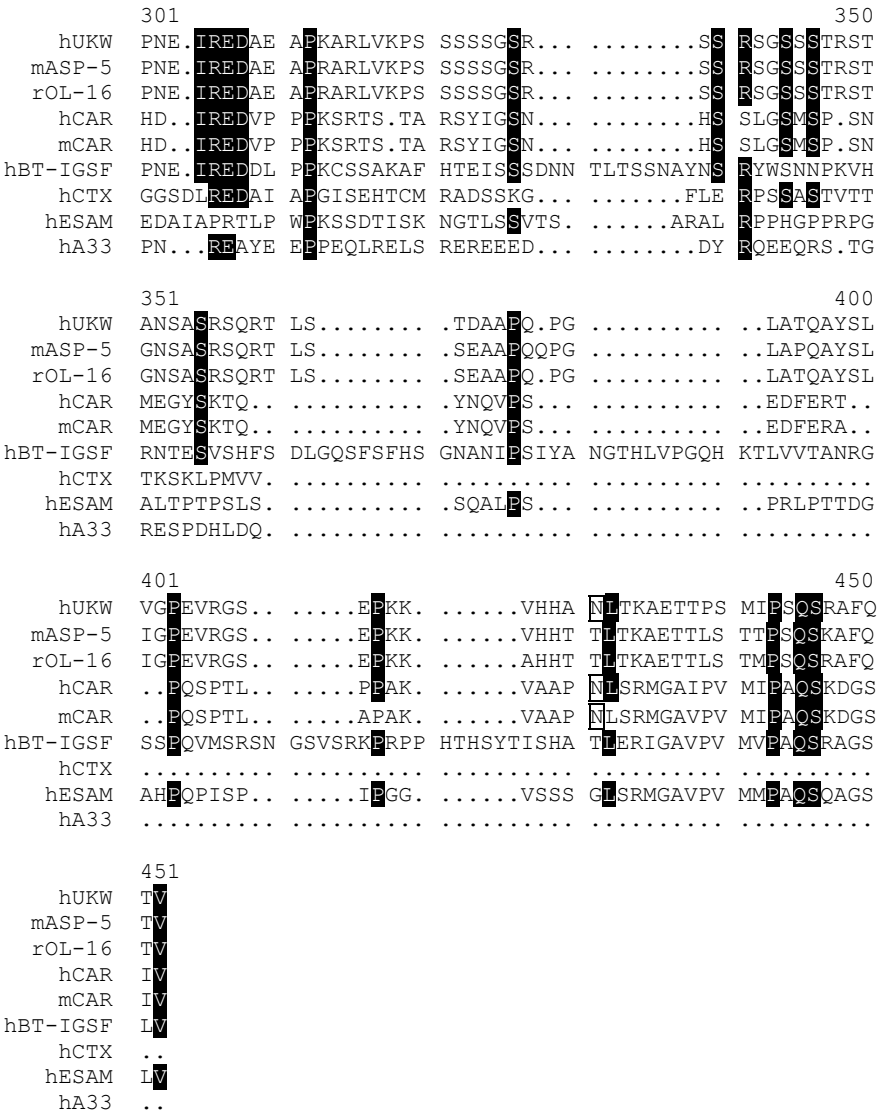


Abbildung 19: Die UKW-Proteinfamilie. Die Gruppierung der homologen Proteine wurde mit dem Programm Pileup in GCG (Genetics Computer Group, Inc.; Pharmacopeia Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt. Starke Homologien finden sich zwischen humanem UKW, mAsp-5-, rOL-16-, hCAR-, mCAR-, hBT-IgSF-, hCTX-, hESAM- und hA33-Protein. Identische Aminosäuren zwischen mindestens sechs der neun homologen Proteine sind schwarz unterlegt. Cystein-Reste, die in die Formation von Disulfidbrücken innerhalb der Ig-Domänen involviert sind, sind mit hellgrauem Hintergrund dargestellt. Das Tyrosin, welches als potenzielle Phosphorylierungsstelle in Frage kommt, ist dunkelgrau unterlegt. Die postulierten N-Glykosylierungsstellen sind schwarz umrahmt. Die Transmembrandomäne von UKW ist mit darüber stehendem Strich angezeigt und die entsprechenden Aminosäuren in der UKW-Sequenz in roter Schrift dargestellt. Die postulierten Signalpeptide sind in blauer Schrift wiedergegeben. Die Punkte innerhalb der Sequenen stellen Platzhalter dar, um die Sequenzhomologie zu veranschaulichen.

4.3 Exon-Intron-Organisation und Chromosomlokalisation des Gens *UKW*

Um herauszufinden wie die *UKW*-cDNS entstanden ist, wurde die Exon-Intron-Organisation mittels Recherche in genomischen Datenbanken analysiert. Die Analyse ergab, dass die *UKW*-cDNS von 7 Exons getrennt durch 6 Introns kodiert wird. Die 7 Exons umfassen 393 bp, 158 bp, 202 bp, 168 bp, 123 bp, 142 bp und das größte Exon am 3´-Ende hat 3934 bp (Exons 1-7). Die Introns 1-6 haben folgende Größen: 96962 bp, 13082 bp, 665 bp, 473 bp, 8242 bp und 928 bp (Abbildung 20). Für die Bestimmung der genomischen Lokalisation des Gens *UKW* wurde die Software ‚Ensembl Genome Browser' verwendet. Es zeigte sich, dass *UKW* auf Chromosom 11q24.1 lokalisiert ist und sich über einen Bereich von 125 kb erstreckt.

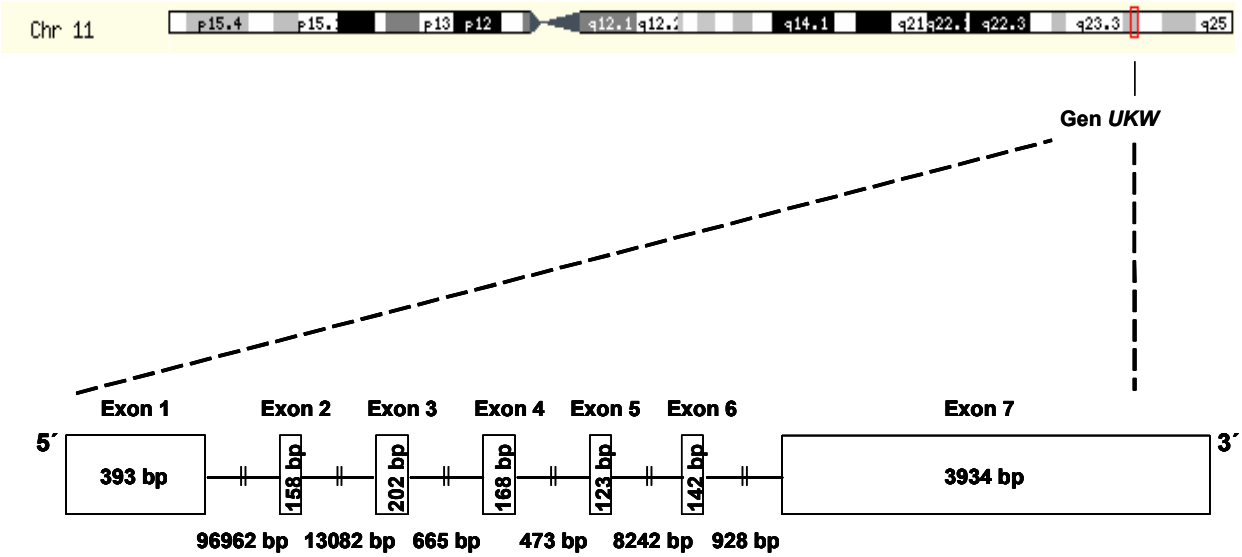


Abbildung 20: Exon-Intron-Organisation des *UKW*-Gens und Darstellung der Lokalisation auf Chromosom 11. Die Exon-Intron-Analyse wurde mit dem Programm SIM4 durchgeführt. Die Lokalisation von *UKW* auf Chromosom 11q24.1 wurde mit dem Ensembl Genome Browser bestimmt.

Die Gene ‚Cortical thymocyte receptor' (h*CTX*; Acc.-Nr. U43330) und humanes ‚Endothelial cell-selective adhesion molecule' (h*ESAM*) weisen ebenso die Lokalisation auf Chromosom 11 auf. Das *UKW*-Gen besteht, wie die in dieser Arbeit beschriebenen Gene der homologen Proteine aus 7 Exons und 6 Introns. Die Proteine hUKW, mAsp-5 und hESAM besitzen alle das gleiche errechnete Molekulargewicht von 41 kD. Wie *UKW* werden auch die Gene h*CAR* und h*BT-IgSF* sowohl in Pankreas als auch in Gehirn exprimiert (Tabelle 5).

Tabelle 5: UKW und verwandte Mitglieder der Subgruppe der Immunglobulin-Superfamilie. Vergleich bzgl. Proteingröße, Chromosomenlokalisation, Anzahl an Exons der entsprechenden Gene, gewebespezifischer Expression und Sequenzhomologie. Identische Parameter sind in Fettschrift hervorgehoben.

Mitglieder der Subfamilie	Protein-größe [kD]	Chromosom-lokalisation	Exon-Anzahl der entsprechenden Gene	Gewebe-spezifische Expression	Homologie [%]
UKW (h)	41	11q24.1	7	Gehirn, Pankreastumore	-
Asp-5 (m)	41	9 A5.1	7	Fettgewebe (Okazaki, 2002; Strausberg, 2002)	93
OL-16 (r)	36	8q22	7	Fettgewebe (Hida et al., 2000)	91
A33 (h)	43	1q23.2	7	95 % in Dickdarm-krebs (Heath et al., 1997)	32
CAR (h)	46	21q21.1	7	Pankreas, Gehirn, Herz (Bergelson et al., 1998)	35
CAR (m)	46	16 C3.1	7	Leber, Herz, Lunge, Niere (Bergelson et al., 1998)	33
CTX (h)	34	11q24	7	Thymocyten, Lymphom (Chretien et al., 1996; Chretien et al., 1998)	31
ESAM (h)	41	11q24.2	7	Lunge, Herz (Hirata et al., 2001)	32
BT-IgSF (h)	44	3q16.32	7	Gehirn, Hoden (Suzu et al., 2002)	32

Eine genaue Exon-Zuordnung der einzelnen Domänen und Bereiche des Proteins UKW führte zu folgender Verteilung (siehe Tabelle 6). Das Signalpeptid dieses Proteins verteilt sich auf Exon 1 und 2. Für die beiden Immunglobulin C2-Typ-Domänen kodieren jeweils zwei Exons, d.h. für die erste Ig-C2-Domäne die Exons 2 und 3, für die zweite Ig-C2-Domäne Exons 4 und 5. Der extrazelluläre Bereich umspannt Exon 1 bis 6. Die Transmembrandomäne liegt auf Exon 6 und das größte Exon (7) mit 3934 bp deckt den

zytoplasmatischen Bereich von Protein UKW ab. Der Vergleich zwischen humanem UKW-Protein und murinem Asp-5-Protein bzgl. der Exon-Verteilung der einzelnen Domänen ergab, dass beide Proteine identisch aufgebaut sind.

Tabelle 6: Vergleich der Exon-Verteilung der einzelnen Domänen von humanem UKW und murinem Asp-5-Protein.

	UKW (h)		Asp-5 (m)	
Bereich/Domäne	Nukleotide	Exon-Nummer	Nukleotide	Exon-Nummer
Signalpeptid	1 – 54	1 + 2	1 – 45	1
Extrazellulärer Bereich	1 – 699	1 – 6	1 - 696	1 – 6
Ig-C2	78 – 354	2 + 3	87 - 384	2 + 3
Ig-C2	432 - 645	4 + 5	429 - 642	4 + 5
Transmembrandomäne	702 – 768	6	699 - 765	6
Zytoplasmatischer Bereich	771 – 1119	7	768 - 1119	7

5. Expressionsstudien zu *UKW*

Wie in Kapitel 1.2 bei der Verifizierung der Affymetrix-Ergebnisse auf Northern-Blot-Ebene gezeigt, wies der UKW-Rezeptor in der metastasierenden Pankreastumorzelllinie SUIT-2 007 eine 98,7-fache Überexpression auf. Das UKW-Transkript wurde in der nicht-metastasierenden Zelllinie SUIT-2 028 hingegen nicht exprimiert. Im Folgenden sollte die Prävalenz der *UKW*-Expression in humanen Zelllinien, normalen Geweben und Tumorgeweben bestimmt werden.

5.1 mRNS-Expression von *UKW* in humanen Zelllinien

Da das UKW-Transkript ausschließlich in der invasiven Zelllinie nachgewiesen wurde, sollte untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen dem mRNS-Niveau der cDNS *UKW* und dem invasiven Status mehrerer Brustkrebszelllinien besteht. Mittels quantitativer LigthCycler^{TM}-PCR wurden 9 invasive und 12 nicht-invasive humane Brustkrebszelllinien analysiert. Die Bestimmung wurde mit dem Primerpaar UKW2-sense und UKW2-antisense durchgeführt, bei der ein 200 bp langes Amplikon entstand. In den nicht-invasiven Zelllinien war keine bzw. eine nur sehr schwache mRNS-Expression von *UKW* festzustellen, wie in Abbildung 21 ersichtlich. Auffallend war, dass alle getesteten invasiven Brustkrebszelllinien UKW-positiv waren, obgleich eine signifikante Heterogenität an mRNS-Expression zu verzeichnen war. Die höchste relative Expression des

UKW-Transkripts konnte in den beiden Zelllinien Hs578T mit 5,2 und BT-549 mit 8,6 nachgewiesen werden. Die invasiven Zelllinien wiesen eine relative *UKW*-Expression von 0,2 bis 8,6 auf. Die invasive BT-2 0-Zelllinie hingegen zeigte fast eine Hintergrund-Expression vergleichbar mit der nicht-invasiven UCAA-812-Zelllinie.

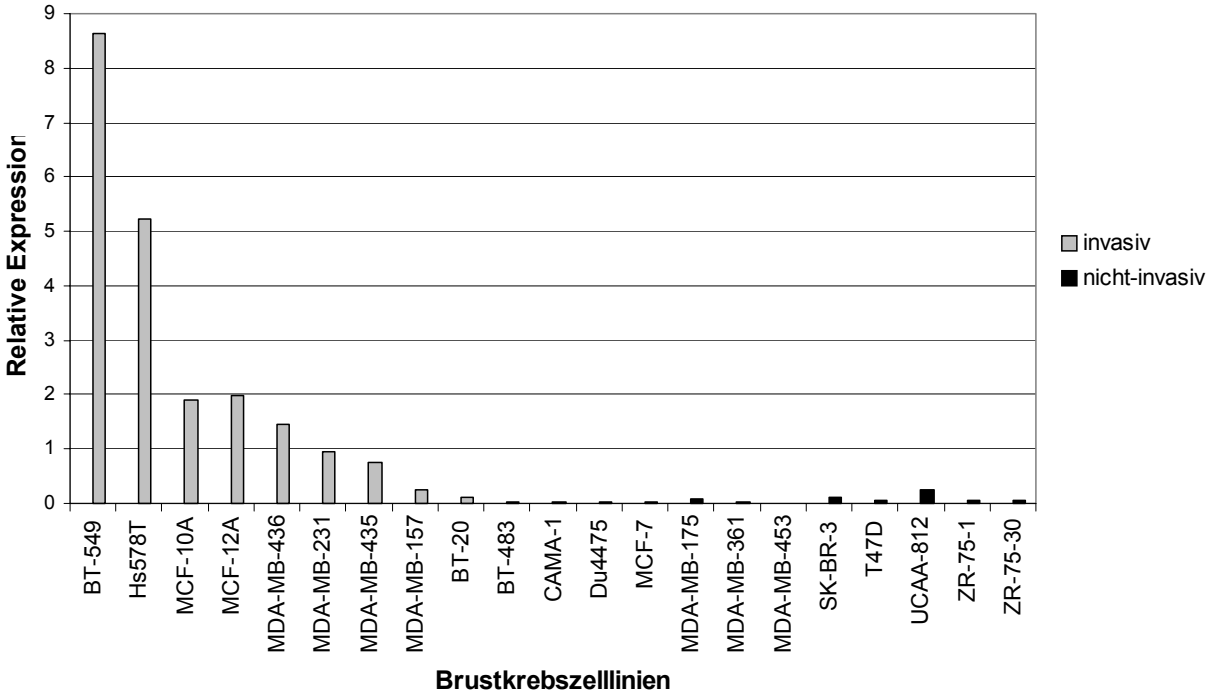


Abbildung 21: Relative Expression der mRNS für Gen *UKW* in Brustkrebszelllinien mittels LightCycler™-PCR. In die quantitative PCR wurde 1 µg DNase-I-behandelte Gesamt- RNS eingesetzt. Die Analysen wurden mit den Endkonzentrationen 0,5 µM (Primer UKW2-sense, UKW2-antisense) und 3 mM ($MgCl_2$) durchgeführt. Die Ergebnisse der Expression von UKW-mRNS stammen aus zwei unabhängigen Experimenten und sind als relative Werte dargestellt (siehe Material und Methoden). Eine Wasserprobe ohne DNS wurde zur Kontrolle der Primer-Dimerbildung durchgeführt. Untersucht wurden insgesamt 21 Brustkrebszelllinien, sowohl invasiven als auch nicht-invasiven Potenzials. Invasive Zelllinien sind im Balkendiagramm grau und nicht-invasive Zelllinien schwarz angezeigt.

5.2 Expression von *UKW*-mRNS in humanen Geweben

Als nächstes wurde die Expression des UKW-Transkripts in humanen Geweben mittels Northern Blot untersucht. Dazu wurde ein Multiple Tissue Expression (MTE) Array, auf dem die Poly-(A^+)-RNS einer größeren Anzahl von humanen Geweben und auch Zelllinien punktuell aufgetragen ist, mit einer 508 bp großen, α-[^{32}P]dATP markierten *UKW*-spezifischen Sonde aus dem 3´-UTR hybridisiert. Abbildung 22 zeigt das Ergebnis

dieses Arrays. Es ist erkennbar, dass das UKW-Transkript in allen analysierten Bereichen des Magen-Darm-Traktes (Spalte 5-6) detektierbar war. Ebenso konnte eine Expression der UKW-mRNS in einigen untersuchten Teilen des Gehirns (A1, A2, B1, B2) festgestellt werden. In Hauptschlagader (B4), Gebärmutter (D8) und Brustdrüse (F9) war ein hoher mRNS-Spiegel zu beobachten. Das UKW-Transkript war nicht nur in adulten Geweben, sondern auch in fötalen Geweben wie Gehirn, Herz, Niere und Lunge (Spalte 11) detektierbar. Die lymphatischen Organe zeigten eine unterschiedlich starke Expression von *UKW*. Während im Luftröhrengewebe (H7) die UKW-mRNS exprimiert wurde, ist eine Expression von *UKW* in Milz (C7), Thymus (D7), Blutlymphocyten (E7), Lymphknoten (F7) und Knochenmark (G7) nicht detektierbar. Auch die untersuchten Leukämie-Zelllinien HL-60 (A10), K-562 und MOLT-4 (C10, D10) sowie die Burkitt´s Lymphom-Zelllinien Raji und Daudi (E10, F10) exprimierten das UKW-Transkript nicht. Im Gegensatz dazu konnte in HeLa S3 (B10) die UKW-mRNS detektiert werden.

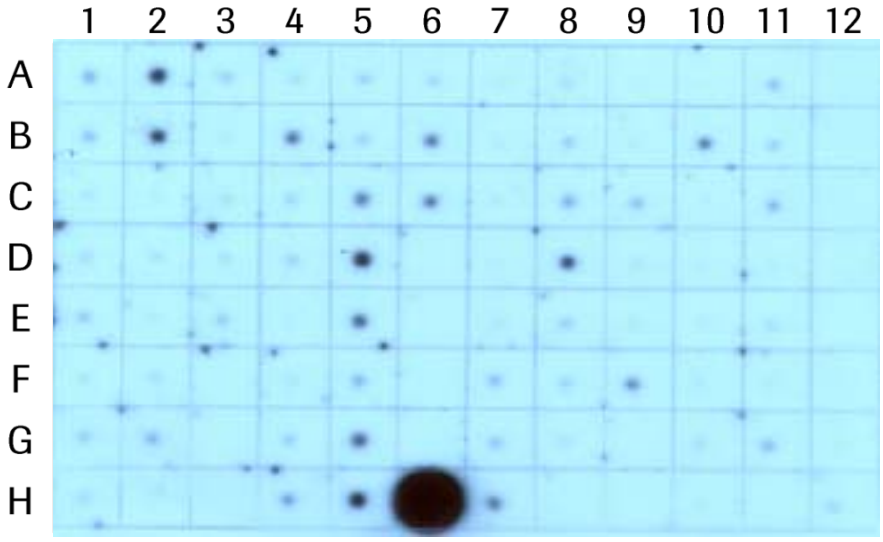


Abbildung 22: ‚Multiple Tissue Expression Array' zum Nachweis der *UKW*-Expression in normalen humanen Geweben. Zum Vergleich der Expressionsstärke wurden 10 µg Gesamt-RNS der *UKW*-exprimierenden SUIT-2 007-Zelllinie auf den Multiple Tissue Expression Array aufgetragen (H6). Der MTE-Blot wurde mit der 508 bp großen α-[^{32}P]dATP markierten *UKW*-spezifischen Sonde (Primer B1i-sense, B1i-antisense) unter Verwendung von Hybridisierungslösung bei 68°C über Nacht hybridisiert und dann für je 40 Minuten mit der Waschlösung 1 (2 x SSC, 0,05 % SDS; RT) und 2 (0,1 x SSC, 0,1 % SDS; 50°C) gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Membran in eine Folie eingeschweißt und ein Cronex Medical X-Ray Film bei –70°C für 62 Stunden exponiert. Das Schema, das die Art und die Position der Poly-(A^+)-RNS wiedergibt, ist in Kapitel 3.3 dargestellt.

5.3 ‚Cancer Profiling Array'

Eine Möglichkeit Transkriptspiegel in normalem, gesunden Gewebe mit dem in Tumorgewebe vergleichen zu können, bietet der ‚Cancer Profiling Array' (Clontech). Dieser Blot enthält 241 cDNS jeweils einer Normalgewebeprobe und einer Tumorprobe von identischen Patienten und insgesamt 13 verschiedenen Geweben. Hybridisiert wurde der Blot mit der 508 bp großen α-[^{32}P]dATP markierten *UKW*-spezifischen Sonde aus dem 3´untranslatierten Bereich. Das Ergebnis ist in Abbildung 23 dargestellt. Die UKW-mRNS wurde hauptsächlich in den normalen Geweben Brust, Gebärmutter, Dickdarm und Mastdarm exprimiert. Ebenso konnte eine schwache Expression der UKW-mRNS in diversen Tumorproben der genannten Gewebe festgestellt werden. In 2 Tumorgeweben des Magens war eine Überexpression zu detektieren. Ansonsten war in Tumorgeweben des Magens, der Niere, der Schilddrüse, der Prostata und der Gebärmutter kein UKW-mRNS-Spiegel festzustellen. Das Expressionsmuster von *UKW* in normalen Geweben, das sich aus diesem Cancer Profiling Array ergab, bestätigte die Daten des Multiple Tissue Arrays, wie unter 5.2 gezeigt.

Für das im Rahmen dieser Arbeit bevorzugt interessierende Gewebe, die Bauchspeicheldrüse, ist nur eine Gewebeprobe auf dem Blot aufgetragen. Diese zeigte keine detektierbare Expression des UKW-Transkripts, weder im Normal- noch im Tumorgewebe. Da das Gen *UKW* in einer Pankreastumorzelllinie nachgewiesen wurde, wurde im folgenden Kapitel 5.4 das Expressionsprofil von *UKW* in verschiedenen Pankreastumorgeweben im Vergleich zu normalen Pankreasgeweben untersucht.

Zur Kontrolle des Cancer Profiling Arrays wurde dieser gestrippt und anschließend mit einer Ubiquitin-spezifischen Sonde hybridisiert (siehe Anhang Kapitel 11).

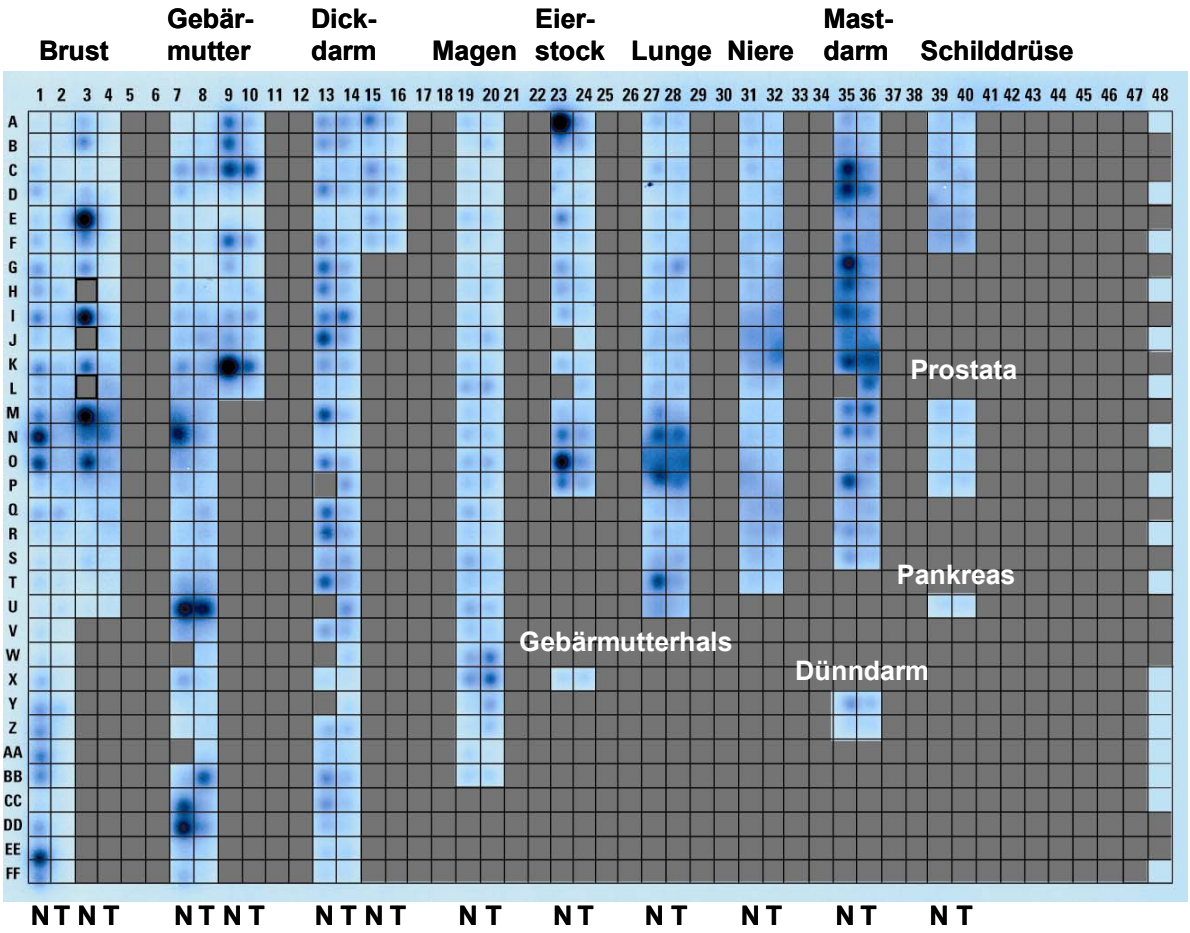


Abbildung 23: Cancer Profiling Array zur Untersuchung der *UKW*-Expression in humanen Normal- und Tumorgeweben. Ein Cancer Profiling cDNS Filter wurde mit der 508 bp großen α-[^{32}P]dATP markierten *UKW*-spezifischen Sonde bei 68°C über Nacht hybridisiert. Die *UKW*-spezifische Sonde wurde in einer RT-PCR unter Verwendung der Primer B1i-sense und B1i-antisense amplifiziert. Nach dem Waschen des Blots wurde ein Röntgenfilm bei -70°C für 40 Stunden exponiert. Untersucht wurden folgende Gewebe: Brust, Gebärmutter, Dickdarm, Magen, Eierstock, Lunge, Niere, Mastdarm, Schilddrüse, Gebärmutterhals, Prostata, Pankreas und Dünndarm. Korrespon-dierendes Normal- (N) und Tumorgewebe (T) ist nebeneinander aufgetragen. Zur Kontrolle der cDNS-Menge wurde der Blot gestrippt und anschließend mit einer Ubiquitin-spezifischen Sonde hybridisiert (siehe Anhang Kapitel 11).

5.4 Expression von *UKW* in humanen normalen Pankreasgeweben, chronischen Pankreatitiden und Pankreastumorgeweben

Beim Vergleich der beiden Pankreastumorzelllinien SUIT-2 007 und SUIT-2 028 wurde *UKW* als bis dato unbekanntes Gen identifiziert. In dieser Arbeit wurden deshalb zunächst weiterführende Expressionsanalysen zum Vorkommen des Transkripts in humanen Pankreasgeweben durchgeführt.

Die Expression von *UKW* wurde mittels TaqMan®-PCR in humanem, normalem Pankreasgewebe, chronischen Pankreatitiden und Pankreastumorgeweben verschiedener Patienten untersucht. Insgesamt wurde die mRNS in 15 Pankreaskarzinomen, 3 chronischen Pankreatitiden und 7 normalen Pankreasgeweben quantifiziert. Dazu wurde aus den Geweben die Gesamt-RNS isoliert. Bei der hier angewandten quantitativen RT-PCR wurde die TaqMan®-Technologie mit SYBR-Green als Detektionsreagenz eingesetzt. Für die Quantifizierung wurde das Primerpaar UKW1-sense und UKW1-antisense verwendet, welches ein 50-bp-Fragment amplifizierte. Abbildung 24 zeigt das Ergebnis der quantitativen TaqMan®-PCR in normalem Pankreasgewebe, chronischen Pankreatitiden und Pankreastumorgeweben. Das UKW-Transkript konnte in allen 7 normalen Pankreasgeweben nur sehr schwach mit einer durchschnittlichen relativen Expression von 1,0 nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich eine sehr niedrige relative Expression von UKW-mRNS in den 3 untersuchten chronischen Pankreatitiden von 1,2. Auffallend war eine sehr starke Abundanz des Transkripts für *UKW* in den Geweben der Pankreaskarzinom-Patienten. In 13 von 15 Tumorgeweben wurde die UKW-mRNS wesentlich stärker exprimiert als in den normalen Geweben. Die relativen mRNS-Spiegel in den Pankreastumorgeweben betrugen 7,3 bis 155. Eine durchschnittliche relative Expression von UKW-mRNS wurde mit 25,9 festgestellt. *UKW* wies also eindeutig eine Überexpression in Pankreastumorgeweben zu normalen Pankreasgeweben auf.

Die Pankreastumorgewebe wurden entsprechend der Tumorstadium-Klassifikation (TNM) beurteilt nach Tumorgewebe ohne Metastasen, Tumorgewebe mit regionalen Metastasen und Tumorgewebe mit Fernmetastasen (siehe Material und Methoden). Eine Korrelation zwischen der UKW-mRNS-Expression und einem bestimmten Tumorstadium konnte nicht hergeleitet werden.

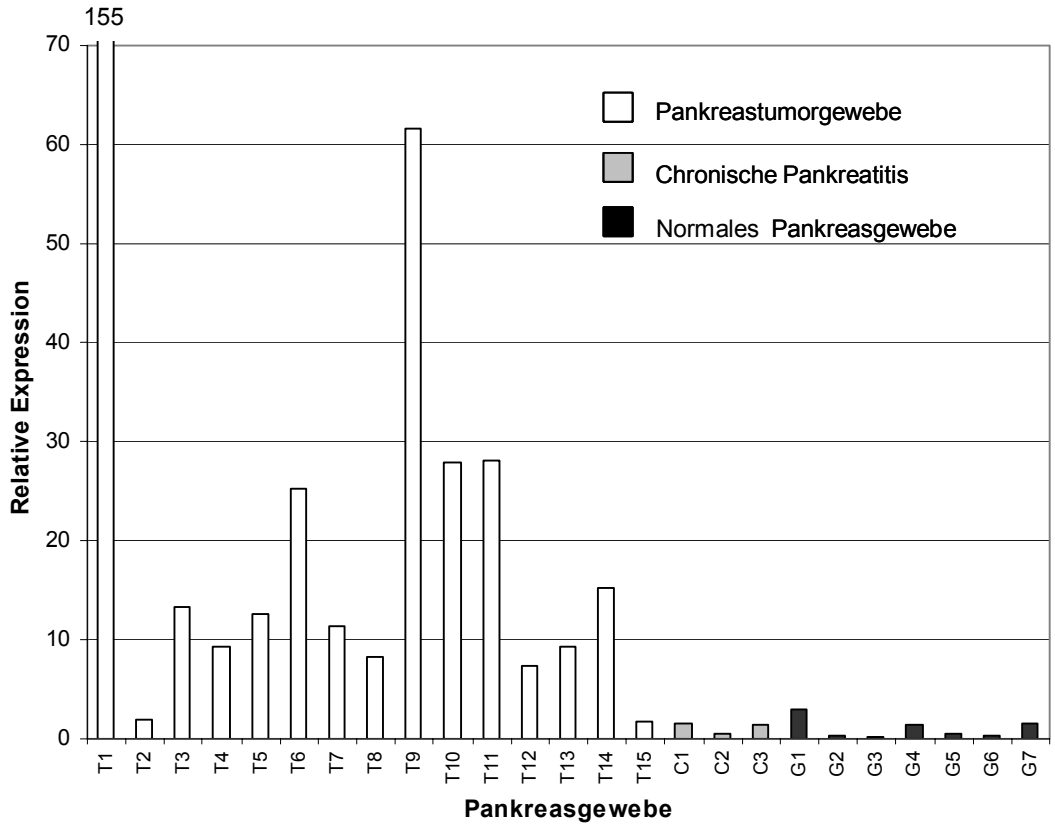


Abbildung 24: Relative Expression der mRNS-Expression von *UKW* in normalen Pankreasgeweben, chronischen Pankreatitiden und Pankreastumorgeweben. Aus Adenokarzinomen des Pankreas, chronischen Pankreatitiden und normalem Pankreasgewebe wurde Gesamt-RNS isoliert und davon jeweils 10 µg Gesamt-RNS in 20 µl Gesamtvolumen für die cDNS-Synthese eingesetzt. Für die quantitative Echtzeit-PCR wurden 200 ng cDNS und die Primer UKW1-sense und UKW1-antisense eingesetzt. Folgende PCR-Konditionen wurden verwendet: Initialschritt 2 min bei 50°C, 10 min bei 95°C, 40 Zyklen für 15 sec bei 95°C und 60 sec bei 60°C. Für jede cDNS wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zur Normalisierung wurde das Haushaltsgen XS13 herangezogen. Untersucht wurden folgende humane Gewebe: 7 gesunde Pankreasgewebe (G 1-7), 3 chronische Pankreatitiden (C 1-3) und 15 Tumorgewebe des Pankreas (T 1-15). Dargestellt ist die relative Expression von UKW-mRNS des entsprechenden Gewebes im Vergleich zur mRNS-Expression in normalen Geweben (siehe Material und Methoden).

6. Spezifischer Nachweis des UKW-Proteins

6.1 Gewinnung polyklonaler anti-UKW-Antiseren

Die UKW-spezifischen Peptide wurden mit Hilfe der Programme ‚PeptideStructure' und ‚PlotStructure' in GCG (Genetics Computer Group, Inc.; Pharmacopeia Inc., San Diego, CA, USA) generiert. Um eine Möglichkeit zum direkten Nachweis des UKW-Proteins zu erhalten, wurden im Auftrag (Eurogentec, Seraing, Belgien) zwei Kaninchen mit zwei UKW-spezifischen synthetischen Peptiden aus dem hypothetisch extrazellulären und zytoplasmatischen Bereich immunisiert, so dass zwei verschiedene polyklonale Antiseren (Peptid 1: H_2N-CQRIREKEGEDERLPPK-$CONH_2$, AS 167 – 182; Peptid 2: H_2N-STANSASRSQRTLSTC- $CONH_2$, AS 306 – 320) zur Verfügung standen.
Die Seren wurden über einen *ELISA*-Test auf Peptid-spezifische Antikörper analysiert. Dabei hatte sich gezeigt, dass die Kaninchen gute IgG-Titer gegen Peptid 2 entwickelt hatten, während gegen Peptid 1 eine etwas schwächere Antigenbindung im *ELISA* nachzuweisen war. Nachdem sich mittels *ELISA*-Test herausgestellt hatte, dass die beiden Antiseren aus den Immunisierungen gegen UKW-Peptide spezifisches IgG enthielten, wurden diese mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt.

6.2 UKW-Expression in SUIT-2 007- und SUIT-2 028-Lysaten mittels Western-Blot

Beide Antiseren wurden zunächst im Western-Blot auf das Vorhandensein UKW-spezifischer Immunglobuline getestet. Aus den Zelllinien SUIT-2 007 und SUIT-2 028 wurden Zelllysate hergestellt und einer SDS-PAGE unterzogen. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran mittels Western-Blot übertragen und mit den beiden Antiseren inkubiert.
Nach Inkubation mit Antiserum 1 dominierten auf beiden Blots der Lysate von SUIT-2 007 und SUIT-2 028 mehrere verschieden große Banden. Für UKW wäre eine Bande im Bereich um 41 kD erwartet worden (MW unglykosyliert 41,3 kD). Diese war jedoch mit Antiserum 1 nicht nachweisbar (Abbildung 25A).
Das anti-UKW-Antiserum 2 erkannte im Lysat der Zelllinie SUIT-2 007 (Spur 1) zwei etwa 41 und 42 kD-Proteine, die ca. dem errechneten Molekulargewicht von UKW (41 kD) entsprachen. Die Immunoblot-Analyse ist in Abbildung 25B dargestellt. Dass es sich bei diesem Protein tatsächlich um endogenes UKW handelte, wurde durch den Befund unterstützt, dass keine Bande auf der gleichen Höhe in dem Immunoblot des Lysates von UKW-negativen SUIT-2 028-Zellen zu erkennen war (Spur 2). Die kleinere der beiden Banden ist vermutlich ein Abbauprodukt.

Somit konnte im Western-Blot bestätigt werden, dass das polyklonale Antiserum 2 aus den Immunisierungen gegen UKW-Peptide spezifisches Immunglobulin enthält. Zudem konnte die differentielle Expression von UKW in dem Pankreastumor-Modellsystem, wie sie in Kapitel 1.2 mittels Microarray-Technologie und Northern-Blot-Analyse gezeigt wurde, nicht nur auf mRNS-Ebene sondern auch auf Protein-Ebene, verifiziert werden.

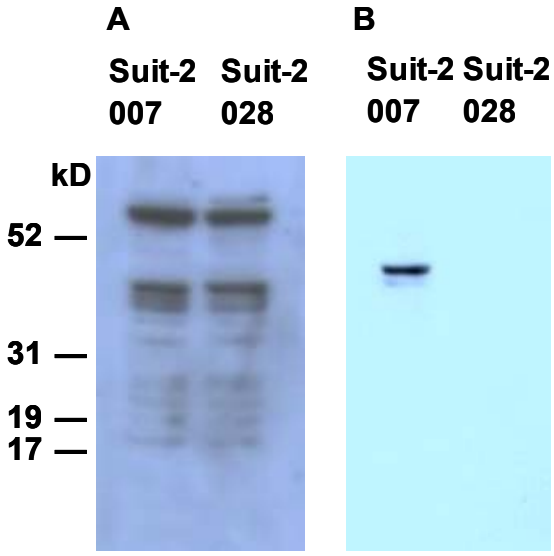


Abbildung 25: Evaluierung der anti-UKW-Antiseren im Immunoblot-Experiment.

Es wurden jeweils 30 µg Gesamtzellprotein von UKW-positiven SUIT-2 007-Zellen und UKW-negativen SUIT-2 028-Zellen auf ein Bis/Tris-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V in 20 x Laufpuffer NuPAGE MES/SDS. Die aufgetrennten Proteine wurden mit der Semidry-Blotting-Methode unter Verwendung von Transferpuffer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit Western Blotting Substrat unter Erzeugung eines chemilumineszenten Signals nachgewiesen.

A: Immunoblot-Experiment mit Antiserum 1. Auf dem Blot waren unspezifische und nicht-deregulierte Banden in den Lysaten von SUIT-2 007- und SUIT-2 028-Zellen zu sehen.

B: Das UKW-Antiserum 2 erkannte spezifisch zwei 41 und 42 kD-Proteine im Immunoblot eines Lysates von SUIT-2 007-Zellen (Spur 1). Der Immunoblot eines Lysates von UKW nicht-exprimierenden SUIT-2 028-Zellen zeigte kein Signal auf der entsprechenden Höhe (Spur 2).

7. Zellbiologische Untersuchungen zu *UKW*

7.1 Klonierung von *UKW* in den eukaryontischen Expressionsvektor pEGFP-N3

Zunächst musste *UKW* in den Expressionsvektor pEGFP-N3 (Clontech) kloniert werden, um eine Expression und die Bestimmung der Lokalisation in den SUIT-2 007 und SUIT-2 028-Zellen zu ermöglichen. Zur Herstellung des UKW-GFP-Fusionsproteins, wurde die kodierende Sequenz von *UKW* ohne STOP-Codon aus pCR2.1 an den N-Terminus des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in die *Sal*I/*Bam*HI-Restriktions-schnittstellen des pEGFP-N3-Vektors kloniert und anschließend sequenziert. Dazu wurden die Oligonukleotide UKW7-sense und UKW7-antisense verwendet. Damit konnte UKW als Fusionsprotein mit GFP in den SUIT-2 007- und SUIT-2 028-Zellen exprimiert werden. Das resultierende Plasmid wurde als pEGFP-N3-UKW bezeichnet.

7.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Zur Ermittlung der Effektivität verschiedener Transfektionsreagenzien wurden SUIT-2 028-Zellen mit dem GFP-Expressionsvektor pEGFP-N3 (Clontech) transient transfiziert und anschließend die Anzahl der GFP-positiven Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Zusätzlich wurden verschiedene Verhältnisse der Mengen Vektor-DNS und Transfektionsreagenz sowohl in serumfreiem als auch serumhaltigem Medium auf deren Transfektionseffizienz getestet.
SUIT-2 028-Zellen wurden in einer 6-Lochplatte ausgesät und am darauffolgenden Tag wie unter 2.3.2 beschrieben entweder mittels FuGene, Lipofektin, Lipofectamin2000 oder dem Agens LipofectaminPlus transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer die GFP-Fluoreszenz gemessen. Tote Zellen wurden ausgegrenzt und der Anteil der fluoreszierenden Zellen analysiert.
Für jedes Transfektionreagenz wurde bei Durchführung der Transfektion in serumfreiem Medium eine wesentlich höhere Transfektionseffizienz im Vergleich zur Durchführung in serumhaltigem Medium festgestellt. Bei Lipofectin betrug diese beispielsweise das 5-fache (Abbildung 26A) und bei Lipofectamin2000 sogar das 6-fache. Zusätzlich zur Durchführung mit bzw. ohne serumhaltiges Medium wurde der Einfluss des Verhältnisses an Vektor-DNS zum Transfektionsreagenz untersucht. Es zeigte sich, dass eine größere Menge Vektor-DNS eine niedrigere Transfektionseffizienz zur Folge hat.

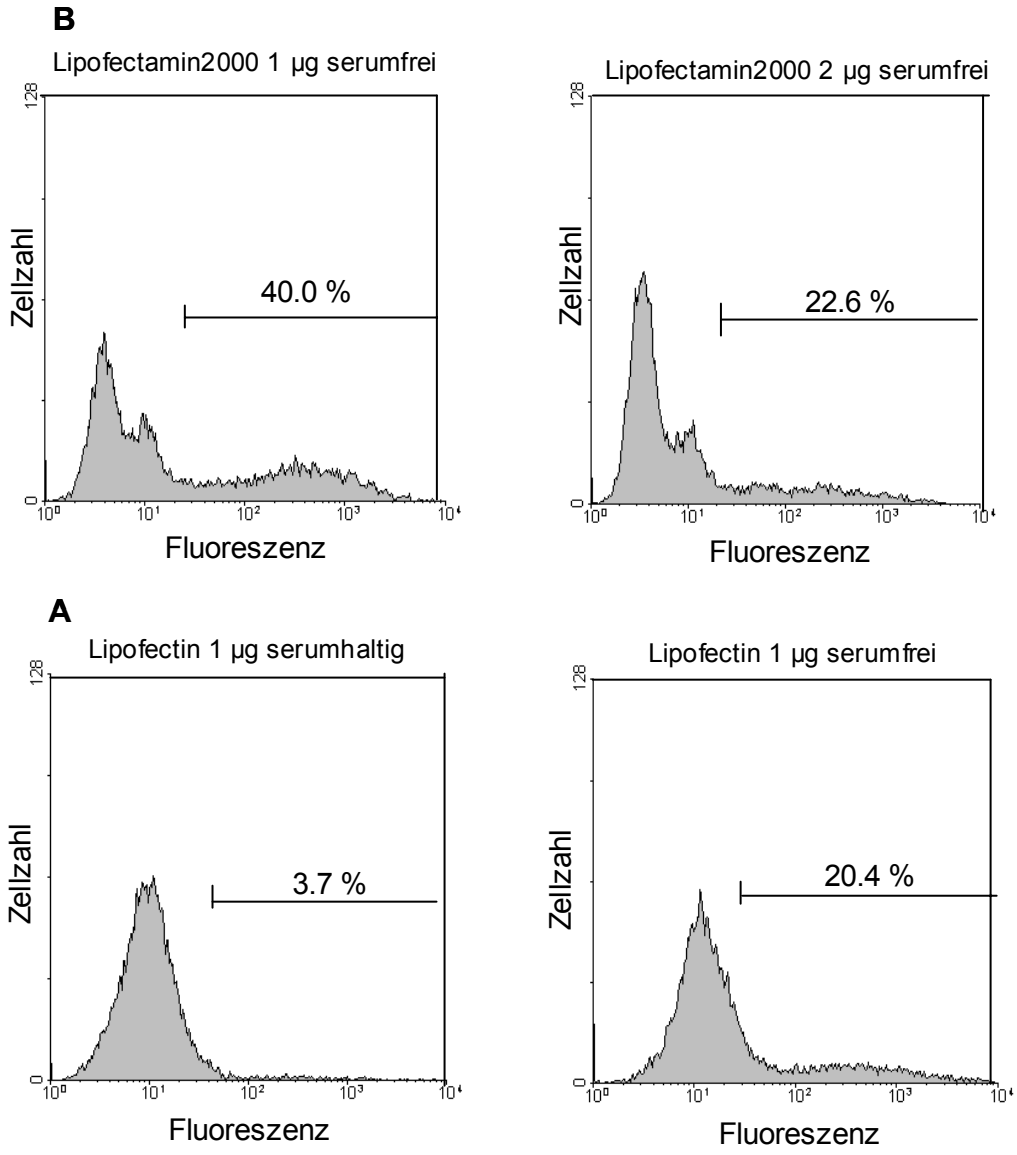


Abbildung 26: Durchflusszytometrischer Nachweis der Transfektionseffizienz verschiedener Transfektionsreagenzien in SUIT-2 028-Zellen.

Je Probe wurden 1 x 10^4 Zellen analysiert. Die Zellen wurden nach Transfektion mit dem GFP-Expressionsvektor pEGFP-N3 für 24 h inkubiert und anschließend die Anzahl der GFP-positiven Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. In den Histogrammen ist die Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab) aufgetragen. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil GFP-positiver Zellen der Kultur. Es ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes gezeigt (2-fach Ansatz), das in zwei weiteren Experimenten reproduziert werden konnte.

A: Durchflusszytometrische Untersuchung von Lipofectin-transfizierten SUIT-2 028-Zellen mit bzw. ohne Serum.

B: Durchflusszytometrische Untersuchung von Lipofectamin2000 (1 µg und 2 µg)-transfizierten SUIT-2 028-Zellen.

Mit Lipofectamin2000 konnten bei einem Verhältnis Vektor-DNS zu Transfektionsreagenz 1:2, 40 % GFP-positive Zellen festgestellt werden bzw. nur 23 % bei einem Verhältnis 1:1 (Abbildung 26B). Für die FuGene- und LipofectaminPlus-Transfektion lagen die Werte mit 2 % bzw. 13 % wesentlich niedriger.

Bei der Kontrolle, ob das Transfektionsreagenz alleine bereits einen Einfluss auf die Zellen hat, wurde bei Verwendung von Lipofectin und LipofectaminPlus ein ‚Anschwellen' der Zellen beobachtet, d.h. deren Autofluoreszenz hat sich erhöht.

Da die beste Transfektionsrate mit Lipofectamin2000 in serumfreiem Medium mit 1 µg DNA erzielt wurde, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit für die Transfektion zur Etablierung stabiler Transfektanten Lipofectamin2000 verwendet. Für die transiente Expression wurde ebenso mit Lipofectamin2000 transfiziert.

7.3 Lokalisation von UKW in transient transfizierten SUIT-2 007- und SUIT-2 028-Zellen mittels Immunfluoreszenz

Um die zelluläre Lokalisation von UKW zu bestimmen, wurde das Fusionsprotein UKW-GFP sowohl in die UKW-negativen SUIT-2 028-Zellen als auch in die UKW exprimierenden SUIT-2 007-Zellen transient transfiziert und diese Zellen mit einem konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop untersucht und repräsentative Zellen fotografiert. Es zeigte sich eindeutig, dass UKW in der Plasmamembran der transfizierten SUIT-2 028-Zellen lokalisiert ist (Abbildung 27). Mittels einer TMHMM-Analyse der Aminosäuresequenz von UKW wurde überprüft, ob UKW eine Transmembrandomäne aufweist, wodurch seine Lokalisation erklärt werden könnte. Es zeigte sich, dass eine Transmembrandomäne vorhanden ist, welche für die Lokalisation in der Plasmamembran von UKW verantwortlich ist.

Wie aus Abbildung 28 ersichtlich, zeigte die UKW-GFP-Fluoreszenz in den SUIT-2 007-Zellen eine Lokalisation von UKW in der Plasmamembran und interessanterweise eine gehäuft auftretende Fluoreszenz bei Zell-Zell-Kontakt.

Die Abbildung 28 zeigt Zellen, die ausschließlich entlang der Zell-Zell-Kontaktstellen UKW aufwiesen. Zusätzlich zu der Markierung im Kontaktbereich der Zellen wurde eine vesikuläre Färbung im Zytoplasma nachgewiesen (nicht gezeigt). Diese Färbung erstreckte sich im Großteil der beobachteten Zellen auf die Regionen zwischen Zellkern und Kontaktbereich zu anderen Zellen und entsprach wahrscheinlich dem gerichteten UKW-Proteintransport vom Golgi Apparat zu den Zell-Zell-Kontakten. Die Zellmembran außerhalb des Zell-Zell-Kontaktbereiches zeigte keine UKW-Lokalisation. Als Negativkontrolle wurde in beide Zelllinien der GFP-Expressionsvektor pEGFP-N3 alleine transfiziert und anschließend die GFP-Lokalisation analysiert (Abbildung 29). Zum besseren Erkennen der einzelnen Zellkompartimente wurden die Zellen mit fluoreszierenden Vitalfarbstoffen behandelt. Der Golgi Apparat wurde mit Bodipy-TR rot und der Zellkern mit dem Farbstoff Hoechst blau gefärbt.

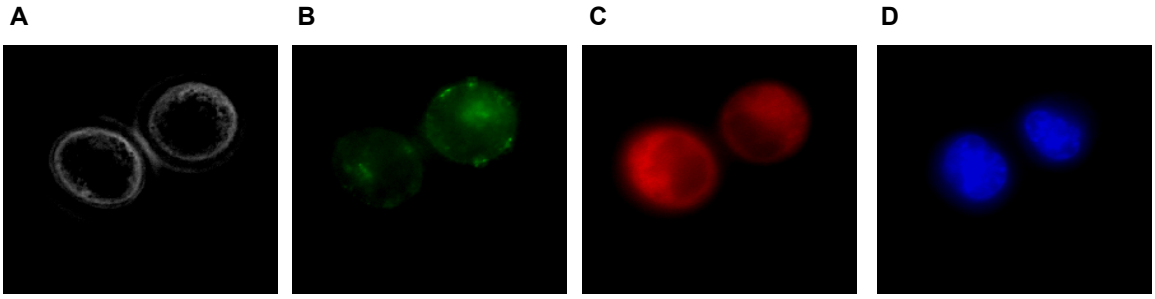


Abbildung 27: Immunfluoreszenz-Analyse von SUIT2 028-Zellen zur Untersuchung der Lokalisation von UKW. 2 x 10^5 Zellen wurden pro Schale ausgesät und am darauf folgenden Tag transfiziert. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop Zeiss Axiovert 135. Die Signale wurden mit einer 3-CCD-Farbvideokamera aufgenommen und mit der Software MetaMorph ausgewertet. Phasenkontrast der SUIT-2 028-Zellen (A). Mit pEGFP-N3-UKW transient transfizierte SUIT-2 028-Zellen wurden mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert (B). Der Golgi Apparat wurde zusätzlich mit Bodipy-TR, einem fluoreszierenden Farbstoff für Ceramid-Analoge, rot angefärbt (C). Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst (blau) (D). 64-fache Vergrößerung.

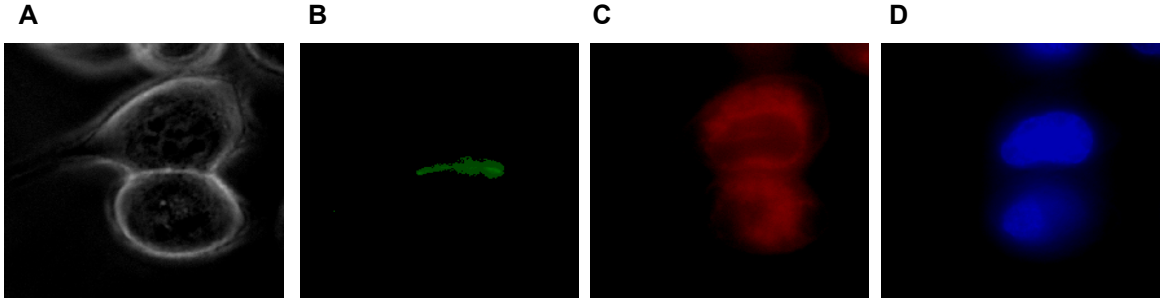


Abbildung 28: Immunfluoreszenz Darstellung der UKW-Expression in transient transfizierten SUIT-2 007-Zellen. Bild A: Phasenkontrast; Bild B: Grün fluoreszierendes Protein (Fusionskonstrukt UKW-GFP); Bild C: Golgi Apparat Färbung mit Bodipy TR (rot) und Bild D: Hoechst Zellkernfärbung. Vergrößerung 64-fach.

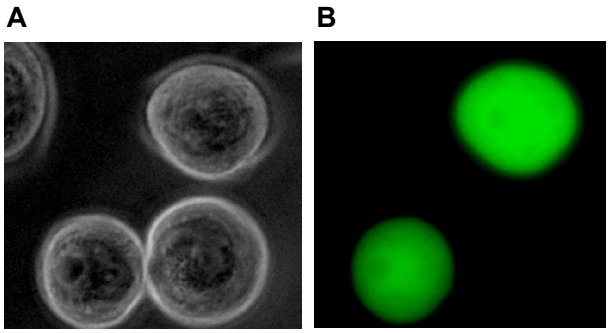


Abbildung 29: Lokalisationsmuster des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in transient transfizierten SUIT-2 028-Zellen.

A: Phasenkontrast der SUIT-2 028-Zellen

B: MOCK-Transfektion der SUIT-2 028-Zellen (nur GFP-Vektor)

7.4 Doxycyclin-induzierbare Expression von *UKW* in SUIT-2 028-Zellen

Zur stabilen Überexpression von *UKW* in SUIT-2 028-Zellen wurde das tet-on-System verwendet. Mittels dieses Systems ist es möglich, die Expression des stabil transfizierten *UKW*-Gens durch Zugabe von Tetracyclin bzw. des stabileren Tetracyclin-Derivates Doxycyclin zu induzieren. Dieses System hat den Vorteil, dass der gleiche stabile Klon in An- und Abwesenheit des transfizierten Proteins untersucht werden kann, so dass klonale Effekte ausgeschlossen werden können. Für die Etablierung des tet-on-Systems war nur ein Transfektionsschritt notwendig. Der Expressionsvektor pBIG2i (von Strathdee et al.) wurde in die SUIT-2 028-Zellen stabil transfiziert (Strathdee et al., 1999). Er kodierte sowohl für den ‚reversen Tet-Repressor', als auch für das zu untersuchende Protein unter Kontrolle des Tetracyclin-Response-Element. Bei dem ‚reversen Tet-Repressor' handelte es sich um einen Transkriptionsfaktor, der nur in Anwesenheit von Doxycyclin an seine DNS-Bindungssequenz, das Tetracyclin-Response-Element binden und die Transkription des am 3´-Ende dieses Promotor-Elementes vorhandenen offenen Leserahmens aktivieren konnte. Eine Expression des zu untersuchenden Proteins konnte nur in Anwesenheit von Doxycyclin erfolgen, da der ‚reverse Tet-Repressor' nur dann die Transkription der entsprechenden cDNS induzieren konnte.

7.4.1 Klonierung von *UKW* in den eukaryontischen Expressionsvektor pBIG2i

Die *UKW*-cDNS wurde mittels PCR aus pCR2.1 (siehe 4.1) in den Vektor pBIG2i kloniert. In der PCR wurden die Oligonukleotide UKW8-sense und UKW8-antisense verwendet, mittels derer am 5´-Ende eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle und am 3´-Ende eine *Spe*I-Restriktionsschnittstelle eingeführt wurden, so dass das PCR-Fragment nach entsprechendem Restriktionsverdau in pBIG2i kloniert werden konnte. Anschließend wurde die cDNS zur Kontrolle sequenziert. Das resultierende Plasmid wurde als pBIG2i-UKW bezeichnet.

7.4.2 Stabile Transfektion von pBIG2i-UKW in SUIT-2 028-Zellen

pBIG2i-UKW wurde stabil in SUIT-2 028-Zellen transfiziert. Nach einem Tag wurde der Selektionsmarker HygromycinB (0,3 mg/ml) den Transfektanten zugesetzt. Nach etwa 3 Wochen waren ca. 60 Einzelkolonien bei den UKW-Transfektanten und bei den MOCK-Transfektanten ca. 18 sichtbar. 29 Klone der UKW-Transfektanten und 15 MOCK-Klone wurden isoliert, in 96-Lochplatten überführt und bis zu ausreichenden Zellzahlen propagiert. Zur Überprüfung der Doxycyclin-Induzierbarkeit der *UKW*-Expression wurden die Klone im Folgenden mit 2 µg/ml Doxycyclin bzw. ohne Doxycyclin für 24 Stunden kultiviert und die Gesamt-RNS isoliert.

7.4.3 Nachweis der *UKW*-Expression in stabil transfizierten SUIT-2 028-Zellen im Northern-Blot

Nachdem die Gesamt-RNS der Transfektanten sowohl ohne Doxycyclin als auch nach Doxycyclingabe isoliert wurde, erfolgte die Untersuchung der *UKW*-Expression mittels Northern-Blot-Analyse. Als Sonde diente das PCR-Fragment, das Teile des offenen Leserahmens abdeckte. Eine repräsentative Auswahl von 6 Klonen ist in Abbildung 30 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass zum einen Klone selektioniert wurden, die sowohl eine Induzierbarkeit der *UKW*-Expression in Anwesenheit von Doxycyclin, als auch eine Repression der Expression in Abwesenheit von Doxycyclin zeigten (Klon 1-3). Diese Klone sind für weitere Untersuchungen sehr gut geeignet. Zum anderen gab es jedoch auch Klone, in denen die Expression von *UKW* entweder nicht mit Doxycyclin induziert (Klon 4, 5) oder ohne Doxycyclin reprimiert (Klon 6) werden konnte. Diese Klone wurden nicht weiter untersucht. In Abbildung 35 sind zusätzlich drei MOCK-Transfektanten dargestellt, die keine *UKW*-Expression aufwiesen.
Mittels dieser Northern-Blot-Analysen konnten von den 29 isolierten Klone 7 als negativ und 22 als positiv bewertet werden.

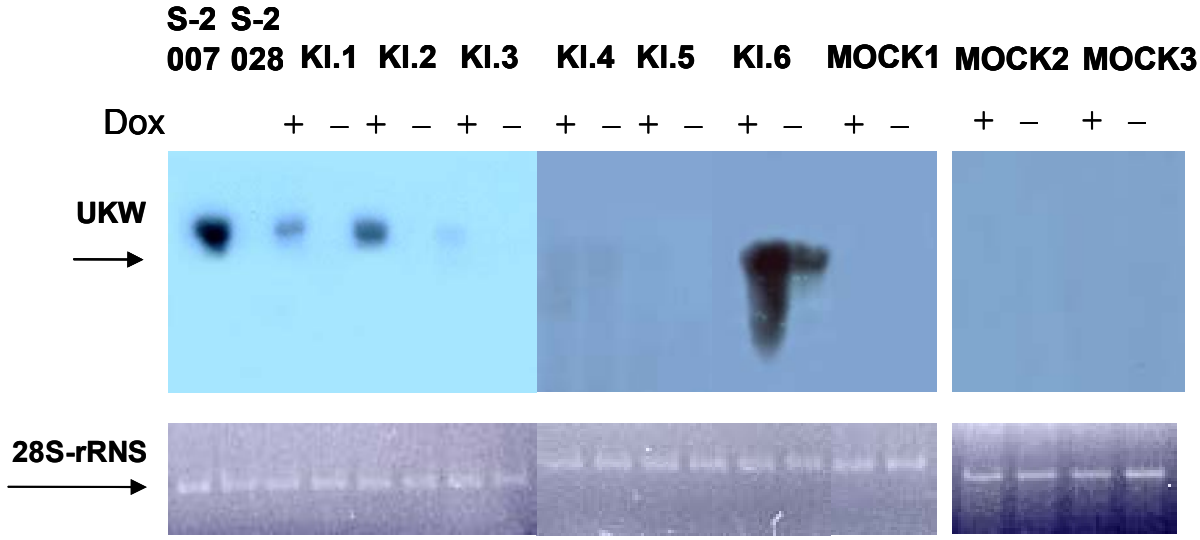


Abbildung 30: Northern-Blot-Analyse zum Nachweis der Expression von *UKW* in SUIT-2 028-Transfektanten. Stabile Transfektanten (Klone 1-6) wurden für 24 Stunden mit (+) bzw. ohne (-) Doxycyclin (Dox) kultiviert und anschließend die Gesamt-RNS isoliert. Je 10 µg Gesamt-RNS wurden einem Northern-Blot unterzogen, wobei als Positivkontrolle UKW-exprimierende SUIT-2 007-Zellen und als Negativkontrolle SUIT-2 028-Zellen und MOCK-Transfektanten dienten. Die Blots wurden mit der *UKW*-spezifischen α-[^{32}P]dATP markierten Sonde über Nacht bei 68°C hybridisiert (Primer UKW6-sense, UKW6-antisense). Nach dem Waschen der Blots wurde ein Röntgenfilm bei -70°C für 15 Stunden exponiert. Die aufgetragene RNS-Menge wurde durch Ethidiumbromidfärbung des Formaldehyd-Agarosegels anhand der 28S-rRNS unter UV-Licht überprüft.

7.4.4 UKW-Nachweis in SUIT-2 028/UKW-Transfektanten mittels Western-Blot

Mittels Immunoblot-Analyse wurden die bereits auf Northern-Blot-Ebene getesteten SUIT-2 028/UKW-Transfektanten und die MOCK-transfizierten SUIT-2 028-Klone auf deren UKW-Expression untersucht. Als Positivkontrolle diente, wie bereits im Western-Blot (siehe 6.2) gezeigt, die UKW-exprimierende Zelllinie SUIT-2 007. Für die Negativ-kontrolle wurde SUIT-2 028 herangezogen, die UKW nicht exprimiert. Zur Überprüfung der Doxycyclin-Induzierbarkeit der UKW-Expression wurden die Klone mit (2 µg/ml) bzw. ohne Doxycyclin für 24 Stunden kultiviert und Zelllysate hergestellt. Diese Lysate wurden mittels anti-UKW-Immunoblot untersucht. In Abbildung 31 ist die UKW-Expression der Klone dargestellt mit welchen im Folgenden die Zellkulturassays durchgeführt wurden. Es ist zu erkennen, dass alle drei SUIT-2 028/UKW-Klone bei Doxycyclingabe UKW exprimierten. Dabei sieht man, dass sich die einzelnen Klone in ihrer Expressionsstärke nur minimal unterschieden. Eine Induzierbarkeit der UKW-Expression ohne Anwesenheit von Doxycyclin konnte wie erwartet nicht gezeigt werden. Diese Klone waren für weitere Untersuchungen somit sehr gut geeignet. Zum anderen wurden drei MOCK-

Transfektanten auf deren UKW-Expression analysiert. Diese waren sowohl nach als auch ohne Doxycyclingabe UKW-negativ. Diese drei MOCK-Transfektanten wurden als Kontrolle für geplante Zellkulturassays verwendet.

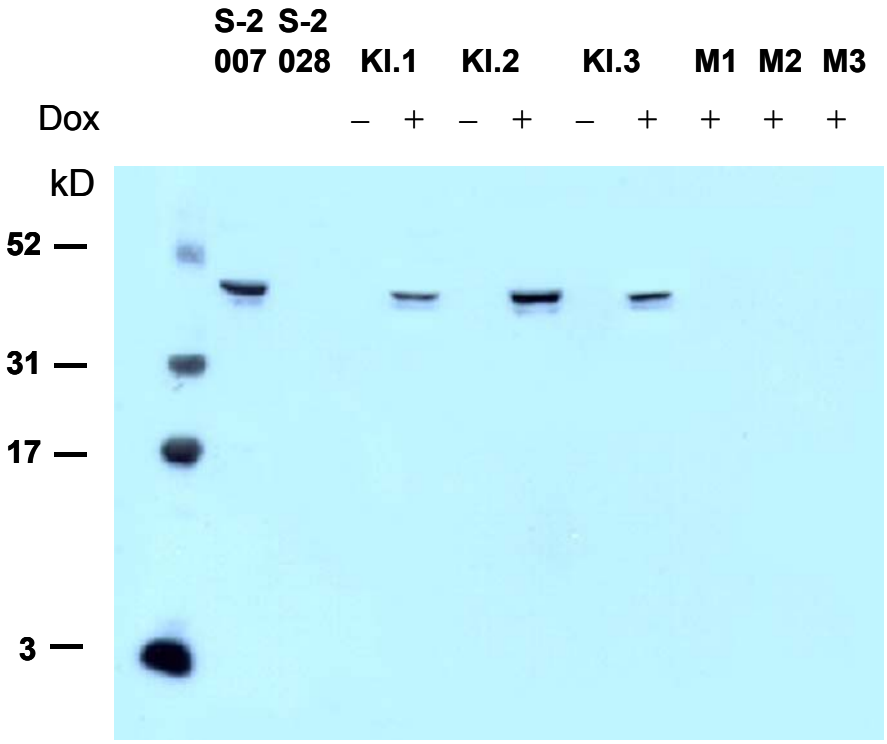


Abbildung 31: Immunoblot-Analyse zum Nachweis der Expression von UKW in SUIT-2 028-Transfektanten. Stabile SUIT-2 028-Transfektanten (Kl.1, Kl.2 und Kl.3) wurden für 24 Stunden mit (+) bzw. ohne (-) Doxycyclin (Dox) kultiviert und anschließend lysiert. Je 30 µg des Gesamtzellproteins wurden einem anti-UKW-Immunoblot unterzogen, wobei als Negativkontrolle SUIT-2 028-Zellen und UKW-negative MOCK-Transfektanten (M1, M2 und M3) dienten. Als Positivkontrolle wurden UKW-exprimierende SUIT-2 007-Zellen herangezogen. Die Membran wurde mit UKW-Antiserum 2 inkubiert. Als Molmassenstandard wurde eine vorgefärbte Proteinmischung, der ‚Multicolored Proteinmarker' verwendet.

7.5 Zellbiologische Untersuchungen in den SUIT-2 028-Transfektanten

7.5.1 Untersuchungen zur UKW-abhängigen Proliferation und Bestimmung der Generationszeiten

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses der *UKW*-Expression auf die Proliferation von Zellen wurden mit Hilfe von Wachstumskurven die Generationszeiten für die einzelnen UKW-Transfektanten, MOCK-Klone, SUIT-2 007- und SUIT-2 028-Zellen bestimmt.

In jeweils dreifachen Ansätzen wurden die Zellen in 96-Lochplatten ausgesät und nach 24, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden einem WST-Proliferationstest unterzogen. Die Absorption des umgesetzten Substrats wurde exponentiell gegen die Zeit aufgetragen und aus diesen Proliferationskurven schließlich die Anzahl der Teilungen in 96 Stunden und die daraus resultierende Generationszeit berechnet.

Abbildung 32 zeigt die Grafik der errechneten Generationszeiten. Übereinstimmend mit der Erfahrung aus der Kultivierung der Zellen zeigte die Zelllinie SUIT-2 007 eine Generationszeit von 36 Stunden und SUIT-2 028 von 41 Stunden. Etwa gleiche Generationszeiten wie für die Zelllinie SUIT-2 028 wurden für die drei MOCK-Transfektanten ermittelt (41 bis 44 Stunden). Zwar nur minimal, d.h. zu 7 %, 5 % und 2 %, aber dennoch schneller wuchsen die UKW-transfizierten SUIT-2 028-Zellen mit Generationszeiten von 38, 39 und 40 Stunden. Die Generationszeiten der Transfektanten verringerten sich somit um 1, 2 bzw. 3 Stunden, entsprachen jedoch nicht der geringeren Generationszeit von 36 Stunden der Zelllinie SUIT-2 007. Es war ein minimaler Unterschied der Klone 1, 2 und 3 zum Wildtyp oder den MOCK-Transfektanten festzustellen. Alle drei Klone wiesen im Northern-Blot geringere UKW-mRNS-Mengen auf als SUIT-2 007. Obwohl diese Klone eine um 1, 2, und 3 Stunden geringere Generationszeit als die Zelllinie SUIT-2 028 zeigten, war nur eine tendenzielle Aussage bezüglich der Proliferationsrate und der Transkriptmenge von *UKW* möglich. Eine Korrelation zwischen der *UKW*-Expression und einer erhöhten Wachstumsrate konnte nicht eindeutig gezeigt werden.

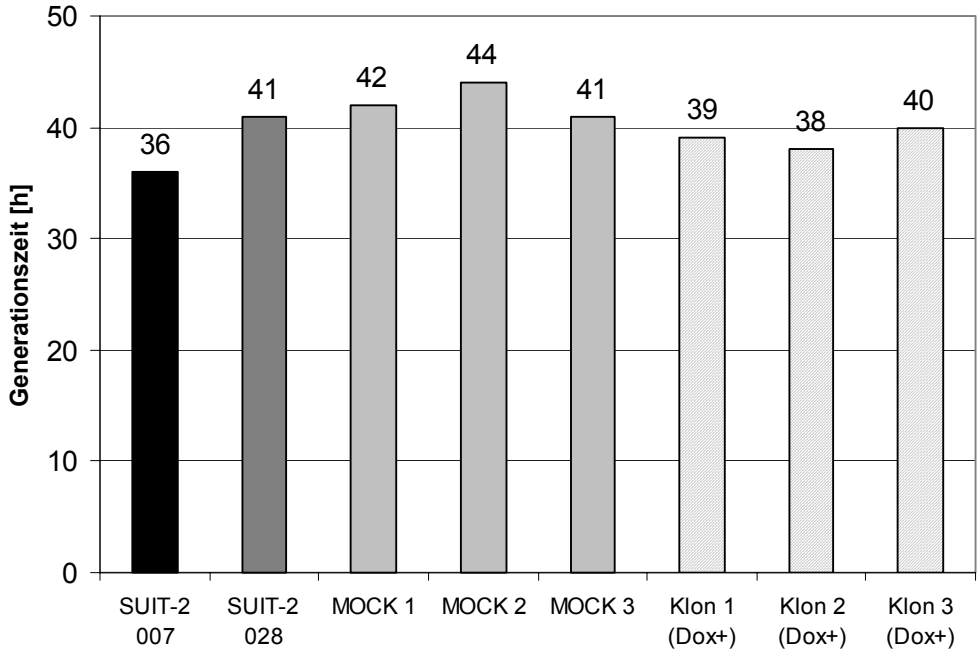


Abbildung 32: Vergleich der Generationszeiten von SUIT-2 007 und 028-Zelllinien und Transfektanten. Für die UKW-Transfektanten, MOCK-Klone, SUIT-2 007- und SUIT-2 028-Zellen wurden mittels WST-1-Test Wachstumskurven erstellt und aus diesen die Generationszeiten ermittelt. Zum Erstellen der Wachstumskurven wurden in einer 96-Lochplatte Dreifachbestimmungen durchgeführt. 1 x 10^5 Zellen pro Vertiefung wurden ausgesät und daraus 1:2 Verdünnungsschritte angelegt, bis zu einer Zellzahl von 195 Zellen pro Vertiefung. Nach 24, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden nach dem Aussäen der Zellen wird ein WST-1 Proliferationstest durchgeführt. SUIT-2 028-UKW-Transfektanten (Klon 1, 2 und 3) und die drei MOCK-Transfektanten wurden in Anwesenheit von Doxycyclin (Dox +) kultiviert.

7.5.2 Untersuchungen zur Motilität von SUIT-2 007-Zellen und SUIT-2 028/UKW-Transfektanten

Neben dem Proliferationsverhalten wurde auch das Migrationsverhalten von SUIT-2 028-Zellen bei einer Überexpression von UKW analysiert. Dazu wurden SUIT-2 028/UKW-Transfektanten und MOCK-Transfektanten in einer Transwell-Kammer untersucht, wobei die Expression von UKW in der Anwesenheit von Doxycyclin induziert und in der Abwesenheit von Doxycyclin reprimiert wurde. Wie in Abbildung 33 zu erkennen, wanderten etwa 47 % der SUIT-2 007-Zellen und 38 % der SUIT-2 028-Zellen innerhalb von 72 Stunden durch die Membran. Wurde die Expression von UKW in den Transfektanten durch Doxycyclin-Zugabe induziert, erhöhte sich die Motilität der Zellen nicht. Für die drei SUIT-2 028/UKW-Klone konnte eine Motilität von 35–38 % gezeigt werden. Bei Repression der *UKW*-Expression wiesen die Klone 1, 2 und 3 einen Prozentsatz von 33, 37 und 34 % Migration auf. Die Motilität der Kontrollklone, der

MOCK-Transfektanten, blieb ebenso durch die Zugabe von Doxycyclin unbeeinflusst. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass eine UKW-Überexpression nicht zu einer erhöhten Motilität von SUIT-2 028-Zellen führte. UKW scheint somit keinen Einfluss auf Mechanismen zu haben, die zu einer Migration von Zellen führen.

Die MOCK-Transfektanten ohne Doxycyclingabe wurden nicht grafisch dargestellt, denn diese Ergebnisse spiegelten keine Veränderung im Vergleich zur Doxycyclingabe wieder. Als Positivkontrolle wurde die Dickdarmkrebszelllinie CX-1, wie bereits in anderen Untersuchungen verwendet, mit untersucht. In dem vorliegenden Experiment zeigte diese ein Migrationspotenzial von 75 %.

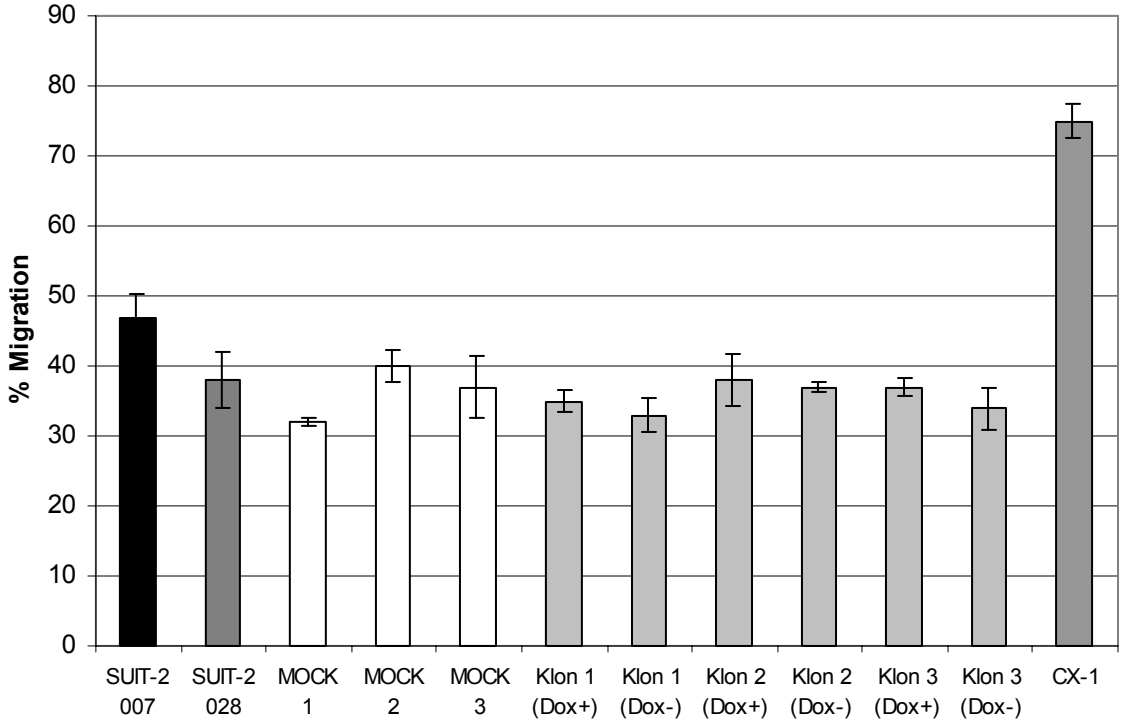


Abbildung 33: Analyse der Migration von SUIT-2 007-Zellen und SUIT-2 028/UKW-Transfektanten. SUIT-2 007, SUIT-2 028/UKW-Transfektanten, MOCK-Transfektanten und der Ausgangsklon SUIT-2 028 wurden in Transwells (5 % FKS) in der An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin (2 µg/ml) ausgesät. Nach 72 Stunden wurde die Anzahl an gewanderten Zellen (untere Kammer) und an nicht-gewanderten Zellen (obere Kammer) quantifiziert. Die Migration wurde angegeben als prozentualer Anteil der Anzahl an gewanderten Zellen an der Anzahl der insgesamt eingesetzten Zellen. Es ist das Ergebnis eines Experimentes gezeigt (3-fach-Ansätze), das für 2 weitere Ansätze repräsentativ ist. Die Dickdarmkrebszelllinie CX-1, für die bereits in anderen Untersuchungen die Fähigkeit zur Migration nachgewiesen wurde, diente als Positivkontrolle.

7.5.3 Untersuchungen zum anhaftungsunabhängigen Wachstum auf poly-HEMA

Ein *in vitro* Modell zur Klassifizierung von Anhaftungs-unabhängigem Wachstum stellt der poly-HEMA-Assay (poly(2-hydroxyethyl-methacrylate)) dar. Zellen werden auf poly-HEMA-beschichteten Mikrotiterplatten kultiviert um sie in Suspension zu halten und die Zellanhaftung zu verhindern. Für Zelllinien mit starkem Metastasierungsgrad wurde ein anderes Wachstumsverhalten auf poly-HEMA im Vergleich zu nicht-metastasierenden Zelllinien beschrieben (Fukazawa et al., 1995). D.h. nur metastasierende Zellen können auf poly-HEMA wachsen. Nicht-metastasierende Zellen nicht. Die Fähigkeit zu proliferieren ohne beständige, feste Anhaftung ist der beste *in vitro* Indikator der Tumorgenese. Es wurde beobachtet, dass metastasierende Zellen, von welchen bekannt ist dass sie adhärieren, auf poly-HEMA Sphäroide bilden (Mayer et al., 2001). Nicht-metastasierende Zellen, die infolge dessen nicht adhärieren, gehen in Apoptose.
Zunächst wurden die Zellen auf ‚konventionellen' 96-Loch-Platten als Monolayer unter identischen Bedingungen kultiviert. Die Zellzahl wurde in 24-Stunden-Abständen insgesamt 6-mal mittels WST-1-Reagenz bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 34 dargestellt. SUIT-2 007 und SUIT-2 028-Zellen, SUIT-2 028/UKW-Transfektanten und MOCK-Transfektanten zeigten alle ein vergleichbares Wachstum. Bei den je drei Transfektanten war mit und ohne Doxycyclin-Gabe kein Unterschied in der Proliferation zu verzeichnen (nur ein Transfektant dargestellt).

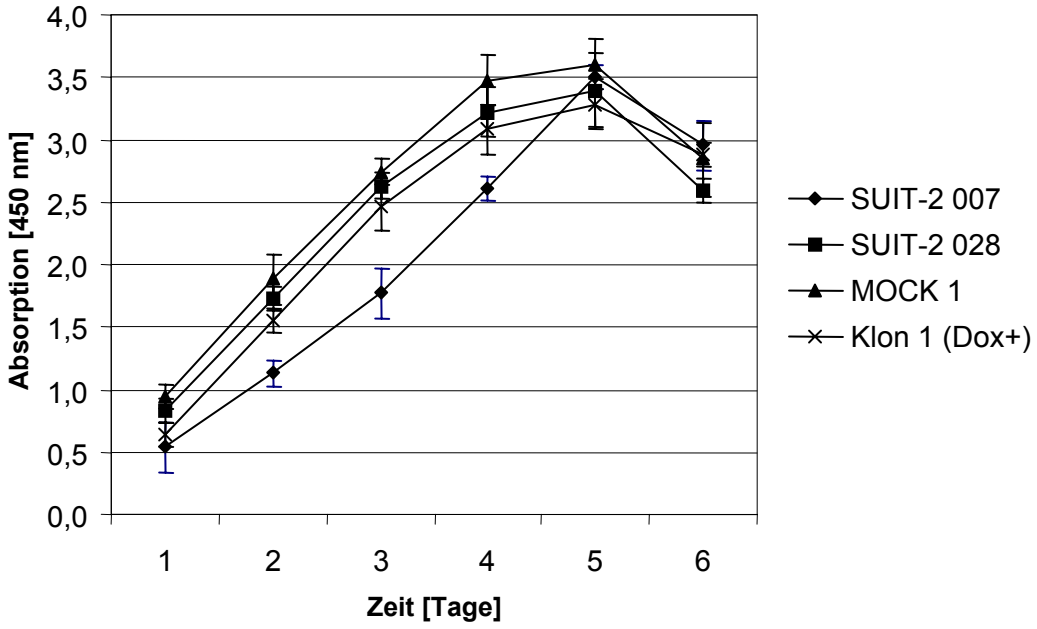


Abbildung 34: Analyse des Proliferationsverhaltens der SUIT-2 007- und SUIT-2 028-Zellen sowie der SUIT-2 028/UKW- und MOCK-Transfektanten als Monolayer. 1 x 10^4 Zellen/Loch wurden in eine 96-Loch-Platte mit bzw. ohne Zugabe von Doxycyclin (2 µg/ml) ausgesät. Nach jeweils 24 Stunden wurde über einen Zeitraum von 6 Tagen ein WST-1-Proliferationstest durchgeführt. Gezeigt ist das Wachstum des Ausgangsklons SUIT-2 028, der Zelllinie SUIT-2 007 und nach Doxycyclin-Induktion das Wachstum des SUIT-2 028/UKW-Transfektanten 1 und MOCK-Transfektanten 1. Es ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes gezeigt (3-fach-Ansätze), das in zwei weiteren Experimenten reproduziert werden konnte.

Im Vergleich zum Wachstum der vier Klone auf nicht-behandelten Mikrotiterplatten wurden die Zellen auf mit poly-HEMA beschichteten 96-Loch-Platten unter identischen Bedingungen kultiviert. Je drei UKW- und MOCK-transfizierte SUIT-2 028-Klone wurden in diesem Test mit den Zelllinien SUIT-2 007 und SUIT-2 028 verglichen. Die Transfektanten wurden sowohl mit als auch ohne Zugabe von Doxycyclin kultiviert. Alle Klone wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät, die zuvor bereits mit einer dünnen Schicht poly-HEMA versehen worden waren. Die Zellen wurden bei 37°C inkubiert und alle 24 h 8 Tage lang mit WST-1-Reagenz die Zellzahl vermessen.

Auf poly-HEMA beschichteten Mikrotiterplatten wuchsen alle untersuchten Klone langsamer als auf nicht-beschichteten Platten (Abbildungen 34 und 35). Zudem war zwischen dem Wachstum der Zellen SUIT-2 007, SUIT-2 028/UKW-Transfektant und den Zellen SUIT-2 028 und MOCK-Transfektant auf poly-HEMA ein Unterschied zu erkennen. Wie aus Grafik 40 hervorgeht wuchsen die SUIT-2 028-Zellen und die MOCK-Transfektanten nur halb so schnell wie die SUIT-2 007-Zellen und die UKW-

Transfektanten. Das anhaftungsunabhängige Wachstumsverhalten des Klon 1 hat sich somit im Vergleich zur Elternzelllinie SUIT-2 028 verändert und ähnelt eher dem Wachstum von SUIT-2 007.

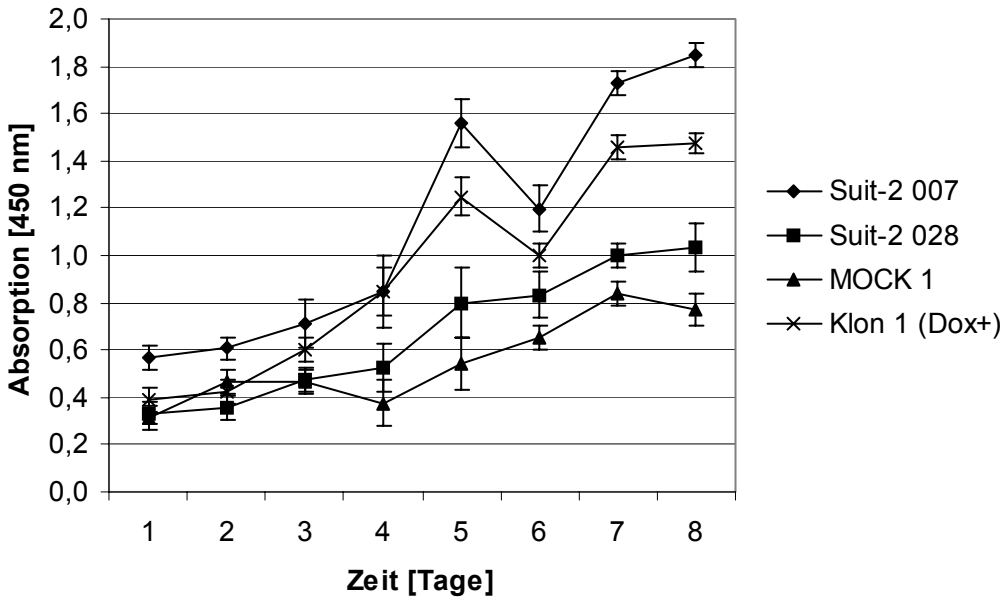


Abbildung 35: Analyse des Proliferationsverhaltens der SUIT-2 007- und SUIT-2 028-Zellen sowie der SUIT-2 028/UKW- und MOCK-Transfektanten auf poly-HEMA. 1,5 x 10^3 Zellen wurden in, mit poly-HEMA (10 mg/ml) beschichteten, Mikrotiterplatten bei 37°C inkubiert. Nach jeweils 24 Stunden wurde über einen Zeitraum von 8 Tagen ein WST-1-Proliferationstest durchgeführt. Gezeigt ist das Wachstum des Ausgangsklons SUIT-2 028, der Zelllinie SUIT-2 007 und nach Doxycyclin-Induktion das Wachstum des SUIT-2 028/UKW-Transfektanten 1 und MOCK-Transfektanten 1. Es ist das Ergebnis eines Experimentes gezeigt (3-fach-Ansätze), welches repräsentativ für 2 weitere Ansätze ist.

Nach 5 Tagen Kultivierung als Monolayer wurden die Zellen im Phasenkontrast-mikroskop fotografiert (Abbildung 36). Die SUIT-2 007-, SUIT-2 028-Zellen, SUIT-2 028/UKW-Transfektanten und MOCK-Transfektanten wiesen alle denselben Phänotyp auf und wuchsen vergleichbar schnell, wie es bereits in Abbildung 34 gezeigt wurde.

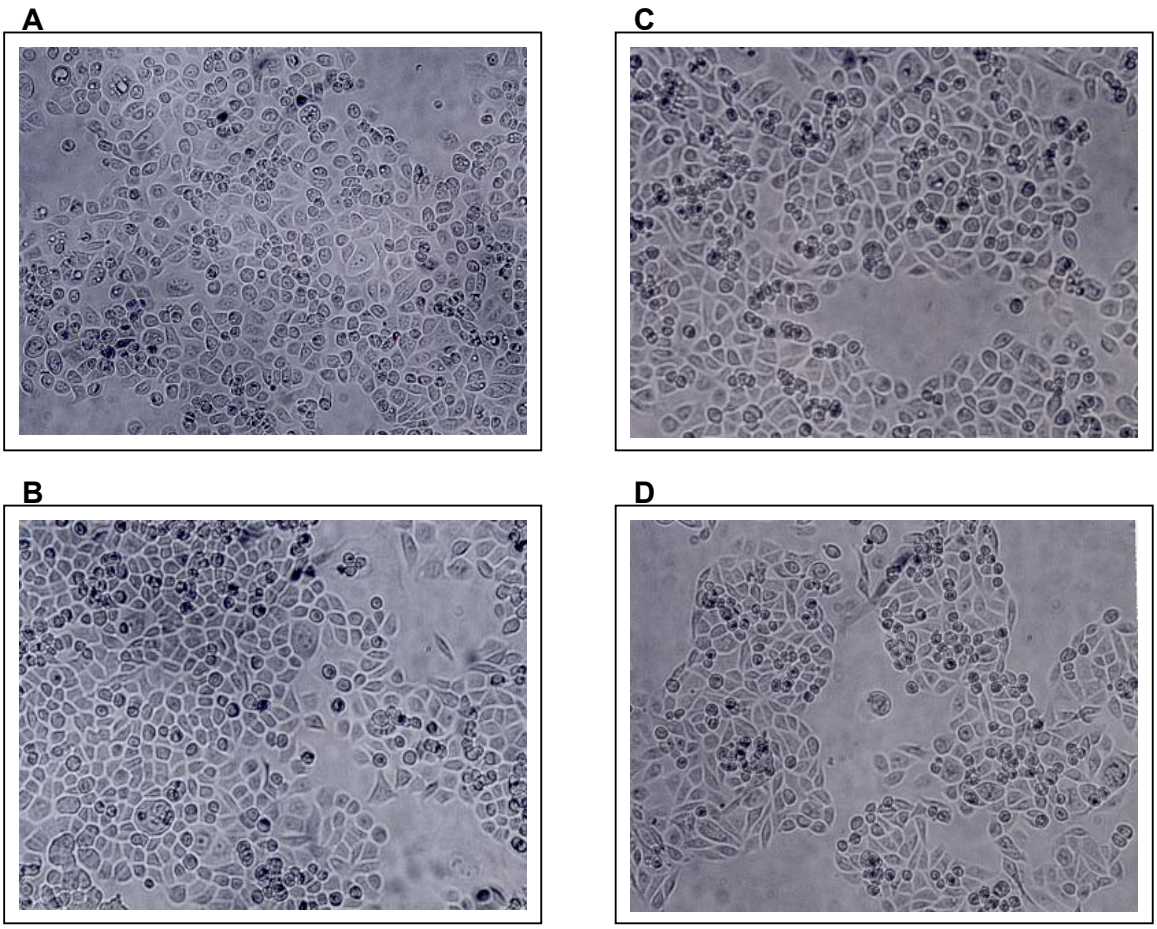


Abbildung 36: Morphologie der SUIT-2 007-Zellen, SUIT-2 028-Zellen, SUIT-2 028/UKW-Transfektanten und MOCK-Transfektanten kultiviert als Monolayer. Sowohl die SUIT-2 007- (A) und SUIT-2 028-Zelllinie (B) als auch die UKW-transfizierte (C) und die MOCK-transfizierte (D) SUIT-2 028-Zelllinie wurden als Monolayer auf 96-Loch-Mikrotiterplatten kultiviert und nach 5 Tagen Wachstum im Phasenkontrastmikroskop (10-fache Vergrößerung) fotografiert. Alle Transfektanten zeigten denselben Phänotyp wie untransfizierte SUIT-2 028-Zellen, ebenso SUIT-2 007-Zellen, und waren vergleichbar schnell gewachsen.

Die metastasierende Pankreastumorzelllinie SUIT-2 007 und die UKW-transfizierten SUIT-2 028-Zellen zeigten nach 5 Tagen die Bildung von lose geformten Sphäroiden (Abbildungen 37A und 37C). Die nicht-metastasierende SUIT-2 028-Zelllinie und die MOCK-transfizierten SUIT-2 028-Zellen wiesen hingegen eine dicht gepackte Sphäroidbildung auf (Abbildungen 37B und 37D). Letztgenannte unterschieden sich zudem im Vergleich zu SUIT-2 007 und den UKW-Transfektanten in der Größe der Zellkolonien. Während SUIT-2 007 und SUIT-2 028/UKW-Transfektanten zu großen Sphäroiden zusammenwuchsen, bildeten SUIT-2 028 und MOCK-Transfektanten wesentlich weniger und kleinere Sphäroide. Auf den Abbildungen 46 A-D ist dies zu

sehen. Die drei UKW-transfizierten Klone und die drei MOCK-Transfektanten wiesen keine unterschiedlichen morphologischen Phänomene auf. Aus diesem Grund sind nur Klon 1 und MOCK 1 exemplarisch gezeigt.

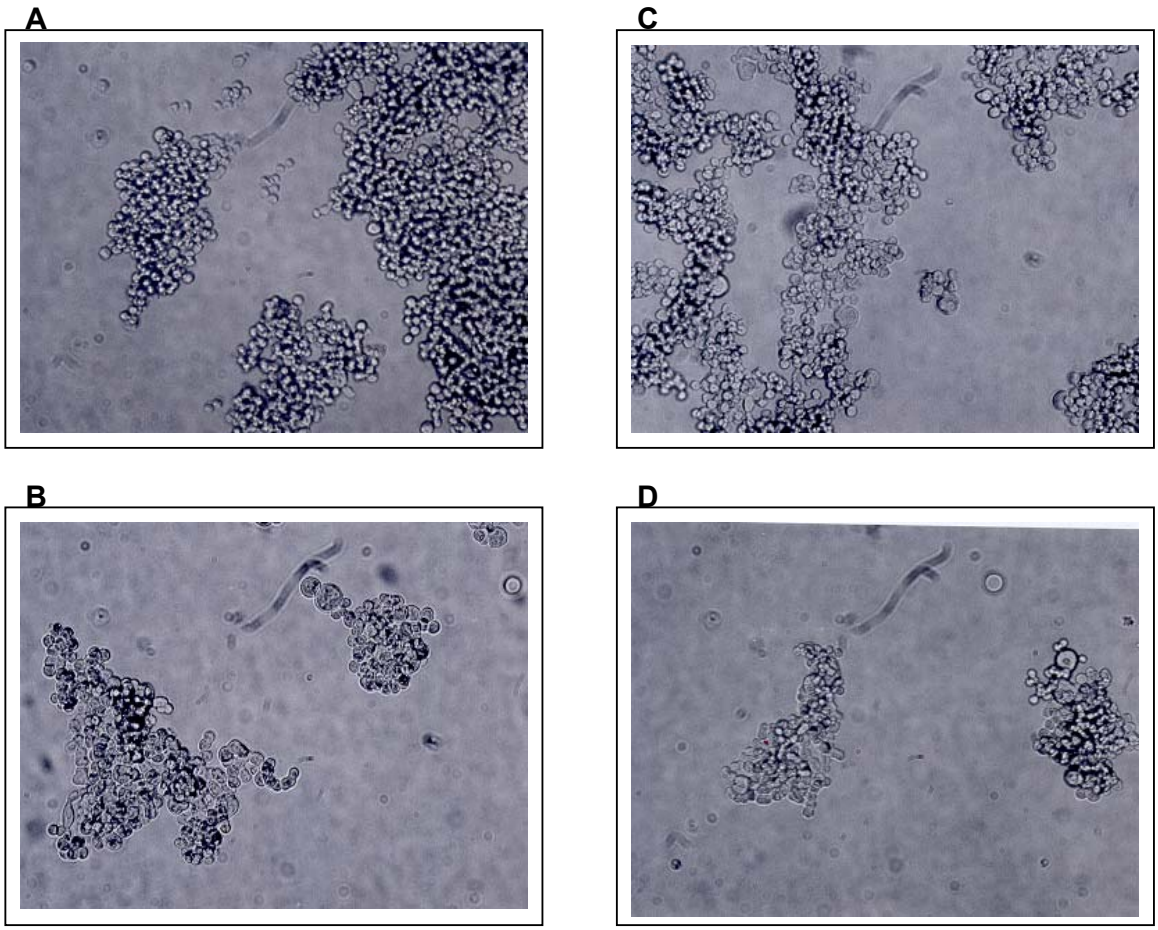


Abbildung 37: Morphologie der auf poly-HEMA kultivierten SUIT-2 007-Zellen, SUIT-2 028-Zellen, SUIT-2 028/UKW-Transfektanten und MOCK-Transfektanten. Sowohl die SUIT-2 007- (A) und SUIT-2 028-Zellinie (B) als auch die UKW-transfizierte (C) und die MOCK-transfizierte (D) SUIT-2 028-Zellinie wurden auf poly-HEMA-beschichteten 96-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät und nach 5 Tagen Inkubation fotografiert. Die metastasierende Zelllinie SUIT-2 007 zeigte ebenso wie die SUIT-2 028/UKW-Transfektanten lose geformte Sphäroide, während die nicht-metastasierende Parentalzelllinie und die MOCK-transfizierten SUIT-2 028-Zellen eher eine dicht gepackte Sphäroidbildung aufwiesen und kleinere Zellkolonien bildeten. 10-fache Vergrößerung.

7.5.4 *In vitro* Invasionstest

Bei diesem Versuch wurden die SUIT-2 028-Klone mit *UKW*-Expression auf ihre Fähigkeit, extrazelluläre Matrix-Bestandteile aufzulösen und durch eine Membran hindurch zu wandern, untersucht. Hierfür wurde der sogenannte Transwell-Test angewendet.

Die Expression von *UKW* wurde in der Anwesenheit von Doxycyclin induziert und in der Abwesenheit von Doxycyclin reprimiert.

Die Abbildung 38 stellt die Ergebnisse des Invasionstests mit den UKW- und MOCK-transfizierten SUIT-2 028-Klonen, der Ausgangszelllinie SUIT-2 028 und der Zelllinie SUIT-2 007 dar. Wie in der Grafik zu erkennen wanderten 13 % der SUIT-2 007-Zellen innerhalb von 72 Stunden durch den mit Matrigel beschichteten Filter. In geringerem Maße wanderten die SUIT-2 028-Zellen (8 %) durch die Membran. Für die MOCK-Klone konnte eine zur Zelllinie SUIT-2 028 vergleichbare Invasion durch die Matrigelmatrix nachgewiesen werden. Die MOCK-Klone 1, 2 und 3 konnten in 72 Stunden zu 9, 10 und 7 % die Matrigel-Beschichtung durchdringen. Wurde die Expression von *UKW* in den Transfektanten durch Doxycyclin-Zugabe induziert, veränderte sich die Motilität der Zellen nicht. Der Anteil der gewanderten Zellen lag ebenfalls zwischen 7 und 10 %. Für alle drei getesteten SUIT-2 028/UKW-Klone wurde keine signifikante Änderung der Wanderungsfähigkeit im Vergleich zur Ausgangszelllinie festgestellt. Zwischen den MOCK- und den UKW-Klonen war somit kein Unterschied zu erkennen.

Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass eine *UKW*-Überexpression in SUIT-2 028-Zellen zu keiner Veränderung in der *in vitro* Invasivität der SUIT-2 028-Zellen führte.

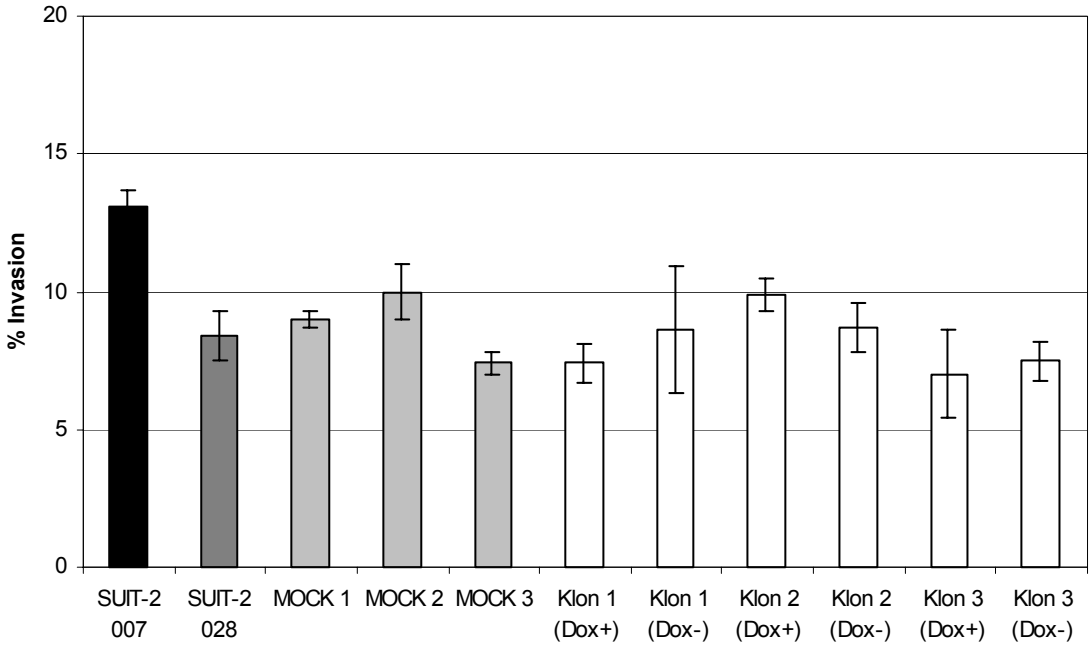


Abbildung 38: *In vitro* Invasionsassay zur Analyse der Invasionsfähigkeit von SUIT-2 028/UKW-Transfektanten. 1 x 10^5 Zellen der SUIT-2 028/UKW- und MOCK-Transfektanten, des Ausgangsklons SUIT-2 028 und der Zelllinie SUIT-2 007 wurden in mit Matrigel-beschichteten Transwells (5 % FKS) ausgesät. Nach 72 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Anzahl an durch die Matrigelschicht gewanderten Zellen (untere Kammer) und an nicht-invadierten Zellen (obere Kammer) mittels MTT-Test quantifiziert. Die Invasion ist angegeben als prozentualer Anteil der Anzahl an gewanderten an der Anzahl der insgesamt eingesetzten Zellen. Es ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes gezeigt (3-fach-Ansätze), welches in einem weiteren Experiment reproduziert werden konnte.

7.5.5 Bestimmung der Adhäsion an Substrate der extrazellulären Matrix

Die postulierte Struktur und Membranständigkeit von UKW führte zu der Hypothese, dass UKW die Anhaftung von Zellen beeinflussen könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die etablierten SUIT-2 028/UKW-Transfektanten einem Adhäsionstest unterzogen. 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden mit den Substraten Kollagen I, Kollagen IV, Laminin, Fibronektin und Vitronektin beschichtet. Die Zellen wurden darauf ausgesät und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die nicht adhärierten Zellen wurden dann abgewaschen und die Zahl der angehafteten Zellen (Dreifachbestimmung) mittels WST-1-Test bestimmt. Eine zweite Platte, in die parallel dieselben Zellen eingesät worden waren, diente dabei zur Bestimmung der Ausgangszellzahl im WST-1-Test.

In Abbildung 39 sind die Ergebnisse der Experimente mit den Zelllinien SUIT-2 007, SUIT-2 028, UKW-transfizierten SUIT-2 028-Klonen und den MOCK-Transfektanten

grafisch dargestellt. Alle Klone hafteten am besten an Laminin, wobei die Zelllinie SUIT-2 007 mit 68 % die beste Adhäsion an Laminin zeigte. Die SUIT-2 028/UKW-Transfektanten zeigten bei Anwesenheit von 2 µg/ml Doxycyclin eine auffällig veränderte Adhäsionsspezifität für Laminin. Die Adhäsionseffizienz der UKW-Klone (56 %, 59 % und 53 %) war eher vergleichbar mit der der SUIT-2 007-Zellen (68 %) als mit SUIT-2 028-Zellen (43 %). Ihre Adhärenz nahm um 31 %, 39 % und 24 % zu.

Die MOCK-Transfektanten 1, 2, und 3 zeigten im Vergleich zu den untransfizierten SUIT-2 028-Zellen, unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin, alle etwa das gleiche Adhäsionsverhalten. Auch für die MOCK-Klone konnte die beste Adhäsion an Laminin und an Fibronektin und eine schlechte Adhäsion an Vitronektin nachgewiesen werden.

SUIT-2 007-Zellen dagegen konnten sich außerdem noch gut an Fibronektin (65 %) und an Kollagen IV anhaften (44 %). An Kollagen I zeigten sie eine 28%ige Adhäsions-effizienz. Nur 18 % der ausgesäten SUIT-2 007-Zellen adhärierten nach einer Stunde noch an Vitronektin.

Ebenso wie für die SUIT-2 007-Zellen konnte für die Klone 1, 2 und 3 eine stärkere Adhäsion an Fibronektin von 50 %, 54 % und 43 % im Vergleich zur Ausgangszelllinie SUIT-2 028 von 37 % nachgewiesen werden. Dies entsprach einem Anstieg in der Adhärenz von 32 %, 46 % und 23 %. An die Substrate Kollagen I, Kollagen IV und Vitronektin konnte keine Veränderung der Adhäsion induziert werden. Die Adhäsionsspezifität der Transfektanten an die Substrate der extrazellulären Matrix wies ohne Zugabe von Doxycyclin keine gravierenden Unterschiede zu den SUIT-2 028-Zellen auf (Daten nicht gezeigt).

Es konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass durch eine Transfektion von *UKW* in SUIT-2 028-Zellen eine leichte Veränderung der Adhäsion an die Substrate Laminin und Fibronektin induziert werden konnte. Die Zelllinie SUIT-2 007 unterscheidet sich offensichtlich in der Adhäsionsfähigkeit und damit in der Expression von Rezeptoren von SUIT-2 028.

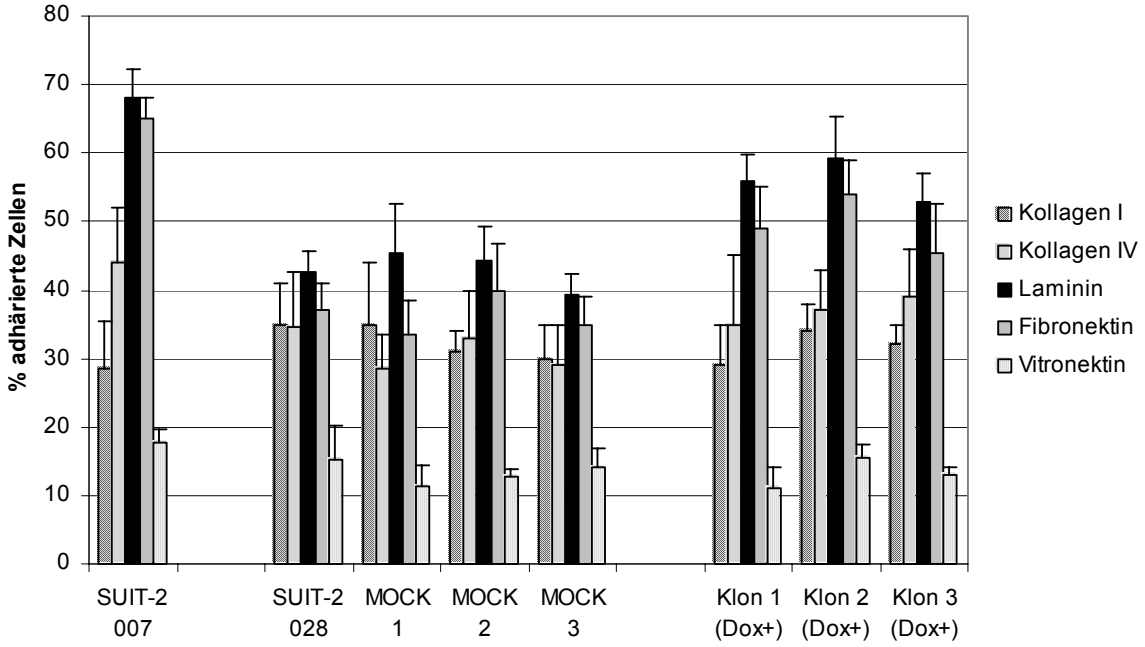


Abbildung 39: Adhäsionstest von SUIT-2 007 und SUIT-2 028-Zelllinien und SUIT-2 028/UKW-Transfektanten an verschiedene Substrate der extrazellulären Matrix. 2,5 x 10^4 mit Calcein markierte Zellen wurden auf beschichtete Mikrotiterplatten in der An- bzw. Abwesenheit von 2 µg/ml Doxycyclin ausgesät und bei 37°C für 1 h inkubiert (Dreifachbestimmung). Die Menge der adhärierten Zellen wurde dann mittels Fluoreszenzmessung (494 nm) bestimmt. Den Balken für die entsprechenden Substrate der extrazellulären Matrix, wurden in der Grafik verschiedene Muster zugeordnet: Kollagen I, Kollagen IV, Laminin, Fibronektin und Vitronektin. Dargestellt wurde der prozentuale Anteil anhaftender SUIT-2 007-Zellen, SUIT-2 028-Zellen und deren MOCK-Transfektanten (MOCK 1, 2 und 3) sowie SUIT-2 028/UKW-Transfektanten (Klon 1, 2 und 3) bei Anwesenheit von Doxycyclin (Dox+).

8. Immunhistochemische Untersuchungen zu UKW

Wie in Kapitel 5.4 mittels quantitativer Echtzeit-PCR gezeigt, wurde *UKW* in normalen Pankreasgeweben nicht oder nur sehr schwach exprimiert. In Tumorgeweben des Pankreas hingegen war die UKW-mRNS sehr stark vorhanden. In den nachfolgenden Abschnitten galt es deshalb zu untersuchen, ob sich in Pankreastumor- und Normalgewebe ebenfalls dieses Expressionsmuster zeigt. Zusätzlich sollte die in dieser Arbeit nachgewiesene Lokalisation von UKW in der Plasmamembran auf Gewebeebene bestätigt werden.

8.1 Austesten des UKW-Antiserums für die Immunhistochemie

Um auszutesten, ob sich der UKW-Antikörper für immunhistochemische Versuche eignet, wurden zunächst aus den beiden Pankreastumorzelllinien SUIT-2 007 und SUIT-2 028 sogenannte artifizielle Gewebeschnitte hergestellt und mit dem polyklonalen UKW-Antikörper 2 angefärbt.
Wie in Kapitel 7.3 gezeigt, ist das UKW-Protein in der Plasmamembran lokalisiert. Eine entsprechende immunhistochemische Färbung in der Plasmamembran der UKW-exprimierenden SUIT-2 007-Zelllinie wurde deshalb erwartet. In der Abbildung 40A ist deutlich eine spezifische, bräunliche plasmamembran-ständige Färbung zu erkennen. UKW wird also an Zell-Zell-Kontaktstellen exprimiert. Zusätzlich war eine schwache zytoplasmatische Färbung zu sehen. In der *UKW* nicht-exprimierenden Pankreastumor-zelllinie hingegen war keine Reaktion des UKW-Antikörpers mit UKW-spezifischen Epitopen nachzuweisen (Abbildung 40B). Dies wurde, unter Voraussetzung dass sich der UKW-Antikörper in der Immunhistochemie einsetzen lässt, auch erwartet.

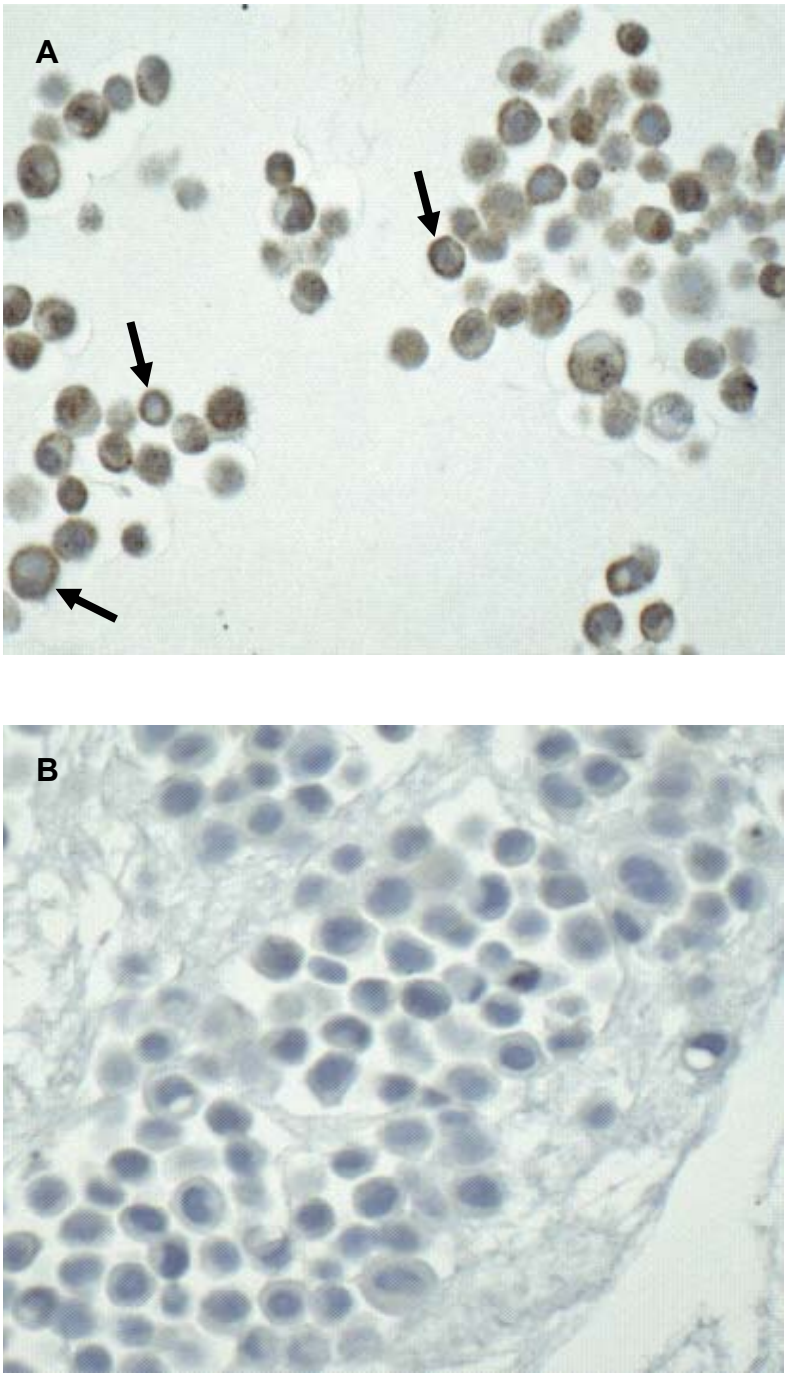


Abbildung 40: Vergleichende Darstellung der artifiziellen Präparate aus SUIT-2 007- und SUIT-2 028-Zellen nach immunhistochemischem Nachweis von UKW (200-fache Vergrößerung). Aus Formalin-fixierten artifiziellen SUIT-2 007- und SUIT-2 028-Geweben wurden 4 µm Dünnschnitte angefertigt. UKW wurde in den SUIT-2 007-Zellen (A) mit dem polyklonalen UKW-Antikörper detektiert. Die Färbung (braun) erfolgte sowohl in der Plasmamembran als auch diffus im Zytoplasma (Pfeile). Die SUIT-2 028-Zellen (B) wurden nicht angefärbt (blau).

8.2 Immunhistochemische Analyse der UKW-Expression in humanen, normalen Geweben und Tumorgeweben

Um zu zeigen, dass das UKW-Protein auch in Geweben exprimiert wird, wurden verschiedene Gewebeschnitte, sowohl normalen Ursprungs als auch Tumorschnitte, immunhistochemisch untersucht. Paraffinschnitte (Biocat, Heidelberg) folgender Gewebe wurden immunhistochemisch behandelt: Pankreas, Brust, Leber, Harnblase, Eierstock, Prostata, Magen, Speiseröhre, Lunge, Rektum, Schilddrüse, Niere, Lymphdrüse, Gehirn und Haut.

Die Vergleichsfärbung mit normalem Pankreasgewebe diente dem Nachweis, ob der UKW-Antikörper spezifisch oder unspezifisch bindet. Es zeigte sich, dass in keinem der 9 untersuchten Paraffinschnitte von normalem Pankreasgewebe eine Färbung nachzuweisen war (Abbildung 41A). Der polyklonale UKW-Antikörper färbte insgesamt eher schwach. Deshalb traten keine unspezifischen Bindungen auf. Eine spezifische Bindung war allerdings nur in wenigen Pankreastumoren festzustellen. In Pankreastumoren bindet der Antikörper prädominant an papilläre Strukturen (Abbildung 41B). Es war zu beobachten, dass der UKW-spezifische Antikörper sehr dezent und nur lokal färbt. Dies kann bedeuten, dass der UKW-Antikörper nicht gut funktioniert oder sehr wenig Protein vorliegt.

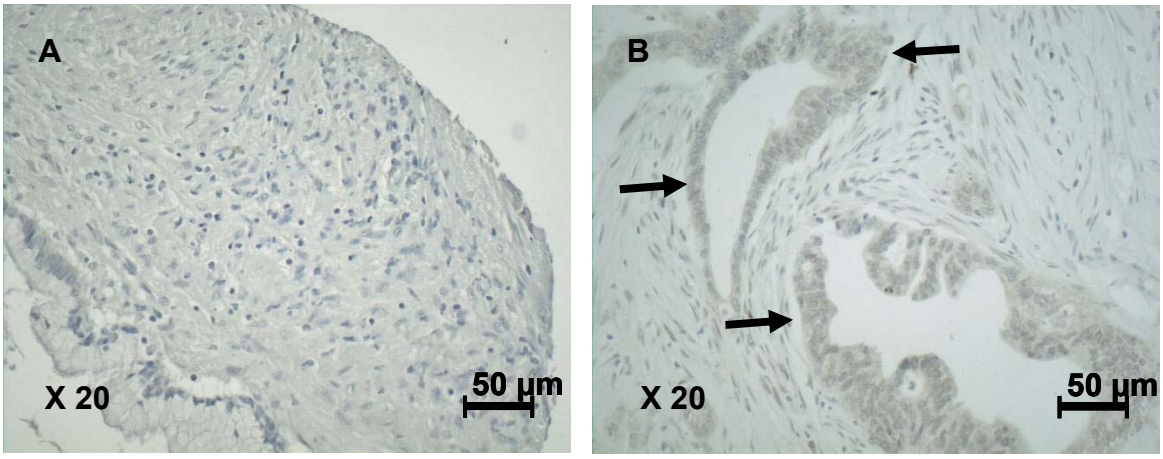


Abbildung 41: Immunhistochemischer Nachweis der UKW-Expression in normalem Pankreas- und Pankreastumorgewebe (200-fache Vergrößerung).

Die Antikörperfärbung erfolgte bei 4°C über Nacht. Für den Antikörpernachweis wurden die Schnitte so lange mit DAB inkubiert, bis eine optimale Färbung erkennbar war.

A: Das Pankreasnormalgewebe (MBN1, Biocat Heidelberg) zeigt nach immunhistochemischer Behandlung mit dem polyklonalen UKW-Antikörper keine Färbung. UKW wird in diesem Gewebe nicht exprimiert. Die Zellkerne wurden mit Hämalaun (blau) gegengefärbt.

B: Der UKW-spezifische polyklonale Antikörper bindet in Pankreastumorgeweben prädominant an papilläre Strukturen (MB1, Biocat Heidelberg). Der Schnitt wurde anschließend mit Hämalaun nach Mayer für 10 sec gegengefärbt.

Die einzigen Gewebe die eine spezifische Färbung in der Plasmamembran, wie sie zu erwarten war, zeigten, waren Tumorgewebe des Dickdarms und Mastdarms. In anderen Geweben konnten keine spezifischen Signale detektiert werden. Die Mehrzahl der Tumore blieb komplett ungefärbt.

Die Abbildung 42C zeigt exemplarisch das Bild einer UKW-gefärbten Metastase in der Leber. Das normale Gewebe der Leber wurde nicht angefärbt, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass dieser Antikörper keine unspezifische Kreuzreaktivität aufwies. In dem Lebergewebeschnitt ist die invasive Front der Metastase aus dem Mastdarm deutlich zu erkennen. In der Abbildung 42D ist die spezifische Färbung und die Lokalisation von UKW in der Plasmamembran gut zu sehen. In den Abbildungen 42A und 42B sind normale Lebergewebeschnitte ohne UKW-Expression dargestellt.

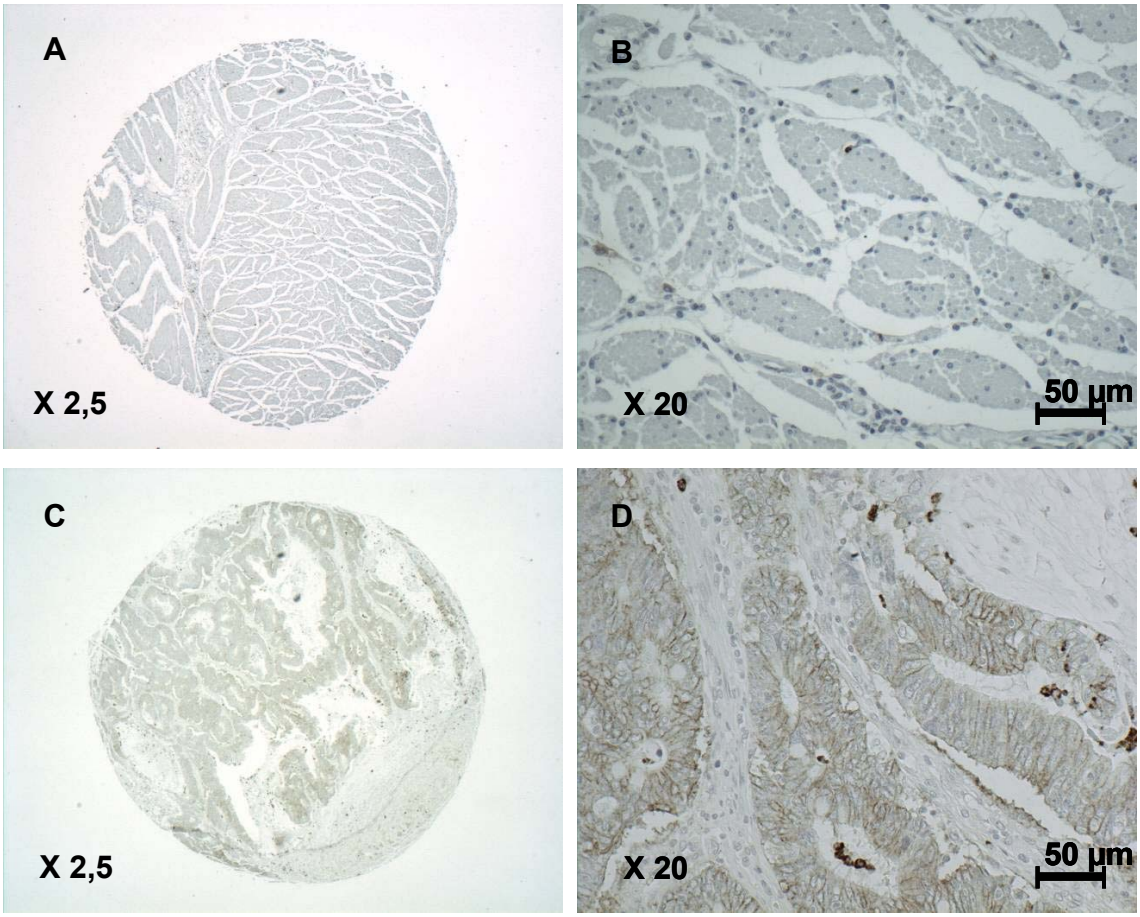


Abbildung 42: Paraffinschnitte von Normal- und Tumorgeweben der Leber nach immunhistochemischer Färbung mit polyklonalem UKW-Antikörper. Die immunhistochemische Untersuchung wurde mit Gewebeschnitten (BC3) von Biocat, Heidelberg durchgeführt (siehe Material und Methoden). Die normalen Gewebe zeigen keine UKW-Expression. In den Tumorgeweben ist eine deutliche Färbung der Plasmamembran zu erkennen. Die Reaktion in den Tumoren ist sehr intensiv ausgeprägt.

A: Normales Lebergewebe, 25-fache Vergrößerung.

B: Normales Lebergewebe, 200-fache Vergrößerung.

C: Lebergewebe mit infiltrierter Metastase aus dem Mastdarm, 25-fache Vergrößerung.

D: Lebergewebe mit infiltrierter Metastase aus dem Mastdarm, 200-fache Vergrößerung.

In normalem Dickdarmgewebe war keine Expression des UKW-Proteins nachzuweisen (Abbildungen 43A und 43B). Das Tumorgewebe des Dickdarms zeigte eine intensive, plasmamembranständige Färbung in distinkten Bereichen (Abbildungen 43C und 43D). Bei diesen Regionen handelt es sich um Epithelzellen der Schleimhaut.

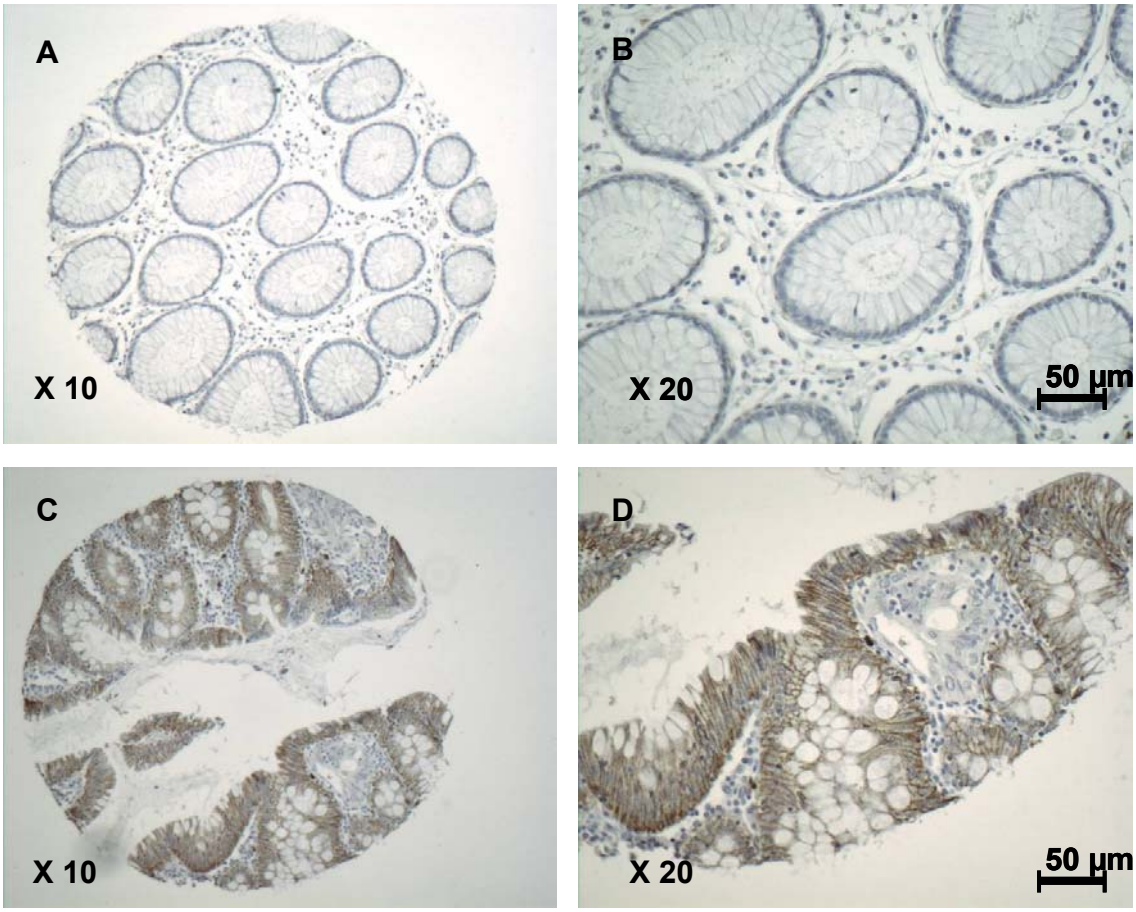


Abbildung 43: Immunhistochemischer Nachweis von UKW mit polyklonalem UKW-Antikörper in Normal- und Tumorgewebe des Dickdarms. Die Paraffinschnitte wurden wie in Kapitel 2.4.3 (Material und Methoden) beschrieben behandelt. Diese Paraffinschnitte stammen ebenso vom Gewebearray BC3 (Biocat, Heidelberg). Der UKW-spezifische polyklonale Antikörper bindet im Dickdarmtumor an die Epithelzellen der Schleimhaut. Die normalen Gewebe zeigen keine UKW-Expression.

A: Normales Dickdarmgewebe, 100-fache Vergörßerung.

B: Normales Dickdarmgewebe, 200-fache Vergörßerung.

C: Dickdarmtumor, 100-fache Vergörßerung.

D: Dickdarmtumor, 200-fache Vergörßerung.

Diskussion

Das Pankreaskarzinom besitzt mit einer mittleren Überlebenszeit der betreffenden Patienten von nur 5 Monaten die schlechteste Prognose aller gastrointestinalen Tumore. Es weist einen Häufigkeitsgipfel im 5. und 6. Lebensjahrzehnt auf und ist die fünfthäufigste krebsbedingte Todesursache. Pankreaskarzinome zeigen eine ausgeprägte Tendenz zur Metastasierung ohne Korrelation zur Größe des Primärtumors. Die Metastasierungswege sind in erster Linie lymphogen zu finden, zumeist in die peripankreatischen Lymphknoten sowie im Bereich der Leberpforte. Eine hämatogene Metastasierung betrifft vor allem die Leber und die Lunge (Warshaw et al., 1992).
Die Aktivierung des K-*RAS*-Onkogens und der Funktionsverlust der Tumorsuppressorgene *P16, P53, DPC4* sowie *BRCA2* sind charakteristische genetische Veränderungen von Pankreastumorzellen. Die Fortschritte in der Behandlung pankreatischer Läsionen sind jedoch sehr gering. Neue Therapieoptionen auf der Basis molekulargenetischer und tumorbiologischer Erkenntnisse sind daher dringend notwendig (Sirivatanauksorn et al., 1998). Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, in einem Pankreastumor-Modellsystem differentiell exprimierte, unbekannte Gene mit Hilfe der Microarray-Technologie zu identifizieren, zu isolieren und die funktionelle Relevanz dieser Proteine in Bezug auf Proliferation, Invasion und Metastasierung aufzuklären.

1. Das Pankreastumor-Modellsystem SUIT-2 007 und SUIT-2 028 eignet sich zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Das Pankreastumor-Modellsystem SUIT-2 007 und SUIT-2 028 wurde durch Erstellung eines Transkriptionsprofils bekannter Gene, mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie unter Verwendung des HG-U-95-A-Arrays, auf dessen Eignung zur Identifizierung von metastasierungs- und invasionsassoziierten Genen getestet. Die beiden verwendeten Zelllinien unterscheiden sich in ihrem Metastasierungsgrad. SUIT-2 007 weist ein starkes Metastasierungspotenzial auf. SUIT-2 028 hingegen metastasiert nicht. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 12.000 Gene bekannter Funktion untersucht. Von diesen waren 188 Gene in der metastasierenden Pankreastumorzelllinie überexprimiert und 119 Gene herunterreguliert (Abbildung 3). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden diese Gene in 11 funktionelle Klassen eingruppiert. In der Kategorie Proteasen/Inhibitoren war die sehr starke Überexpression der Matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1) in der Zelllinie 007 aufgefallen (Tabelle 1, Abbildung 4). In experimentellen Modellen wurde gezeigt, dass MMPs Bestandteile der extrazellulären

Matrix abbauen (Nekarda et al., 1994). Dies kann *in vivo* mit einem verstärkten invasiven Wachstum einhergehen (Templeton et al., 1990). MMP-1 wurde von Sunami et al. als Marker für die hämatogene Metastasierung von Kolonkrebs identifiziert (Sunami et al., 2000). In vielen Experimenten wurde beobachtet, dass MMP-Inhibitoren das Wachstum von Primärtumoren *in vivo* hemmen. In diesem Zusammenhang ist die Herunterregulierung des Inhibitor von Metalloproteinasen TIMP-3 in der Pankreastumorzelllinie SUIT-2 007 zu erwähnen (Abbildung 5). In der Kategorie Koagulation/Angiogenese war Thrombomodulin in der metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 stark hochreguliert. Oikawa et al. beschrieben Thrombomodulin als in Pankreastumorzellen überexprimiert (Oikawa et al., 1994). P-Selektin wurde in die Kategorie Adhäsion als überexprimiertes Gen eingruppiert. P-Selektin wurde von Geng et al. als Mediator der Adhäsion beschrieben (Geng et al., 1990). Iwamura et al. wiesen die Überexpression von P-Selektin ebenso in der SUIT-2 007-Zelllinie nach (Iwamura et al., 1997). Eine sehr starke Überexpression der Filamentmarker für mesenchymales Gewebe wurde für Vimentin und Mesothelin in der Zelllinie SUIT-2 007 beobachtet (Abbildung 4). Dies deutet auf profunde Unterschiede in den Differenzierungsgraden zwischen den beiden verglichenen Zelllinien hin. Der Verlust der epithelialen Morphologie und der Erwerb mesenchymaler Merkmale korrelieren mit der Malignizität von Tumoren (Birchmeier et al., 1996). In der Kategorie Zellzyklus/Apoptose/ Differenzierung wurde PDGF-A in der metastasierenden Zelllinie als überexprimiert nachgewiesen. Dieses Phänomen wurde bereits von Ebert et al. beschrieben (Ebert et al., 1995). Unter den in der Zelllinie SUIT-2 007 hochregulierten Rezeptoren ist Mesothelin hervorzuheben, welches laut Chang et al. eine Rolle bei der Adhäsion von Tumoren spielt (Chang et al., 1996). Die mRNS für Gen N33 ist in der metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 herunterreguliert. N33 wurde von Bookstein et al. eine Rolle als Tumorsuppressorgen in Kolon- und Prostatakarzinomen zugeschrieben (Bookstein et al., 1997).

Die erhöhte Expression von fünf Proteasen und die Herunterregulation eines Protease-Inhibitors in dem untersuchten Pankreastumor-Modellsystem ist nicht verwunderlich, seitdem die Rolle der Proteasen im Zusammenhang mit der Metastasierung beschrieben wurde.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass sich dieses Pankreastumor-Modellsystem zur Identifizierung neuer metastasierungs- und invasionsassoziierter Gene eignet.

2. Identifizierung von deregulierten Genen in Pankreaskarzinomzelllinien mittels Microarray-Technologie

Zur Identifizierung bisher unbekannter, pankreastumorspezifischer, deregulierter Gene wurden die Genexpressionsprofile der metastasierenden, humanen Pankreastumorzelllinie SUIT-2 007 und der nicht-metastasierenden SUIT-2 028-Zelllinie untersucht (Iwamura et al., 1987). Die Genexpressionsmuster der beiden Zelllinien wurden mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie analysiert und verglichen. Evtimova et al. und Euer et al. konnten zeigen, dass die Affymetrix GeneChip® Array Technologie ein geeignetes Werkzeug zur Ermittlung differentiell exprimierter Gene ist (Evtimova et al., 2001; Euer et al., 2002). Manche wichtigen Krebsgene konnten mittels dieser Methode bereits identifiziert werden (de Wit et al., 2002). Für das Screening auf proliferations-, invasions- und metastasierungs-assoziierte Gene wurde das HG-U95-Array-Set eingesetzt, das insgesamt 50.000 ESTs enthält. Das erhaltene Expressionsprofil lieferte eine Liste mit 89 hochregulierten und 73 herunterregulierten ESTs, die als potenzielle Kandidatengene in Frage kamen. Zur Bestätigung der differentiellen Expression von 14 ESTs wurden Northern-Blot Analysen durchgeführt (Abbildungen 6 und 7). Mittels Northern-Blot konnte zudem die Größe der mRNS der bisher unbekannten Gene bestimmt werden. Die gewebespezifische Verteilung und die Stärke der Deregulation relevanter ESTs in den beiden Pankreastumorzelllinien führte zur Selektion zweier 500-600 bp großer ESTs. Bei der Recherche in öffentlichen Datenbanken konnten keine Homologien der beiden EST-Sequenzen zu kodierenden Sequenzen ermittelt werden. Da es sich hierbei um neue, unbekannte Gene handelte, musste zunächst die vollständige cDNS isoliert werden. Ein besonderes Augenmerk wurde auf das EST gerichtet, welches in der metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 99-fach überexprimiert war. Dieses Gen wird als 5,1 kb großes Transkript exprimiert. Es stellte sich heraus, dass es sich hierbei um ein Adhäsionsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie handelt, welches als *UKW* bezeichnet wurde. Ein weiterer Fokus wurde auf das in der metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 11,8-fach herunterregulierte Transkript gelegt, dessen vollständige Länge mittels Northern-Blot auf 2,3 kb geschätzt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Gen, das für eine dual-spezifische Kinase kodiert, als *LKW* bezeichnet. Zur Generierung der vollständigen cDNS von Gen *UKW* wurde deshalb eine humane cDNS-Bibliothek gescreent. Die komplette Sequenz von *LKW* wurde mittels 5´-RACE-PCR isoliert.

3. Das metastasierungs-assoziierte Protein LKW gehört zur Familie der dual-spezifischen Kinasen

Das im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Gen *LKW* zeigte sowohl im Microarray-Ergebnis als auch im Northern-Blot eine differentielle Expression im Vergleich der beiden Pankreastumorzelllinien SUIT-2 007 und SUIT-2 028. *LKW* ist in der metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 um das 11,8-fache verglichen mit der nicht-metastasierenden Zelllinie SUIT-2 028 herunterreguliert. *LKW* wird als 2,3 kb großes Transkript exprimiert, dessen cDNS von 4 Exons kodiert wird. Das Gen ist auf Chromosom 20p12.2-p13 lokalisiert und enthält einen nach dem 325 Basen umfassenden 5´untranslatierten Bereich, einen 1074 bp großen offenen Leserahmen, der für ein Protein mit 358 Aminosäuren kodiert. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit bildete die Familie der dual-spezifischen Proteinkinasen (DSK), die bei der Proliferation, Differenzierung und Apoptose eine wichtige Rolle spielt. Die dual-spezifischen Kinasen enthalten sowohl die Konsensus-Motive der Serin/Threonin-Kinasen als auch die Motive von Tyrosin-Kinasen (Lindberg et al., 1992). Eine PROSITE-Analyse der Aminosäuresequenz von LKW ergab, dass LKW eine putative katalytische Serin/Threonin Proteinkinase Domäne im Bereich 80-315 Aminosäuren und eine katalytische Tyrosinkinase Domäne im Bereich 141-305 Aminosäuren beinhaltet. Somit kann LKW der Familie der dual-spezifischen Kinasen zugeordnet werden. Es wurde festgestellt, dass zu dieser Familie unter anderem auch die Proteine SKIP, SPK1 und PYT gehören (Stern et al., 1991; Charest et al., 1993; Lindberg et al., 1993). Auf Proteinebene hat LKW mit SKIP1 eine Sequenzhomologie der katalytischen Domänen von 54,6 %, mit PYT von 35,5 % und mit SPK1 von 35,2 % (Abbildung 9). Die zelluläre Funktion dieser Proteine ist bislang unbekannt.

Bei der Steuerung biochemischer Vorgänge spielt die reversible Phosphorylierung von Proteinen eine entscheidende Rolle. Proteinkinasen phosphorylieren ihre Zielproteine an Serinen/Threoninen und/oder Tyrosinen und beeinflussen auf diese Weise ihren Aktivitätszustand (Krebs et al., 1979). Damit nehmen diese Enzyme Schlüsselpositionen bei der Regulation zellulärer Vorgänge ein, was sich z. B. in einer erhöhten Tyrosinkinaseaktivität in Krebszellen widerspiegelt. Gut untersuchte zelluläre Vorgänge, die von Proteinkinasen reguliert werden, sind beispielsweise Zellteilung oder Apoptose. Proteinkinasen stellen daher ausgezeichnete Zielproteine zur Entwicklung von Pharmazeutika, z. B. für die Tumortherapie dar.

Unter der großen Gruppe der Proteinkinasen hat in jüngster Vergangenheit die Familie der sogenannten ‚Mitogen-aktivierten Proteinkinasen' (MAP Kinasen) eine besondere Bedeutung erlangt (Lewis et al., 1998; Widmann et al., 1999). Zu ihnen zählen unter

anderem die MAP Kinasen ERK (Extrazellulär Regulierte Kinase). Einzelne Mitglieder wie zum Beispiel ERK1 und ERK2 nehmen bei der Regulation von Zelldifferenzierungs- und -proliferationsvorgängen eine zentrale Stellung ein (Owaki et al., 1992). Lokalisation, Zeitverlauf wie auch die Höhe der MAP Kinase Aktivität scheinen dabei wichtige Determinanten für die zellulären Effekte dieser Signalkaskade zu sein. LKW weist zu den Proteinen ERK1 und ERK2 eine Sequenzhomologie der katalytischen Domänen von 32 und 31 % auf. Dieser Prozentsatz lässt eine Strukturähnlichkeit vermuten. Vorhersagen zur funktionellen Ähnlichkeit können erst ab 50 % Sequenzhomologie gemacht werden (Devos et al., 2000).

Bisher wurde über die Herunterregulation von Kinasen nur in Lungen- und Gebärmuttertumoren, jedoch nicht in Pankreastumoren berichtet. Beispielsweise wurde für Prk, eine Cytokin-induzierbare Serin/Threonin-Kinase, eine schwächere Expression in Lungenkarzinomen im Vergleich zu normalen Lungengeweben gezeigt (Li et al., 1996).

Die differentielle Expression des Gens *LKW* in dem Pankreastumor-Modellsystem und die Sequenzhomologie gaben Anlass zu der Hypothese, dass der Verlust von *LKW* eine Funktion bei der Progression des Pankreaskarzinoms einnehmen könnte. Diese Vermutung wurde durch Manzano et al. erhärtet, der ebenso für eine dual-spezifische Kinase, die Phosphatase CL100, eine 10 - 25-fache Überexpression in 10 normalen Ovarialgeweben, verglichen zur Expression in insgesamt 68 Tumorgeweben des Eierstocks, zeigen konnte. Die Induktion der CL100-mRNS-Expression unterdrückt das intraperitoneale Tumorwachstum in Nacktmäusen und trägt ebenso zur Veränderung der Zellmorphologie und der Motilität bei. Für die dual-spezifische Phosphatase CL100 und deren Herunterregulation in Eierstocktumoren wurde eine Beteiligung an der Progression von humanen Ovarialkarzinomen postuliert (Manzano et al., 2002).

4. Expressionsstudien zu *LKW* in Tumorzelllinien, Normalgewebe und Tumorgewebe

Die Ursachen der klinischen Progression des Pankreaskarzinoms sind bis heute nicht bekannt, auch wenn für einige molekulare Faktoren wie beispielsweise die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *P16, P21* und *P53* deutliche Korrelationen mit dem Fortschreiten der Erkrankung bekannt sind. Dennoch ist nicht klar, was die betroffenen Zellen vom differenzierten und nicht-metastasierenden zum dedifferenzierten, metastasierenden Phänotyp treibt. Die beiden Pankreastumorzelllinien SUIT-2 007 und SUIT-2 028, die sich von der gemeinsamen Elternzelllinie SUIT-2 ableiten, spiegeln genau diese beiden unterschiedlichen Phänotypen wider und stellen somit ein ideales Modellsystem zur Untersuchung der Ursachen für die Progression des Pankreaskarzinoms dar (Iwamura et al., 1987).

4.1 *LKW* wird in normalen sekretorischen Drüsen, Tumorzelllinien und verschiedenen Tumorgeweben exprimiert

Die Untersuchung von verschiedenen humanen, normalen Geweben und Tumorzelllinien in Northern-Blot-Analysen mittels Multiple Tissue Expression (MTE) Array zeigte eine schwach detektierbare *LKW*-Expression in normalen, ausschließlich sekretorischen epithelialen Drüsen wie der Bauchspeicheldrüse, Nebennierenrinde, Schilddrüse, Speicheldrüse und Brustdrüse (Abbildung 13). Auffallend war der hohe LKW-mRNS-Spiegel in allen analysierten Tumorzelllinien wie HeLa S3, Leukämie-Zelllinien K-562 und MOLT-4, Burkitt´s Lymphomzelllinie Daudi, und den Zelllinien SW480 (kolorektales Adenokarzinom) und A549 (Lungenkarzinom). Dieses hohe mRNS-Niveau könnte möglicherweise auf eine besondere Funktion bei der Entartung dieser Zellen hindeuten.
Aus diesem Grund wurde exemplarisch die Expression von *LKW* in Brustkrebs- und Dickdarmkrebszelllinien genauer betrachtet. Die Ergebnisse werden in den Kapiteln 4.2 und 4.3 diskutiert.

Wie mittels MTE-Blot bereits gezeigt, wurde *LKW* bevorzugt in Tumorzelllinien und kaum in normalen Geweben exprimiert. Um eine genauere Aussage bezüglich der gewebespezifischen Verteilung des LKW-Transkripts zu erhalten, wurde ein Cancer Profiling Array mit der *LKW*-spezifischen Sonde hybridisiert. Der Array ermöglicht einen Vergleich zwischen 241 korrespondierenden, normalen Geweben und Tumorgeweben. Es konnte die gewebespezifische *LKW*-Expression, wie sie bereits auf dem Multiple Tissue Array gezeigt wurde, bestätigt werden (Abbildung 14).

Das LKW-Transkript war ausschließlich in Tumorgeweben nachzuweisen, darunter vorwiegend in der Brust, im Dickdarm, der Niere und im Eierstock. Aufgrund der relativ häufigen LKW-mRNS-Expression in Brustkrebsgewebe, wurden einige Brustkrebs-zelllinien genauer untersucht.
Auffallend war zudem die schwächere Expression in allen drei Metastasen des Dickdarms verglichen zu deren Primärtumor. Im normalen Dickdarmgewebe der gleichen Patienten war keine nachweisbare Expression des Transkripts zu beobachten. Da im Pankreastumor-Modellsystem SUIT-2 007 und SUIT-2 028 in der metastasierenden Zelllinie eine Herunterregulation von *LKW* nachgewiesen wurde und sich ein gleiches Expressionsmuster von *LKW* in den Dickdarmmetastasen auf dem Cancer Profiling Array ergab, wurden Dickdarmtumore mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial auf deren *LKW*-Expression untersucht, auf die in Kapitel 4.3 näher eingegangen wird.

Es stellte sich für *LKW* die Frage, ob es ein Gen mit tumorigener Wirkung sein könnte. Diese Hypothese scheint besonders plausibel, da es nur sehr schwach in einigen wenigen normalen Geweben nachgewiesen werden konnte, stattdessen jedoch sehr stark in Tumorzelllinien und Tumorgewebe exprimiert wurde.
Die LKW-mRNS-Expression wurde in Pankreasgeweben genauer analysiert, da auf dem erwähnten Array nur ein korrespondierendes Pankreasgewebepaar gespottet war. Um zu untersuchen, ob *LKW* eine Bedeutung bei der Veränderung von normalem zu malignem Gewebe, im Speziellen Pankreasgewebe, haben könnte, wurde mittels quantitativer RT-PCR die LKW-mRNS-Expression in 4 normalen Pankreasgeweben, 4 chronischen Pankreatitiden und 6 Pankreaskarzinomen ermittelt (Abbildung 16). Es zeigte sich eine sehr niedrige relative Expression von *LKW* in den 4 untersuchten normalen Pankreasgeweben. Auffallend hingegen war eine starke (4) bis sehr starke (2) Abundanz des Transkripts für *LKW* in den 6 Pankreaskarzinomen. Somit konnte für diese Tumorart ein Hinweis einer möglichen Korrelation der LKW-mRNS-Expression mit der Tumorentstehung gezeigt werden. Da nur sehr wenig Pankreastumore operativ entfernt werden, steht nur eine geringe Anzahl an Probenmaterial zur Verfügung. Deshalb konnte die Tendenz nur an 10 Geweben exemplarisch gezeigt werden.

4.2 LKW-mRNS-Expression in nicht-invasiven Brustkrebszelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die LKW-mRNS-Expression mit einem nicht-invasiven Phänotyp in Brustkrebszelllinien korreliert. Das LKW-Transkript wurde in den 8 analysierten nicht-invasiven Brustrekbszelllinien stärker exprimiert als in den 13 invasiven Zelllinien (Abbildung 12).

4.3 Herunterregulation der LKW-mRNS-Expression korreliert in humanen Dickdarmkrebszelllinien und Dickdarmtumoren mit der Metastasierung

In Northern-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass *LKW* in 2 von 3 untersuchten Dickdarmkrebszelllinien mit Metastasierungspotenzial schwächer exprimiert wird als in den entsprechenden Ausgangszelllinien, die nicht metastasieren (Abbildung 11). Bei den Dickdarmkrebszelllinien handelt es sich um zwei Zelllinienpaare, deren Klone sich voneinander ableiten (Brattain et al., 1981; Morikawa et al., 1988). Aufgrund dieser Expressionsdaten wäre denkbar, dass *LKW* in den Prozess der Metastasierung, durch Herunterregulation der Expression, involviert sein könnte.

Mittels quantitativer LigthCycler^{TM}-PCR konnte gezeigt werden, dass *LKW* in den 24 untersuchten humanen, normalen Dickdarmgeweben nicht oder nur sehr gering exprimiert wurde (Abbildung 15). Zudem wurden 24 korresondierende Dickdarmgewebe unterschiedlicher Tumorstadien auf deren LKW-mRNS-Expression untersucht. Die Kolontumore ließen sich aufgrund ihres Metastasierungspotenzials in vier verschiedene Duke-Stadien einteilen (Morikawa et al., 1988; Ikeda et al., 1998). Ein starker Anstieg der LKW-mRNS-Expression war von Duke A-Stadium zu Duke B-Stadium festzustellen. D.h. *LKW* wurde in Primärtumoren, welche keine Metastasen ausbilden (Duke A), schwächer exprimiert als in Tumoren, die sich bereits außerhalb des Dickdarms auf das umgebende Gewebe ausgebreitet haben (Duke B). In Duke C-Tumoren, die bereits in regionale Lymphknoten metastasieren, wurde eine wesentlich schwächere Expression des LKW-Transkripts nachgewiesen als in Duke B-Tumoren. Deutlich niedriger war die Expression der LKW-mRNS zudem in den analysierten Dickdarmtumoren des Duke D-Stadiums gegenüber der des Duke C-Stadiums. Kolontumore des Duke D-Stadiums weisen das aggressivste Metastasierungspotenzial von allen Duke-Stadien auf. Sie bilden Metastasen in entfernter liegende Organe. Dieses Expressionsmuster von *LKW* weist deutlich darauf hin, dass sowohl dessen Überexpression im Vergleich zu normalem Dickdarmgewebe als auch dessen Herunterregulation in fortgeschrittenem Tumorstadium, verglichen zu frühen Tumorstadien, mit dem Metastasierungspotenzial korreliert. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis darauf, dass die LKW-mRNS-Expression in Bezug auf Metastasierung funktionell relevant sein könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich im Folgenden auf das hochregulierte Gen *UKW* konzentriert, da dieses als diagnostischer Marker eher einsetzbar ist.

5. Das transmembranständige Protein UKW gehört zur Immunglobulin-Superfamilie

Das *UKW*-Gen wurde von der metastasierenden Pankreastumorzelllinie SUIT-2 007 stark exprimiert. In der nicht-metastasierenden Zelllinie SUIT-2 028 war *UKW* dagegen nicht nachweisbar. Die Entdeckung der unterschiedlichen Expression von *UKW* in diesem Modellsystem gab Anlass zu der Hypothese, dass *UKW* eine wichtige Rolle bei der Veränderung von einer nicht-metastasierenden Zelle zu einer metastasierenden Zelle spielen könnte.

UKW gehört zu einer Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie und ist ein Plasmamembranprotein mit einer Transmembrandomäne, einer extrazellulären Domäne und einem langen zytoplasmatischen Bereich (Abbildung 18). Das gemeinsame Strukturmerkmal von Mitgliedern der Ig-Superfamilie ist der sogenannte Immunglobulin-Fold, dessen dreidimensionale Struktur zuerst in Immunglobulinen aufgeklärt wurde. Hierauf basiert die Namensgebung für die Superfamilie. Mitglieder der Ig-Superfamilie sind direkt oder indirekt an der Immunabwehr und der Zell-Zell-Erkennung beteiligt. Aber auch Wachstumsfaktor-Rezeptoren gehören der Ig-Superfamilie an. Die molekularen Module des Immunglobulins, die sogenannte V-Domäne sowie die C-Domäne, werden in ähnlicher Form vom Organismus nach einem variantenreichen Bauplan mehrfach als Bestandteile von Zelloberflächenmolekülen genutzt. Entsprechend wurden solche Strukturverwandte als ‚Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie' bezeichnet (Williams et al., 1988).

Während des Metastasierungsprozesses sind membranständige Moleküle von entscheidender Bedeutung. Sie spielen sowohl bei der Induktion der Angiogenese als auch als Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) bei der Anhaftung und Migration der Zellen und als Signal übertragende Rezeptoren eine Rolle (Albelda et al., 1990). Bestimmte Rezeptoren können Tumorzellen in gewisse Zielorgane dirigieren (Mignatti et al., 1996; Westermarck et al., 1999). Zudem stimulieren Wachstumsfaktoren die Proliferation von Zellen. Ferner ist ein Zusammenspiel zwischen Tumorzellen und Normalgewebe bei der Invasion zu beobachten, so dass Rezeptoren auch bei der Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen eine Rolle spielen können. Dies macht deutlich, dass bei einem so komplexen Vorgang wie der Metastasierung von Tumorzellen sehr viele verschiedene Funktionen von Transmembranrezeptoren wahrgenommen werden.

UKW kann mit weiteren Membranproteinen, die eine Transmembrandomäne und zwei extrazelluläre Immunglobulin-Domänen aufweisen, zu einer Untergruppe innerhalb der Immunglobulin-Superfamilie zusammengefasst werden. Zu diesen Proteinen zählen z.B.

der humane Coxsackievirus- und Adenovirusrezeptor (hCAR) als auch dessen Maus Homologon mCAR. Die Übereinstimmungen innerhalb dieser Superfamilie beschränken sich bisher in erster Linie auf Homologien in den Aminosäuresequenzen. Deren zelluläre Funktion ist bis dato nicht erforscht. Am besten untersucht ist bislang hCAR, der ursprünglich als ‚CVB3 binding protein' bezeichnet wurde (Bergelson et al., 1997). UKW ist zu 35 % zu hCAR homolog. hCAR dient als Zelloberflächenrezeptor für Gruppe B Coxsackieviren und eine Reihe von Adenoviren, dennoch sind die physiologische Funktion und der Ligand zu diesem Protein unbekannt (van Raaij et al., 2000). Für hCAR konnten Carson et al. beweisen, dass der Rezeptor durch die direkte Interaktion mit IgG und IgM eine wichtige Funktion in Verbindung mit dem Immunsystem einnimmt (Carson, 2001). Bergelson et al. schreiben hCAR eine wichtige Rolle bei Zell-Zell-Kontakten zu. In dieser Studie wurde für hCAR eine Expression in normalem Gehirn, Herz und ebenso Pankreas nachgewiesen (Bergelson et al., 1997). Diese Expression ähnelt dem *UKW*-Vorkommen in normalen Geweben wie mittels MTE-Array (Abbildung 22) gezeigt wurde.
Durch Immunfluoreszenz-Studien an transient transfizierten SUIT-2 028-Zellen, die ein GFP-UKW-Fusionsprotein exprimierten, konnte die Lokalisierung von UKW an der Plasmamembran bestätigt werden (Abbildung 27). Mit hCAR transfizierte NIH 3T3-Zellen zeigten, dass hCAR ebenso wie UKW in der Plasmamembran präsent ist (Tomko et al., 1997). Das Phänomen der äußerst starken UKW-mRNS-Expression an Stellen der Plasmamembran bei Zell-Zell-Kontakt bei UKW-Expression beider Zellen konnte nach Cohen et al. auch für hCAR gezeigt werden (Cohen et al., 2001). hCAR ist bei Kontakt zwischen hCAR-positiven Zellen in der Plasmamembran konzentriert, jedoch nicht bei Kontakt zwischen hCAR-positiven und hCAR-negativen Zellen. Deshalb könnten die beiden Proteine eine ähnliche Funktion ausüben.

Ashbourne et al. wiesen nach, dass die distal gelegene extrazelluläre Ig-Domäne von hCAR ebenfalls eine homophile Interaktion unterstützt, welche die Aggregation von hCAR-exprimierenden Zellen ermöglicht (Ashbourne Excoffon et al., 2003).
mCAR wurde von Honda et al. als Adhäsionsmolekül in Verbindung mit der Ausbildung von Nervensträngen im sich entwickelnden Nervensystem gebracht (Honda et al., 2000).
Einem weiteren Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, dem humanen ‚Brain- and testis-specific immunoglobulin superfamily' Protein (BT-IgSF), wird ebenso eine Rolle bei der Entwicklung oder Funktion des ZNS zugeschrieben (Suzu et al., 2002). UKW weist zu hBT-IgSF eine 32%ige Homologie auf. Beide Proteine werden in normalem Gehirn exprimiert.

Posttranslational werden Adhäsionsmoleküle, insbesondere durch Glykosylierungen, moduliert. Der extrazelluläre Anteil von Zelladhäsionsmolekülen der Ig-Superfamilie ist zum Teil hoch glykosyliert. Die Oligosaccharide sind in der Regel N-glykosidisch mit Asparagin verknüpft und schützen Ig-CAMs vor proteolytischem Abbau. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in der extrazellulären Domäne von UKW die Asparaginreste an den Positionen 74 und 197 liegen, beide in einer Konsensus-Sequenz für eine potenzielle N-Glykosylierung. Da der Asparaginrest 197 in der UKW-Sequenz und den Sequenzen des CAR-Proteins von Mensch, Maus und Zebrafisch konserviert ist, kann angenommen werden, dass bei UKW an dieser Stelle bevorzugt eine Glykosylierung stattfindet (Heath et al., 1997).

Es finden sich jedoch auch spezifische Glykostrukturen, denen eine funktionelle Bedeutung im Rahmen der Zell-Zell-Erkennung zugeschrieben wird. Hierbei kann die Bindung sowohl gehemmt als auch gefördert werden. Für das glykosylierte Zelladhäsionsmolekül hESAM (Endothelial cell-selective adhesion molecule) wurde, wie für die bisher beschriebenen Moleküle, gezeigt, dass es Zell-Zell-Adhäsion durch homophile Interaktion mediiert (Hirata et al., 2001).

Da Zelladhäsionsmoleküle die Struktur eines Gewebes wesentlich bestimmen, kann der Verlust adhäsiver Eigenschaften ursächlich für eine verminderte Differenzierung und invasive Wachstumseigenschaften des Tumors verantwortlich sein. Die verminderte Synthese eines Adhäsionsproteins ist häufig durch eine verminderte Transkription bedingt. Da *UKW* jedoch in der invasiven und metastasierenden Pankreastumorzelllinie stark überexprimiert ist, kann auch auf posttranslatorischer Ebene, so z.B. durch veränderte Glykosylierung oder Konformation dessen Funktion gestört sein.

Auf Proteinebene hat humanes UKW mit dem Adipocyte-specific protein-5 der Maus (mAsp-5) die größte Sequenzhomologie von 93 % (Tabelle 5), gefolgt von Ratten-Protein OL-16 mit 91 % Sequenzhomologie. Sehr wahrscheinlich handelt es sich bei mAsp-5 und rOL-16 um das Maus- und Ratten-Homologe zu humanem UKW. Die Aminosäure-sequenz der zytoplasmatischen Domäne des humanen UKW ist zu 87 % identisch zum zytoplasmatischen Bereich von mAsp-5. Die relativ große und stark konservierte zytoplasmatische Domäne von UKW deutet auf ein mögliches Potenzial zur Interaktion mit anderen intrazellulären Proteinen hin (Tsuruga et al., 2000).

Heath et al. postulierten A33 als einen neuen Zelloberflächenrezeptor bzw. ein Zell-adhäsionsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie (Heath et al., 1997). A33 wurde in 95 % aller Kolontumoren beschrieben, wobei es in anderen normalen Geweben nicht exprimiert wird. Von Heath et al. wird A33 als ein mögliches Target zur Immuntherapie von metastasierendem Kolonkrebs angesehen. UKW ist zu 32 % homolog zu A33.

Auch wenn für die Proteine der Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie eine Funktion bei der Zelladhäsion postuliert wurde, konnten bisher doch nur wenige präzise Aussagen zur genauen zellulären Funktion gemacht werden. Dennoch geben diese Studien erste Hinweise auf zellbiologische Abläufe, in die ebenso UKW involviert sein kann.
Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, in welchen normalen Geweben und Tumorgeweben *UKW* exprimiert wird und somit in physiologischen Prozessen eine Rolle spielen könnte.

6. Expressionsstudien zu *UKW* in Tumorzelllinien, Normalgewebe und Tumorgewebe

6.1 Nachweis der UKW-mRNS und des UKW-Proteins in den Pankreastumorzelllinien SUIT-2 007 und SUIT-2 028

Mittels Northern-Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass der UKW-Rezeptor in der metastasierenden Pankreastumorzelllinie SUIT-2 007 um das 99-fache stärker exprimiert wird als in der nicht-metastasierenden Zelllinie SUIT-2 028 (Abbildung 6). Diese Ergebnisse wurden im Immunoblot-Experiment unter Verwendung von SUIT-2 007- und SUIT-2 028-Zelllysaten bestätigt (Abbildung 25).

6.2 UKW-mRNS-Expression korreliert in Brusttumorzelllinien mit dem Invasionspotenzial

Da das UKW-Transkript ausschließlich in der invasiven Zelllinie SUIT-2 007 nachgewiesen wurde, sollte untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen dem mRNS-Niveau der *UKW*-cDNS und dem invasiven Status mehrerer Brustkrebszelllinien besteht. Die Invasion dieser Zelllinien wurde in einem konsistenten System und über deren Fähigkeit eine Kollagenfibroblast-Matrix zu durchdringen evaluiert (Thompson et al., 1992; Sedlak et al., 1996). Mittels quantitativer LigthCycler^{TM}-PCR wurde eine Korrelation der UKW-mRNS-Expression mit dem Invasionspotenzial von Brustkrebszelllinien nachgewiesen. Alle 9 analysierten invasiven Brustkrebszelllinien waren UKW-positiv (Abbildung 21). In den 12 untersuchten nichtinvasiven humanen Brustkrebszelllinien konnte keine oder nur eine sehr geringe UKW-mRNS-Expression detektiert werden. Die UKW-mRNS-Expression korreliert somit in Brustkrebszelllinien mit dem Invasionspotenzial.

6.3 Expression von *UKW*-mRNS in normalen Geweben und Tumorgeweben

Die Expression des UKW-Transkripts wurde in humanen, normalen Geweben mittels Multiple Tissue Expression Array untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass *UKW* in adulten Geweben hauptsächlich in Bereichen des Magen-Darm-Trakts, in Gehirn, Gebärmutter und der Brust exprimiert wurde (Abbildung 22). Zudem wurde *UKW* in fötalen Geweben wie Gehirn, Herz, Niere und Lunge nachgewiesen.
Die lymphatischen Organe zeigten eine unterschiedlich starke Expression von *UKW*. Während Luftröhre die UKW-mRNS exprimiert, ist eine Expression von *UKW* in Milz, Thymus, Blutlymphocyten, Lymphknoten und Knochenmark nicht detektierbar.
Die gewebespezifische Verteilung von *UKW* wurde mittels Cancer Profiling Array in insgesamt 13 verschiedenen, korrespondierenden normalen Geweben und Tumorgeweben genauer untersucht. Das Expressionsmuster von *UKW* in normalen Geweben, das sich aus dem Cancer Profiling Array ergab, bestätigte die Daten des Multiple Tissue Arrays. Die UKW-mRNS wird hauptsächlich in den Geweben Brust, Gebärmutter, Dickdarm und Mastdarm exprimiert. Ebenso konnte eine schwache Expression der UKW-mRNS in manchen Tumorproben der genannten Gewebe festgestellt werden.
Für das im Rahmen dieser Arbeit bevorzugt interessierende Gewebe, die Bauchspeicheldrüse, ist nur eine Gewebeprobe auf dem Blot aufgetragen. Diese zeigt keine detektierbare Expression des UKW-Transkripts. Da das Gen *UKW* in einer Pankreastumorzelllinie nachgewiesen wurde, sollte im Folgenden das Expressionsprofil in normalen und malignen Pankreasgeweben genauer untersucht werden.

6.4 *UKW* wird in Tumorgeweben des Pankreas exprimiert

Um die differentielle Expression von *UKW* in humanen Pankreasgeweben zu untersuchen, wurde dessen mRNS-Expression mittels RT-PCR in 7 normalen Pankreasgeweben, 3 chronischen Pankreatitiden und 15 Pankreaskarzinomen quantifiziert (Abbildung 24). Diese Untersuchungen der UKW-mRNS-Expression ergaben ein sehr interessantes Bild. Das UKW-Transkript konnte in allen 7 normalen Pankreasgeweben nur sehr schwach nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich eine sehr niedrige Expression von *UKW* in den 3 untersuchten chronischen Pankreatitiden. Auffallend war eine sehr starke Abundanz des Transkripts für *UKW* in den Geweben der Pankreaskarzinom-Patienten. In 13 von 15 Tumorgeweben wurde *UKW* wesentlich stärker exprimiert als in den normalen Geweben. Die hier gemachten Beobachtungen sprechen für eine quantitative Zunahme der UKW-mRNS in Pankreastumorgeweben gegenüber normalen Geweben. Dies könnte UKW als putativen zelltypspezifischen Marker oder als

diagnostisch relevantes Target bei malignen Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse interessant machen.

7. Funktionelle Studien: *In vitro*-Untersuchungen zum Einfluss ektopischer *UKW*-Expression

Im Rahmen dieser Arbeit sollte für das ausgewählte, unbekannte Gen *UKW* dessen funktionelle Relevanz hinsichtlich Proliferation, Invasion und Metastasierung aufgeklärt werden. In dem Pankreastumor-Modellsystem wurde nachgewiesen, dass das UKW-Transkript in der metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 sehr stark überexprimiert wird und in der nicht-metastasierenden Zelllinie SUIT-2 028 hingegen nicht. Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss eine transgene Expression von *UKW* auf den Phänotyp der nicht-metastasierenden Pankreastumorzelllinie SUIT-2 028 hat.

Die Transfektion von cDNS in eine nicht-metastasierende Zelle und die anschließende Untersuchung des veränderten Phänotyps stellen eine Möglichkeit zur Durchführung funktioneller Analysen dar. Die Pankreastumorzelllinie SUIT-2 028 wurde für diese Experimente gewählt, um einen möglichen Einfluss anderer molekularer Parameter auszuschließen. Da sich SUIT-2 007 und SUIT-2 028 von der identischen Elternzelllinie ableiten, sollten möglichst identische molekulare Verhältnisse gegeben sein. Die Transfektion von *UKW* in SUIT-2 028 sollte zeigen können, ob eine Überexpression von *UKW* eine Veränderung beispielsweise des Invasionsverhaltens oder Migrationsverhaltens induzieren kann. Der transmembranständige Rezeptor könnte Einfluss auf die Adhäsion, die Proliferation, die Migration, die Invasion und die Metastasierung ausüben.
Im Rahmen dieser Arbeit wurden SUIT-2 028/UKW-Transfektanten etabliert und einzelne ausgewählte Klone in Bezug auf diese Eigenschaften in verschiedenen *in vitro* Assays untersucht.

7.1 Einfluss von *UKW* auf Proliferation, Migration und Invasion

Der UKW-Rezeptor wurde in der metastasierenden Pankreastumorzelllinie SUIT-2 007 stark überexprimiert nachgewiesen. In der nicht-metastasierenden Pankreastumorzelllinie SUIT-2 028 war hingegen keine UKW-mRNS-Expression zu detektieren. Eine Überexpression von *UKW* wurde ebenso im Rahmen dieser Arbeit in vielen Pankreastumorgeweben festgestellt. Somit lag die Vermutung nahe, dass *UKW* bei der Progression und der Metastasierung von Pankreastumoren eine Rolle spielen könnte.

Die funktionelle Bedeutung von *UKW* in Bezug auf tumorigene Eigenschaften wie Proliferation, Migration und Invasion wurde in der Pankreastumorzelllinie SUIT-2 028 untersucht. Wie in Kapitel 6.4 gezeigt, gab es experimentelle Hinweise, dass der UKW-Rezeptor in Krebszellen im Vergleich zu normalem Pankreasepithel überexprimiert ist. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Proliferationsassays zeigte sich kein stimulatorischer Einfluss einer Überexpression von *UKW* auf die Proliferation von SUIT-2 028-Zellen (Abbildung 34).

Außerdem konnte in Migrationsassays gezeigt werden, dass eine Überexpression von *UKW* die Motilität der SUIT-2 028-Zellen nicht beeinflusst (Abbildung 33). Als Kontrolle wurde die Dickdarmkrebszelllinie CX-1 mit untersucht, für die bereits eine Fähigkeit zur Migration nachgewiesen wurde (Pers. Mitteilung H. Barchet) (Breen et al., 1993). Für die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie ICAM-1 und VCAM-1 hingegen, wurde eine Beteiligung an Migrationsprozessen bei Pankreastumoren beschrieben (Keleg et al., 2003). Tempia-Caliera et al. bestätigten ebenso für diese beiden Adhäsionsmoleküle eine Rolle bei Prozessen der Loslösung von Tumorzellen aus dem Primärtumor, worauf die Förderung der Migration folgt (Tempia-Caliera et al., 2002). Die wichtigsten Veränderungen beim Pankreaskrebs bezüglich der Migration kommen bei Genen vor, welche die Zellzyklusprogression und die Homöostase der extrazellulären Matrix regulieren (Keleg et al., 2003).

Mit der Dedifferenzierung von Tumorzellen geht vor allem eine erhöhte *in vitro*- und *in vivo*-Invasion einher. Zelllinien mit mesenchymalen Eigenschaften, wie sie die Pankreastumorzelllinie SUIT-2 007 aufweist, sind in der Lage Matrigel aufzulösen und zu durchwandern (Liotta et al., 1983). Ergänzend zu diesen funktionellen Assays wurde deshalb das Invasionspotenzial von SUIT-2 028/UKW-Transfektanten mittels Transwell-Test analysiert (Repesh, 1989).
In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression von *UKW* alleine nicht ausreicht, um einen invasiven Phänotyp in SUIT-2 028-Zellen zu induzieren. Für den Prozess der Invasion sind Proteasen unabdingbar. Dies hätte vorausgesetzt, dass *UKW* entweder selbst proteolytische Eigenschaften besitzt oder andere Proteine mit solchen Eigenschaften aktivieren oder deren Expression induzieren kann. Indessen wurde vielfach bewiesen, dass die meisten Matrixmetalloproteasen nicht von den Tumorzellen selbst, sondern von den umgebenden Stromazellen synthetisiert werden (Coussens et al., 1996). Bloomston et al. zeigten, dass MMP-2 eine wichtige Rolle bei der Invasion von Pankreastumorzellen spielt (Bloomston et al., 2002).

Ellenrieder et al. postulierten für MMP-2 eine Funktion bei der Entwicklung der charakteristischen desmoplastischen Reaktion beim Pankreaskrebs (Ellenrieder et al., 2000). Für die Pankreastumorzelllinien SUIT-2 007 und SUIT-2 028 konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit keine MMP-2-Expression nachgewiesen werden. Stattdessen wurde von Yang et al. mittels quantitativer RT-PCR die Expression der MMP-7 in SUIT-2 007- und SUIT-2 028-Zellen gezeigt (Yang et al., 2001). Dies belegt das komplexe Schema von Interaktionen zwischen Epithelzellen, Stromazellen und ECM-Komponenten und zeigt deutlich den Unterschied zwischen Systemen *in vitro* und den realen Gegebenheiten *in vivo*.

Sehr wahrscheinlich nimmt *UKW* eine zelltypspezifische Funktion wahr, für die in der Zelllinie SUIT-2 028 nicht die notwendigen molekularen Interaktionspartner exprimiert werden. Aus diesem Grund wären Experimente mit der UKW-positiven Zelllinie SUIT-2 007 interessant, bei welcher der Effekt der ‚Ausschaltung' von *UKW* untersucht werden sollte. Mittels siRNS oder Anti-sense-Studien könnte dies erzielt werden (Donze et al., 2002; Ullu et al., 2002). Diese Analysen würden auch dann zu einer Aussage führen, wenn *UKW* lediglich als stabilisierendes Membranprotein bei invasiven Prozessen eine Funktion übernimmt.

In der Literatur wurde bisher lediglich vom Einfluss stabil transfizierter Gene auf die Invasion von Pankreastumorzellen berichtet, bei denen es sich um die Tranfektion von Proteasen wie z.B. Trypsin I Precursor oder die Serinprotease Kallikrein oder um Wachstumsfaktoren wie beispielsweise den Nervenwachstumsfaktor NGF handelte (Tajima et al., 2001; Wolf et al., 2001; Zhu et al., 2002). Aus diesem Grund ist ein Vergleich mit Transfektanten der Ig-CAMs im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

7.2 Stabile *UKW*-Expression verändert Adhäsionsspezifität gegenüber Laminin und Fibronektin

Im Verlauf der Metastasierung müssen Zellen die Basalmembran auflösen und durchdringen, um anschließend durch das Bindegewebe wandern zu können. Das Bewegungsvermögen der Zellen wird dabei durch Wechselwirkungen zwischen zellulären Rezeptoren und den Bestandteilen der ECM vermittelt (Danen et al., 1996).
Zelladhäsionsmoleküle vermitteln den Kontakt von Zellen untereinander und die Adhärenz von Zellen an Bestandteile der extrazellulären Matrix. Zelladhäsionsmoleküle sind an allen Schritten der malignen Progression beteiligt. Durch Verlust und

Deregulation von Zelladhäsionsmolekülen geht die geordnete Gewebestruktur verloren, Tumorzellen lösen sich aus dem Gewebeverband. Voraussetzung für die Infiltration bindegewebiger Strukturen ist die Expression von Adhäsionsmolekülen, die an Bestandteile der ECM binden. Zur Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle gehören unter anderem die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-Superfamilie). Der extrazelluläre Anteil von Zelladhäsionsmolekülen der Ig-Superfamilie ist zum Teil hoch glykosyliert (Rojas et al., 1999).

Das funktionell bedeutsamste Glykoprotein der Basalmembran ist Laminin. Kleinman et al. zeigten, dass das komplexe Glykoprotein an Rezeptoren der Zellmembran bindet und Motilität, Wachstum und Differenzierung vermittelt (Kleinman et al., 2001). Der Zusammenhang zwischen epithelialem Phänotyp und dem Grad der Adhäsionsspezifität an Laminin ist bis heute ungeklärt. Laut Haberern et al. korreliert die Affinität gegenüber Laminin mit dem Metastasierungspotenzial von Pankreastumorzellen (Haberern et al., 1985). Auch Terranova et al. konnten zeigen, dass Laminin die Anhaftung metastasierender Tumorzellen an die Basalmembran fördert (Terranova et al., 1982). Die metastasierenden duktalen Pankreaskarzinomzelllinien BxPC-3 und SW1990 adhärieren bevorzugt sowohl an Laminin als auch an Fibronektin im Unterschied zu den nicht-metastasierenden Pankreastumorzelllinien PaCa-2 und PANC-1 (Sawai et al., 2003).

Da es sich bei dem UKW-Rezeptor um ein Adhäsionsmolekül handelt, wurde in der vorliegenden Arbeit das adhäsive Verhalten der SUIT-2 028-Zellen, bei Überexpression des UKW-Rezeptors, an verschiedene Bestandteile der ECM mittels Adhäsionsassay getestet.

Die cDNS des zur Ig-Superfamilie gehörenden Gens *UKW* wurde in einen mit Doxycyclin schaltbaren Expressionsvektor zur anschließenden Transfektion der SUIT-2 028-Zellen kloniert. In einem Adhäsionstest wurden drei UKW-Klone mit drei MOCK-Transfektanten, unter An- und Abwesenheit von Doxycyclin, und die Zelllinien SUIT-2 007 und SUIT-2 028 verglichen. Untersucht wurde die Fähigkeit der Zellen an Substrate der extrazellulären Matrix (Kollagen I, Kollagen IV, Laminin, Fibronektin und Vitronektin) zu binden.

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Adhäsionstests zeigten einen leichten Unterschied der Adhäsion an die Substrate Laminin und Fibronektin zwischen den UKW-Transfektanten und den SUIT-2 028-Wildtypzellen bzw. den MOCK-Transfektanten. An Laminin und Fibronektin zeigte SUIT-2 028 eine wesentlich schlechtere Bindung als die UKW-Klone und SUIT-2 007. Die metastasierende Pankreastumorzelllinie SUIT-2 007

zeigte die beste Anhaftung an die Basalmembrankomponente Laminin und eine gute Adhäsion an Fibronektin (Abbildung 39).
Die hier durchgeführten Experimente geben einen Hinweis darauf, dass *UKW* adhäsionsvermittelnde Eigenschaften hat. Für eine Funktion von UKW als Adhäsionsmolekül sprechen neben dem postulierten strukturellen Merkmal der Ig-Superfamilie vor allem auch die zwei N-Glykosylierungsstellen im extrazellulären Bereich von UKW und die membranständige Lokalisierung.

7.3 Einfluss stabiler *UKW*-Expression auf adhäsionsunabhängiges Wachstum

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels poly-HEMA-Assay, einem antiadhäsiven Polymer, gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen adhäsionsunabhängigem Wachstum und der Expression von *UKW* besteht. Die UKW-exprimierende Zelllinie SUIT-2 007 und die SUIT-2 028/UKW-Transfektanten wuchsen auf poly-HEMA-beschichteten Platten doppelt so schnell wie die Zelllinie SUIT-2 028 und bildeten zudem größere Sphäroide (Abbildungen 35, 37). Mayer et al. wiesen nach, dass 72 % von insgesamt 43 getesteten Karzinomzelllinien das Wachstumsverhalten ihres Original-tumors im 3D-Zellkulturmodell reflektieren. Zelllinien, die von soliden Karzinomen abstammten, zeigten häufig die Fähigkeit zur Sphäroidbildung (Mayer et al., 2001). Voraussetzung für die Metastasierung ist der Verlust der Zell-Zell-Adhäsion, welche für den Zusammenhalt des normalen Epithels verantwortlich ist (Miyasaka et al., 1995) (Fukazawa et al., 1995). Das unterschiedliche Wachstum der Zelllinien SUIT-2 007 und SUIT-2 028 auf einer nicht-adhäsiven Oberfläche im Vergleich zu deren konventionellen Monolayerkulturen lässt sich aufgrund des gegensätzlichen Metastasierungsgrades erklären.
Multizelluläre Sphäroide imitieren im Gegensatz zu ihren korrespondierenden Monolayerkulturen die morphologische und funktionelle Tumordifferenzierung des Ursprungskarzinoms (Vizirianakis et al., 2002). Von Mayer et al. wurde beispielsweise gezeigt, dass die 3D-Anordnung der Karzinomzellen auf poly-HEMA im Vergleich zu den Monolayerkulturen mit einem veränderten Expressionsausmaß verschiedener Zell-adhäsionsmoleküle einherging.
Da in der vorliegenden Arbeit Zellkulturartefakte aufgrund des verwendeten regulierbaren Vektors ausgeschlossen werden können, scheint UKW als Zelladhäsions-molekül eine entscheidende Funktion, die der Metastasierung dienlich ist, wahrzunehmen.

8. Immunhistochemischer Nachweis von UKW in Pankreas- und Dickdarmtumoren

Bisher wurde im Rahmen dieser Arbeit auf Transkriptebene gezeigt, dass in normalen Pankreasgeweben die UKW-mRNS nicht oder nur sehr schwach exprimiert wird. Dies konnte für die Proteinexpression mittels Immunhistochemie bestätigt werden. In Pankreastumoren wies der polyklonale UKW-spezifische Antikörper eine schwache Färbung auf, so dass nur in wenigen Tumoren eine *UKW*-Expression nachgewiesen werden konnte (Abbildung 41). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Protein in Pankreastumoren nur schwach oder überhaupt nicht exprimiert wird. Der Antikörper hat in Pankreastumoren prädominant an papilläre Strukturen gebunden. In 50 % der untersuchten Dickdarmtumore konnte in Epithelzellen der Schleimhaut eine spezifische Antikörperfärbung der Plasmamembran gezeigt werden. Nachdem mittels transienter Transfektion die Lokalisation von UKW in der Plasmamembran nachgewiesen wurde, war dieses Ergebnis zu erwarten (Abbildung 27). Das UKW-Protein wird zudem in Tumoren des Rektums exprimiert. Ansonsten war in anderen normalen und malignen Geweben mit diesem Antikörper keine Färbung detektierbar. Sehr wahrscheinlich wird das UKW-Protein tatsächlich kaum und nur sehr schwach exprimiert.

Zusammenfassung

Bauchspeicheldrüsenkrebs ist die fünfthäufigste Ursache krebsbedingter Todesfälle in den Industrieländern und zeichnet sich durch eine infauste Prognose, eine steigende Inzidenz und den Mangel an wirksamen therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten aus. Die Identifizierung neuer, potenzieller ‚Krankheitsgene', deren Expression Einfluss auf das invasive Wachstum und die Metastasierung von Pankreastumoren nimmt, stellt eine Möglichkeit zur Verbesserung sowohl diagnostischer als auch therapeutischer Ansätze in der Behandlung von Bauchspeicheldrüsenkrebs dar.

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung metastasierungs- und invasionsassoziierter Gene in dem humanen Pankreastumor-Modellsystem SUIT-2 007/028. Es wurden differentiell exprimierte Gene mittels Affymetrix GeneChip® Array Technologie gesucht und ein Transkriptionsprofil aus insgesamt 50.000 expressed sequence tags (ESTs) erstellt. Der Vergleich der Transkriptionsprofile der stark metastasierenden Zelllinie SUIT-2 007 und der nicht-metastasierenden Zelllinie SUIT-2 028 resultierte in der Identifizierung von zwei differentiell exprimierten ESTs, welche mit bisher unbekannten Genen korrespondierten, die *LKW* und *UKW* genannt und dann im Laufe der Arbeit isoliert und funktionell charakterisiert wurden.

Das zu *LKW* korrespondierende Gen (2,3 kb) war in der metastasierenden Pankreastumorzelllinie SUIT-2 007 herunterreguliert und kodiert für ein Protein mit 358 Aminosäuren, das der Familie der dual-spezifischen Kinasen zugeordnet wurde. Anhand von Expressionsanalysen in Brustkrebszelllinien unterschiedlichen Invasionspotenzials konnte mittels quantitativer PCR gezeigt werden, dass die LKW-mRNS-Expression mit einem nicht-invasiven Phänotyp korreliert. Zudem wurde in Kolonkarzinomgeweben mit Zunahme des Invasions- und Metastasierungspotenzials eine Verringerung der LKW-mRNS-Expression in Duke C- und D-Stadien nachgewiesen. Das Expressionsmuster von *LKW* weist darauf hin, dass dessen Herunterregulation in invasiven und metastasierenden Tumoren mit dem fortgeschrittenen Tumorstatus korreliert.

Das für *UKW* korrespondierende Gen (5,1 kb) wurde sehr stark und ausschließlich in der metastasierenden Pankreastumorzelllinie SUIT-2 007 exprimiert. Es ist auf Chromosom 11q24.1 lokalisiert, ein Chromosom, auf dem bei Pankreastumoren häufig Genamplifikationen auftreten. UKW, mit 374 Aminosäuren, weist die Topologie eines Adhäsionsmoleküls auf und es wurden 6 homologe Proteine gefunden. Auf Proteinebene hat UKW mit dem Adipocyte-specific protein-5 (mAsp-5) der Maus die größte Sequenzhomologie von 93 %. Die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien zeigten eine Korrelation der UKW-mRNS-Expression mit dem Invasionspotenzial von

Brustkrebszelllinien. Auf Gewebeebene konnte mit einem UKW-spezifischen Antiserum eine positive Korrelation der UKW-Expression mit Pankreastumorgeweben im Vergleich zur sehr schwachen Expression in normalen Pankreasgeweben beobachtet werden. Immunfluoreszenz-Studien transient transfizierter SUIT-2 028-Zellen zeigten die Lokalisation von UKW in der Plasmamembran und im Besonderen eine gehäuft auftretende Expression bei homophilem Zell-Zell-Kontakt. Für die homologen Proteine wurde bereits gezeigt, dass sie Zell-Zell-Adhäsion durch homophile Interaktion mediieren. Eine mögliche funktionelle Rolle von *UKW* bei Adhäsionsvorgängen wird durch Beobachtungen des Adhäsionsassays unterstützt.

UKW könnte somit als diagnostischer Marker bei malignen Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse interessant sein. Er könnte auch eine Zielstruktur für therapeutische Ansätze darstellen.

Literaturverzeichnis

Ahlgren, J. D. (1996). Chemotherapy for pancreatic carcinoma. Cancer *78*, 654-663.

Albelda, S. M. and Buck, C. A. (1990). Integrins and other cell adhesion molecules. Faseb J *4*, 2868-2880.

Ashbourne Excoffon, K. J., Moninger, T. and Zabner, J. (2003). The coxsackie B virus and adenovirus receptor resides in a distinct membrane microdomain. J Virol *77*, 2559-2567.

Bardeesy, N. and DePinho, R. A. (2002). Pancreatic cancer biology and genetics. Nat Rev Cancer *2*, 897-909.

Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L. and Finberg, R. W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. Science *275*, 1320-1323.

Bergelson, J. M., Krithivas, A., Celi, L., Droguett, G., Horwitz, M. S., Wickham, T., Crowell, R. L. and Finberg, R. W. (1998). The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. J Virol *72*, 415-419.

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

Bloomston, M., Zervos, E. E. and Rosemurgy, A. S., 2nd (2002). Matrix metalloproteinases and their role in pancreatic cancer: a review of preclinical studies and clinical trials. Ann Surg Oncol *9*, 668-674.

Bookstein, R., Bova, G. S., MacGrogan, D., Levy, A. and Isaacs, W. B. (1997). Tumour-suppressor genes in prostatic oncogenesis: a positional approach. Br J Urol *79 Suppl 1*, 28-36.

Brattain, M. G., Fine, W. D., Khaled, F. M., Thompson, J. and Brattain, D. E. (1981). Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. Cancer Res *41*, 1751-1756.

Breen, E., Clarke, A., Steele, G., Jr. and Mercurio, A. M. (1993). Poorly differentiated colon carcinoma cell lines deficient in alpha-catenin expression express high levels of surface E-cadherin but lack Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion. Cell Adhes Commun *1*, 239-250.

Caldas, C., Hahn, S. A., da Costa, L. T., Redston, M. S., Schutte, M., Seymour, A. B., Weinstein, C. L., Hruban, R. H., Yeo, C. J. and Kern, S. E. (1994). Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. Nat Genet *8*, 27-32.

Carson, S. D. (2001). Receptor for the group B coxsackieviruses and adenoviruses: CAR. Rev Med Virol *11*, 219-226.

Chang, K. and Pastan, I. (1996). Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 136-140.

Charest, D. L., Mordret, G., Harder, K. W., Jirik, F. and Pelech, S. L. (1993). Molecular cloning, expression, and characterization of the human mitogen-activated protein kinase p44erk1. Mol Cell Biol *13*, 4679-4690.

Chen, G., Ray, R., Dubik, D., Shi, L., Cizeau, J., Bleackley, R. C., Saxena, S., Gietz, R. D. and Greenberg, A. H. (1997). The E1B 19K/Bcl-2-binding protein Nip3 is a dimeric mitochondrial protein that activates apoptosis. J Exp Med *186*, 1975-1983.

Chretien, I., Marcuz, A., Courtet, M., Katevuo, K., Vainio, O., Heath, J. K., White, S. J. and Du Pasquier, L. (1998). CTX, a Xenopus thymocyte receptor, defines a molecular family conserved throughout vertebrates. Eur J Immunol *28*, 4094-4104.

Chretien, I., Robert, J., Marcuz, A., Garcia-Sanz, J. A., Courtet, M. and Du Pasquier, L. (1996). CTX, a novel molecule specifically expressed on the surface of cortical thymocytes in Xenopus. Eur J Immunol *26*, 780-791.

Cohen, C. J., Shieh, J. T., Pickles, R. J., Okegawa, T., Hsieh, J. T. and Bergelson, J. M. (2001). The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 15191-15196.

Coussens, L. M. and Werb, Z. (1996). Matrix metalloproteinases and the development of cancer. Chem Biol *3*, 895-904.

Danen, E. H., Jansen, K. F., Klein, C. E., Smit, N. P., Ruiter, D. J. and van Muijen, G. N. (1996). Loss of adhesion to basement membrane components but not to keratinocytes in proliferating melanocytes. Eur J Cell Biol *70*, 69-75.

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

de Wit, N. J., Weidle, U. H., Ruiter, D. J. and van Muijen, G. N. (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.

Devos, D. and Valencia, A. (2000). Practical limits of function prediction. Proteins *41*, 98-107.

Donze, O. and Picard, D. (2002). RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. Nucleic Acids Res *30*, e46.

Ebert, M., Yokoyama, M., Friess, H., Kobrin, M. S., Buchler, M. W. and Korc, M. (1995). Induction of platelet-derived growth factor A and B chains and over-expression of their receptors in human pancreatic cancer. Int J Cancer *62*, 529-535.

Ellenrieder, V., Adler, G. and Gress, T. M. (1999). Invasion and metastasis in pancreatic cancer. Ann Oncol *10*, 46-50.

Ellenrieder, V., Alber, B., Lacher, U., Hendler, S. F., Menke, A., Boeck, W., Wagner, M., Wilda, M., Friess, H., Buchler, M., et al. (2000). Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. Int J Cancer *85*, 14-20.

Euer, N., Schwirzke, M., Evtimova, V., Burtscher, H., Jarsch, M., Tarin, D. and Weidle, U. H. (2002). Identification of genes associated with metastasis of mammary carcinoma in metastatic versus non-metastatic cell lines. Anticancer Res *22*, 733-740.

Evans, D. B. (2001). Preoperative chemoradiation for resectable and locally advanced adenocarcinoma of the pancreas. J Gastrointest Surg *5*, 2-5.

Evtimova, V., Schwirzke, M., Tarbe, N., Burtscher, H., Jarsch, M., Kaul, S. and Weidle, U. H. (2001). Identification of breast cancer metastasis-associated genes by chip technology. Anticancer Res *21*, 3799-3806.

Fidler, I. J. and Ellis, L. M. (1994). The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. Cell *79*, 185-188.

Flanders, T. Y. and Foulkes, W. D. (1996). Pancreatic adenocarcinoma: epidemiology and genetics. J Med Genet *33*, 889-898.

Folkman, J. and Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. Science *235*, 442-447.

Frixen, U. H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Lochner, D. and Birchmeier, W. (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. J Cell Biol *113*, 173-185.

Fukazawa, H., Mizuno, S. and Uehara, Y. (1995). A microplate assay for quantitation of anchorage-independent growth of transformed cells. Anal Biochem *228*, 83-90.

Geng, J. G., Bevilacqua, M. P., Moore, K. L., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., Kim, J. M., Bliss, G. A., Zimmerman, G. A. and McEver, R. P. (1990). Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. Nature *343*, 757-760.

Ghaneh, P., Kawesha, A., Evans, J. D. and Neoptolemos, J. P. (2002). Molecular prognostic markers in pancreatic cancer. J Hepatobiliary Pancreat Surg *9*, 1-11.

Goggins, M., Hruban, R. H. and Kern, S. E. (2000). BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. Am J Pathol *156*, 1767-1771.

Hahn, S. A., Schutte, M., Hoque, A. T., Moskaluk, C. A., da Costa, L. T., Rozenblum, E., Weinstein, C. L., Fischer, A., Yeo, C. J., Hruban, R. H., et al. (1996). DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. Science *271*, 350-353.

Heath, J. K., White, S. J., Johnstone, C. N., Catimel, B., Simpson, R. J., Moritz, R. L., Tu, G. F., Ji, H., Whitehead, R. H., Groenen, L. C., et al. (1997). The human A33 antigen is a transmembrane glycoprotein and a novel member of the immunoglobulin superfamily. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 469-474.

Hemler, M. E. and Rutishauser, U. (2000). Cell-to-cell contact and extracellular matrix. Editorial overview. Curr Opin Cell Biol *12*, 539-541.

Hida, K., Wada, J., Zhang, H., Hiragushi, K., Tsuchiyama, Y., Shikata, K. and Makino, H. (2000). Identification of genes specifically expressed in the accumulated visceral adipose tissue of OLETF rats. J Lipid Res *41*, 1615-1622.

Hirata, K., Ishida, T., Penta, K., Rezaee, M., Yang, E., Wohlgemuth, J. and Quertermous, T. (2001). Cloning of an immunoglobulin family adhesion molecule selectively expressed by endothelial cells. J Biol Chem *276*, 16223-16231.

Honda, T., Saitoh, H., Masuko, M., Katagiri-Abe, T., Tominaga, K., Kozakai, I., Kobayashi, K., Kumanishi, T., Watanabe, Y. G., Odani, S., et al. (2000). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. Brain Res Mol Brain Res *77*, 19-28.

Howe, G. R., Jain, M., Burch, J. D. and Miller, A. B. (1991). Cigarette smoking and cancer of the pancreas: evidence from a population-based case-control study in Toronto, Canada. Int J Cancer *47*, 323-328.

Hruban, R. H., van Mansfeld, A. D., Offerhaus, G. J., van Weering, D. H., Allison, D. C., Goodman, S. N., Kensler, T. W., Bose, K. K., Cameron, J. L. and Bos, J. L. (1993). K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. Am J Pathol *143*, 545-554.

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

Ikeda, Y., Koyanagi, N., Mori, M., Minagawa, S., Toyomasu, T., Ezaki, T., Tateishi, H. and Sugimachi, K. (1998). Tumor stage in the proximal colon under conditions of a proximal shift of colorectal cancer with age. Hepatogastroenterology *45*, 1535-1538.

Iwamura, T., Caffrey, T. C., Kitamura, N., Yamanari, H., Setoguchi, T. and Hollingsworth, M. A. (1997). P-selectin expression in a metastatic pancreatic tumor cell line (SUIT-2). Cancer Res *57*, 1206-1212.

Iwamura, T., Katsuki, T. and Ide, K. (1987). Establishment and characterization of a human pancreatic cancer cell line (SUIT-2) producing carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9. Jpn J Cancer Res *78*, 54-62.

Iwamura, T., Taniguchi, S., Kitamura, N., Yamanari, H., Kojima, A., Hidaka, K., Setoguchi, T. and Katsuki, T. (1992). Correlation between CA19-9 production in vitro and histological grades of differentiation in vivo in clones isolated from a human pancreatic cancer cell line (SUIT-2). J Gastroenterol Hepatol *7*, 512-519.

Keleg, S., Buchler, P., Ludwig, R., Buchler, M. W. and Friess, H. (2003). Invasion and metastasis in pancreatic cancer. Mol Cancer *2*, 14.

Kelly, D. M. and Benjamin, I. S. (1995). Pancreatic carcinoma. Ann Oncol *6*, 19-28.

Klimstra, D. S. and Longnecker, D. S. (1994). K-ras mutations in pancreatic ductal proliferative lesions. Am J Pathol *145*, 1547-1550.

Krebs, E. G. and Beavo, J. A. (1979). Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. Annu Rev Biochem *48*, 923-959.

Lewis, T. S., Shapiro, P. S. and Ahn, N. G. (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. Adv Cancer Res *74*, 49-139.

Li, B., Ouyang, B., Pan, H., Reissmann, P. T., Slamon, D. J., Arceci, R., Lu, L. and Dai, W. (1996). Prk, a cytokine-inducible human protein serine/threonine kinase whose expression appears to be down-regulated in lung carcinomas. J Biol Chem *271*, 19402-19408.

Li, D. and Jiao, L. (2003). Molecular epidemiology of pancreatic cancer. Int J Gastrointest Cancer *33*, 3-14.

Lindberg, R. A., Fischer, W. H. and Hunter, T. (1993). Characterization of a human protein threonine kinase isolated by screening an expression library with antibodies to phosphotyrosine. Oncogene *8*, 351-359.

Lindberg, R. A., Quinn, A. M. and Hunter, T. (1992). Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do? Trends Biochem Sci *17*, 114-119.

Lionetto, R., Pugliese, V., Bruzzi, P. and Rosso, R. (1995). No standard treatment is available for advanced pancreatic cancer. Eur J Cancer *31A*, 882-887.

Liotta, L. A., Rao, C. N. and Barsky, S. H. (1983). Tumor invasion and the extracellular matrix. Lab Invest *49*, 636-649.

Liotta, L. A., Steeg, P. S. and Stetler-Stevenson, W. G. (1991). Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell *64*, 327-336.

Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., Cavallini, G., Ammann, R. W., Lankisch, P. G., Andersen, J. R., Dimagno, E. P., Andren-Sandberg, A. and Domellof, L. (1993). Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. N Engl J Med *328*, 1433-1437.

Luttges, J., Vogel, I., Menke, M., Henne-Bruns, D., Kremer, B. and Kloppel, G. (1998). The retroperitoneal resection margin and vessel involvement are important

factors determining survival after pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the head of the pancreas. Virchows Arch *433*, 237-242.

Lynch, H. T. (1994). Genetics and pancreatic cancer. Arch Surg *129*, 266-268.

Manes, S., Mira, E., Gomez-Mouton, C., Lacalle, R. A., Keller, P., Labrador, J. P. and Martinez, A. C. (1999). Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells. Embo J *18*, 6211-6220.

Manzano, R. G., Montuenga, L. M., Dayton, M., Dent, P., Kinoshita, I., Vicent, S., Gardner, G. J., Nguyen, P., Choi, Y. H., Trepel, J., et al. (2002). CL100 expression is down-regulated in advanced epithelial ovarian cancer and its re-expression decreases its malignant potential. Oncogene *21*, 4435-4447.

Mayer, B., Klement, G., Kaneko, M., Man, S., Jothy, S., Rak, J. and Kerbel, R. S. (2001). Multicellular gastric cancer spheroids recapitulate growth pattern and differentiation phenotype of human gastric carcinomas. Gastroenterology *121*, 839-852.

Mignatti, P. and Rifkin, D. B. (1996). Plasminogen activators and angiogenesis. Curr Top Microbiol Immunol *213 (Pt 1)*, 33-50.

Miyamoto, S., Teramoto, H., Gutkind, J. S. and Yamada, K. M. (1996). Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. J Cell Biol *135*, 1633-1642.

Morikawa, K., Walker, S. M., Jessup, J. M. and Fidler, I. J. (1988). 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, S. M., Nakajima, M., Pathak, S., Jessup, J. M. and Fidler, I. J. (1988). Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. Cancer Res *48*, 6863-6871.

Nekarda, H., Schmitt, M., Ulm, K., Wenninger, A., Vogelsang, H., Becker, K., Roder, J. D., Fink, U. and Siewert, J. R. (1994). Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. Cancer Res *54*, 2900-2907.

Oikawa, T., Kushuhara, M., Ishikawa, S., Hitomi, J., Kono, A., Iwanaga, T. and Yamaguchi, K. (1994). Production of endothelin-1 and thrombomodulin by human pancreatic cancer cells. Br J Cancer *69*, 1059-1064.

Okazaki, Y., Furuno,M., Kasukawa,T., Adachi,J., Bono,H., Kondo,S., Nikaido,I., Osato,N., Saito,R., Suzuki,H., Yamanaka,I., (2002). Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. Nature *420*, 563-573.

Owaki, H., Makar, R., Boulton, T. G., Cobb, M. H. and Geppert, T. D. (1992). Extracellular signal-regulated kinases in T cells: characterization of human ERK1 and ERK2 cDNAs. Biochem Biophys Res Commun *182*, 1416-1422.

Pines, J. and Lafont, F. (2001). Web alert: Cell-to-cell contact and extracellular matrix. Curr Opin Cell Biol *13*, 523-524.

Plowman, G. D., Green, J. M., McDonald, V. L., Neubauer, M. G., Disteche, C. M., Todaro, G. J. and Shoyab, M. (1990). The amphiregulin gene encodes a novel epidermal growth factor-related protein with tumor-inhibitory activity. Mol Cell Biol *10*, 1969-1981.

Repesh, L. A. (1989). A new in vitro assay for quantitating tumor cell invasion. Invasion Metastasis *9*, 192-208.

Rojas, A. I. and Ahmed, A. R. (1999). Adhesion receptors in health and disease. Crit Rev Oral Biol Med *10*, 337-358.

Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S. A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S. N., Sohn, T. A., Hruban, R. H., Yeo, C. J., et al. (1997). Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. Cancer Res *57*, 1731-1734.

Sakorafas, G. H., Tsiotou, A. G. and Tsiotos, G. G. (2000). Molecular biology of pancreatic cancer; oncogenes, tumour suppressor genes, growth factors, and their receptors from a clinical perspective. Cancer Treat Rev *26*, 29-52.

Sawai, H., Takeyama, H., Yamamoto, M., Furuta, A., Funahashi, H., Okada, Y., Sato, M., Tanaka, M. and Manabe, T. (2003). Enhancement of integrins by interleukin-1alpha, and their relationship with metastatic and invasive behavior of human pancreatic ductal adenocarcinoma cells. J Surg Oncol *82*, 51-56.

Schwaeble, W., Kerlin, M., Meyer zum Buschenfelde, K. H. and Dippold, W. (1993). De novo expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, CD54) in pancreas cancer. Int J Cancer *53*, 328-333.

Schwaeble, W., Kerlin, M., Meyer zum Buschenfelde, K. H. and Dippold, W. (1993). De novo expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, CD54) in pancreas cancer. Int J Cancer *53*, 328-333.

Sedlak, J., Sedlakova, O., Hlavcak, P., Hunakova, L., Bizik, J., Grofova, M. and Chorvath, B. (1996). Cell surface phenotype and increased penetration of human multidrug-resistant ovarian carcinoma cells into in vitro collagen-fibroblasts matrix. Neoplasma *43*, 389-395.

Sirivatanauksorn, V., Sirivatanauksorn, Y. and Lemoine, N. R. (1998). Molecular pattern of ductal pancreatic cancer. Langenbecks Arch Surg *383*, 105-115.

Skubitz, A. P. (2002). Adhesion molecules. Cancer Treat Res *107*, 305-329.

Sohn, T. A. (2002). The molecular genetics of pancreatic ductal carcinoma. Minerva Chir *57*, 561-574.

Stern, D. F., Zheng, P., Beidler, D. R. and Zerillo, C. (1991). Spk1, a new kinase from Saccharomyces cerevisiae, phosphorylates proteins on serine, threonine, and tyrosine. Mol Cell Biol *11*, 987-1001.

Strathdee, C. A., McLeod, M. R. and Hall, J. R. (1999). Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector. Gene *229*, 21-29.

Strausberg, R. L., Feingold,E.A., Grouse,L.H., Derge,J.G., Klausner,R.D., Collins,F.S., Wagner,L., Shenmen,C.M., Schuler,G.D., (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *99*, 16899-16903.

Streit, M., Schmidt, R., Hilgenfeld, R. U., Thiel, E. and Kreuser, E. D. (1996). Adhesion receptors in malignant transformation and dissemination of gastrointestinal tumors. J Mol Med *74*, 253-268.

Sunami, E., Tsuno, N., Osada, T., Saito, S., Kitayama, J., Tomozawa, S., Tsuruo, T., Shibata, Y., Muto, T. and Nagawa, H. (2000). MMP-1 is a prognostic marker for hematogenous metastasis of colorectal cancer. Oncologist *5*, 108-114.

Suzu, S., Hayashi, Y., Harumi, T., Nomaguchi, K., Yamada, M., Hayasawa, H. and Motoyoshi, K. (2002). Molecular cloning of a novel immunoglobulin superfamily gene preferentially expressed by brain and testis. Biochem Biophys Res Commun *296*, 1215.

Tajima, H., Ohta, T., Elnemr, A., Yasui, T., Kitagawa, H., Fushida, S., Kayahara, M., Miwa, K., Wakayama, T., Iseki, S., et al. (2001). Enhanced invasiveness of pancreatic adenocarcinoma cells stably transfected with cationic trypsinogen cDNA. Int J Cancer *94*, 699-704.

Taniguchi, S., Iwamura, T. and Katsuki, T. (1992). Correlation between spontaneous metastatic potential and type I collagenolytic activity in a human pancreatic cancer cell line (SUIT-2) and sublines. Clin Exp Metastasis *10*, 259-266.

Taniguchi, S., Iwamura, T., Kitamura, N., Yamanari, H. and Setoguchi, T. (1994). Heterogeneities of attachment, chemotaxis, and protease production among clones with different metastatic potentials from a human pancreatic cancer cell line. Clin Exp Metastasis *12*, 238-244.

Tempia-Caliera, A. A., Horvath, L. Z., Zimmermann, A., Tihanyi, T. T., Korc, M., Friess, H. and Buchler, M. W. (2002). Adhesion molecules in human pancreatic cancer. J Surg Oncol *79*, 93-100.

Templeton, N. S., Brown, P. D., Levy, A. T., Margulies, I. M., Liotta, L. A. and Stetler-Stevenson, W. G. (1990). Cloning and characterization of human tumor cell interstitial collagenase. Cancer Res *50*, 5431-5437.

Thompson, E. W., Paik, S., Brunner, N., Sommers, C. L., Zugmaier, G., Clarke, R., Shima, T. B., Torri, J., Donahue, S., Lippman, M. E., et al. (1992). Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. J Cell Physiol *150*, 534-544.

Tomko, R. P., Xu, R. and Philipson, L. (1997). HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 3352-3356.

Tong, D., Czerwenka, K., Sedlak, J., Schneeberger, C., Schiebel, I., Concin, N., Leodolter, S. and Zeillinger, R. (1999). Association of in vitro invasiveness and gene expression of estrogen receptor, progesterone receptor, pS2 and plasminogen activator inhibitor-1 in human breast cancer cell lines. Breast Cancer Res Treat *56*, 91-97.

Tsuruga, H., Kumagai, H., Kojima, T. and Kitamura, T. (2000). Identification of novel membrane and secreted proteins upregulated during adipocyte differentiation. Biochem Biophys Res Commun *272*, 293-297.

Ullu, E., Djikeng, A., Shi, H. and Tschudi, C. (2002). RNA interference: advances and questions. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci *357*, 65-70.

Urban, T., Ricci, S., Grange, J. D., Lacave, R., Boudghene, F., Breittmayer, F., Languille, O., Roland, J. and Bernaudin, J. F. (1993). Detection of c-Ki-ras mutation by PCR/RFLP analysis and diagnosis of pancreatic adenocarcinomas. J Natl Cancer Inst *85*, 2008-2012.

van Raaij, M. J., Chouin, E., van der Zandt, H., Bergelson, J. M. and Cusack, S. (2000). Dimeric structure of the coxsackievirus and adenovirus receptor D1 domain at 1.7 A resolution. Structure Fold Des *8*, 1147-1155.

Venkitaraman, A. R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. Cell *108*, 171-182.

Warshaw, A. L. and Fernandez-del Castillo, C. (1992). Pancreatic carcinoma. N Engl J Med *326*, 455-465.

Weber, C. K., Sommer, G., Michl, P., Fensterer, H., Weimer, M., Gansauge, F., Leder, G., Adler, G. and Gress, T. M. (2001). Biglycan is overexpressed in pancreatic

cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines. Gastroenterology *121*, 657-667.

Westermarck, J. and Kahari, V. M. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. Faseb J *13*, 781-792.

Whelan, A. J., Bartsch, D. and Goodfellow, P. J. (1995). Brief report: a familial syndrome of pancreatic cancer and melanoma with a mutation in the CDKN2 tumor-suppressor gene. N Engl J Med *333*, 975-977.

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. and Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. Physiol Rev *79*, 143-180.

Willett, C. G., Lewandrowski, K., Warshaw, A. L., Efird, J. and Compton, C. C. (1993). Resection margins in carcinoma of the head of the pancreas. Implications for radiation therapy. Ann Surg *217*, 144-148.

Williams, A. F. and Barclay, A. N. (1988). The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. Annu Rev Immunol *6*, 381-405.

Wolf, W. C., Evans, D. M., Chao, L. and Chao, J. (2001). A synthetic tissue kallikrein inhibitor suppresses cancer cell invasiveness. Am J Pathol *159*, 1797-1805.

Yang, X., Staren, E. D., Howard, J. M., Iwamura, T., Bartsch, J. E. and Appert, H. E. (2001). Invasiveness and MMP expression in pancreatic carcinoma. J Surg Res *98*, 33-39.

Zhu, Z., Kleeff, J., Kayed, H., Wang, L., Korc, M., Buchler, M. W. and Friess, H. (2002). Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells. Mol Carcinog *35*, 138-147.

Anhang

1. Abkürzungen

A	Absorption
Abb.	Abbildung
AC	Accession Nummer
AP	Alkalische Phosphatase
APDS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATCC	‚American Type Culture Collection'
BGH	‚Bovine Growth Hormone'
bp	Basenpaar
BSA	‚Bovine Serum Albumine', Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	cirka
cDNS	komplementäre DNS
CMV	Cytomegalovirus
d.h.	das heisst
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	‚Dulbecco´s Modified Eagle Medium'
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dox	Doxycyclin
E. coli	Escherichia coli
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	‚Enzyme-linked immunosorbent assay'
ER	Östrogenrezeptor
EST	Expressed sequence tag
et al.	und andere
FACS	‚Fluorescence Activated Cell Sorting', Durchflusszytometrie
FKS	Fötales Kälberserum
x g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	‚Green Fluorescence Protein'
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N`-[2-ethansulfonsäure]
Ig	Immunglobulin
IRES	‚Internal Ribosome Entry Site'
IVT	*in vitro* Transkription
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
KLH	‚Keyhole Limpet Hemocyanin'
µg	Mikrogramm

µl	Mikroliter
M	Molar
mA	Milliampere
MEM	‚Minimal Essential Medium'
MES	2-(Morpholin)-ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOPS	Morpholinopropanschwefelsäure
mRNS	‚messanger' (Boten) -RNS
MTE	‚Multiple Tissue Expression Array'
MW	Molekulargewicht
Neo	Neomycinphosphotransferase
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
ORF	‚open reading frame', offener Leserahmen
p	Kurzer Arm eines Chromosoms
^{32}P	Radioaktiver Phosphor
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	‚Phosphate Buffered Saline', Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PK	Positivkontrolle
pmol	Picomol
PNS	peripheres Nervensystem
POD	Peroxidase
PR	Progesteronrezeptor
q	Langer Arm eines Chromosoms
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Zitrat-gepufferte Kochsalzlösung
Std.	Stunden
SV40	Simianvirus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase
TEMED	N,N,N´,N´,-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
U	‚Unit', Enzymaktivitätseinheit
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ÜN	über Nacht

UTR	‚untranslated region', untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
V	Volt
V/v	Volumen pro Volumenanteil
W/v	Gewicht pro Volumenanteil
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

2. Tabelle hochregulierter bekannter Gene

Tabelle 7: Bekannte hochregulierte Gene in der metastasierenden Pankreastumorzelllinie SUIT-2 007. Die ‚Average Difference Change' und ‚Fold Change' sind im Material und Methoden-Teil näher erklärt. Die Accession-Nummer bezieht sich auf die Datenbank Medline. Die differentielle Expression der 10 grau unterlegten Gene wurde mittels Northern-Blot-Analyse verifiziert.

Accession-Nummer	SUIT-2 007		Exprimiert in SUIT-2 028 Ja (J) Nein (N)	Gen
	Average Difference Change	Fold Change		
Immunantwort				
AF004320	6634	11,6	J	monocyte/macrophage Ig-related receptor MIR-7 (MIR cl-7)
X15606	2818	2,7	J	ICAM-2, cell adhesion ligand for LFA-1
D84239	1091	3,2	N	IgG Fc binding protein
L11245	653	8,2	N	C4b-binding protein beta-chain
Proteasen/Inhibitoren				
M13509	25765	88,8	J	skin collagenase
J05257	4665	3,5	N	microsomal dipeptidase (MDP)
D87258	4227	3,8	J	serine protease with IGF-binding motif
Y07921	3677	5,4	J	serine protease
U56387	1151	3,5	J	PC6A protease (hPC6)
Koagulation/Angiogenese				
U04313	6988	11,4	J	maspin
L35545	5589	3,8	J	endothelial cell protein C/APC receptor (EPCR)
AB000220	3137	6,5	J	semaphorin E
AF016098	2869	3,7	J	vascular endothelial cell growth factor 165 receptor 2 (VEGF165R2)
X55740	1141	2,5	J	placental tissue factor
J02973	960	11,4	N	thrombomodulin gene
M16967	474	6,3	N	coagulation factor V
Adhäsion				
AB006781	7198	56,3	N	galectin-4
D32039	3748	3,9	J	pgH3 mRNA for proteoglycan PG-M(V3)
M25322	3459	29,8	N	granule membrane protein-140
M34064	237	3,6	J	N-cadherin
Zytoskelett				
Z19554	33058	25,2	J	vimentin gene
U03057	15780	7,2	J	actin bundling protein (HSN)
J00312	9657	3,2	J	non-muscle (fibroblast) tropomyosin gene
X06956	8720	2,7	J	HALPHA44 gene for alpha-tubulin
M12125	7655	3,0	J	fibroblast muscle-type tropomyosin
U83867	4411	3,0	J	alpha II spectrin
AF015926	4003	4,6	J	ezrin-radixin-moesin binding phosphoprotein-50
M94345	3853	4,3	J	macrophage capping protein
X06825	1909	22,2	N	skeletal beta-tropomyosin
X69086	1375	7,2	J	utrophin

Transkription				
M69039	10386	2,6	J	pre-mRNA splicing factor SF2p32
L13463	4840	2,8	J	helix-loop-helix basic phosphoprotein (G0S8)
X13482	4479			mRNA for U2 snRNP-specific A' protein (Splicing factor)
AF026402	3675	3,1	J	U5 snRNP 100 kD protein
D38073	3599	4,4	J	hRIf beta subunit (p102 protein)
L23959	3577	3,4	J	E2F-related transcription factor (DP-1)
U07559	3234	3,1	J	ISL-1 (Islet-1)
AF045451	2549	4,2	J	transcriptional regulatory protein p54
U63824	2457	2,8	J	transcription factor RTEF-1 (RTEF1)
AF129507	1525	5,3	J	transcription factor ICBP90 (ICBP90)
AF075587	1475	2,7	J	protein associated with Myc
Z35278	1052	10,5	J	PEBP2aC1 acute myeloid leukaemia
U19969	1013	11,6	N	two-handed zinc finger protein ZEB
AF008442	1009	2,9	J	RNA polymerase I subunit hRPA39
D13891	981	2,8	J	Id-2H
AF018253	482	6,1	N	receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK)
Zellzyklus/Apoptose/Differenzierung				
M62402	11131	4,3	J	insulin-like growth factor binding protein 6 (IGFBP6)
AJ001902	7449	23	J	TRIP6 (thyroid receptor interacting protein)
U34842	5677	3,3	J	bone morphogenetic protein-4 (hBMP-4) gene
M15796	4248	2,9	J	cyclin protein gene
M22490	3700	3,2	J	bone morphogenetic protein-2B (BMP-2B)
L36463	2577	2,9	N	ras interactor (RIN1)
AF096160	2567	5,1	J	protein phosphatase 2A BR gamma subunit
X06374	2345	6,8	J	platelet-derived growth factor PDGF-A
X99656	2171	3,1	J	protein containing SH3 domain, SH3GL1
X98263	1909	2,6	J	M-phase phosphoprotein
S79639	1494	3,4	J	EXT1 putative tumour suppressor/hereditary multiple exostoses candidate gene
X74794	1465	4,8	J	P1-Cdc21
X74795	1464	2,7	J	P1-Cdc46
AF091433	1029	11,2	J	cyclin E2
U10991	1010	12,1	J	G2 protein
Rezeptoren				
X01060	14819	3,4	J	transferrin receptor
U59185	4562	46,5	J	putative monocarboxylate transporter (MCT)
M32315	4277	5,1	J	tumor necrosis factor receptor
AF130988	3763	10,7	J	ectodysplasin-A receptor protein (EDAR)
Z77777	3201	24,9	J	vasoactive intestial peptide receptor (VIP receptor)
D89974	2873	3,5	J	glycosylphosphatidyl inositol-anchored protein GPI-80
Y15227	2510	2,8	J	leukemia virus receptor 1 (GLVR1)
U07225	2017	16,9	J	P2U nucleotide receptor
X78338	1593	3,3	J	Synthetic adenovirus transformed Human retina cell line, MRP
U40434	1544	6,5	N	mesothelin or CAK1 antigen precursor
AF027204	1527	3,0	J	putative tetraspan transmembrane protein L6H (TM4SF5)
U21936	1229	7,6	J	peptide transporter (HPEPT1)
D86407	1191	8,0	J	DNA for apoER2
L22214	874	10,6	N	adenosine A1 receptor (ADORA1)

Z75190	722	6,1	N	apolipoprotein E receptor 2
AF007216	399	3,0	N	sodium bicarbonate cotransporter (HNBC1)
Signaltransduktion				
AF114494	4402	9,7	J	Human putative tyrosine phosphatase (PTPLA)
L08488	4139	3,2	J	inositol polyphosphate 1-phosphatase
AF169034	4095	6,4	J	protein kinase (SGK2alpha)
U81607	2315	12,1	J	gravin
M35416	2249	3,5	J	GTP-binding protein (RALB)
M34181	1923	2,5	J	testis-specific cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit (C-beta isoform)
Y08890	1828	3,2	J	Ran_GTP binding protein 5
L15388	1562	16,5	J	G-protein-coupled receptor kinase (GRK5)
S76965	1468	7,4	N	protein kinase inhibitor
Enzyme				
M64231	11449	3,5	J	spermidine synthase gene
M57951	8501	4,8	J	bilirubin UDP-glucuronosyltransferase isozyme 2
AAC83205.1	7008	10,7	J	(mouse) lysyl oxidase-related protein 2
M12963	6848	77,9	N	class I alcohol dehydrogenase (ADH1) alpha subunit
M12272	6521	72,8	N	alcohol dehydrogenase class I gamma subunit (ADH3)
U46689	4721	6,7	J	microsomal aldehyde dehydrogenase (ALD10)
U37100	4458	8,2	J	aldose reductase-like peptide
X90858	4453	5,5	J	uridine phosphorylase
X00737	4149	3,6	J	for purine nucleoside phosphorylase (PNP)
J04031	4037	2,8	J	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase
M69177	3452	12	J	monoamine oxidase B (MAOB)
X55740	3186	4,0	J	placental cDNA coding for 5'nucleotidase
U07424	3073	2,8	J	putative tRNA synthetase-like protein
X52142	2883	4,0	J	CTP synthetase
M74542	2623	15,2	N	aldehyde dehydrogenase type III (ALDHIII)
D78586	2513	2,8	J	multifunctional protein CAD
D83702	2277	2,9	J	photolyase
AF037335	1775	2,7	J	carbonic anhydrase precursor (CA 12)
U51166	1680	2,9	J	G/T mismatch-specific thymine DNA glycosylase
M11810	1351	3,1	J	(2-5) oligo A synthetase induced by interferon
U20938	1154	16,7	N	lymphocyte dihydropyrimidine dehydrogenase
AF008442	1009	2,9	J	RNA polymerase I subunit hRPA39
AJ006268	874	6,9	J	putative ATPase
D88667	573	5,3	N	cerebroside sulfotransferase
Sonstige				
U96131	4689	2,6	J	HPV16 E1 protein binding protein
AB020315	4550	3,4	J	Dickkopf-1 (hdkk-1) gene
AF132495	4202			glutaredoxin-2 (GRX2)
X79865	3802	2,6	J	Mrp17
D78335	3757	2,6	J	mRNA for 5'-terminal region of UMK
M30269	2948	3,0	J	nidogen
M94856	2685	3,9	J	fatty acid binding protein homologue (PA-FABP)
Y15227	2510	3,7	J	leukemia associated gene 1

D84109	2162	2,5	J	RBP-MS/type 3
AB006755	2082	2,9	J	PCDH7 (BH-Pcdh)a
L35240	1685	2,9	J	enigma gene
AB000449	1667	3,4	J	VRK1
M32886	1547	3,2	J	sorcin CP-22
D86640	1456	3,2	J	stac
U77914	1252	4,8	J	soluble protein Jagged
U17566	991	3,0	J	65 kDa hydrophobic protein
AJ006778	825	2,5	J	DRIM protein
AF037066	613	5,1	N	ORCTL2S hypothetical protein (ORCTL2S)
AB007448	361	4,2	J	OCTN1

3. Tabelle herunterregulierter bekannter Gene

Tabelle 8: Bekannte herunterregulierte Gene in der metastasierenden Pankreastumor-zelllinie SUIT-2 007. Die ‚Average Difference Change' und ‚Fold Change' sind im Material und Methoden-Teil näher erklärt. Die Accession-Nummer bezieht sich auf die Datenbank Medline. Die differentielle Expression der 5 grau unterlegten Gene wurde mittels Northern-Blot-Analyse verifiziert.

Accession-Nummer	SUIT-2 007		Gen
	Average Difference Change	Fold Change	
Immunantwort			
J00194	-6788	-4.9	hla-dr antigen alpha-chain mRNA
X00457	-3529	-40.2	mRNA for SB classII histocompatibility antigen alpha-chain
U02020	-2172	-2.7	pre-B-cell enhancing factor (PBEF) mRNA
M32578	-1887	-4.0	MHC class II HLA-DR beta-1 mRNA
M83664	-1315	-15.0	MHC class II lymphocyte antigen (HLA-DP) beta chain mRNA
M81141	-1251	-15.0	MHC class II HLA-DQ-beta
K01506	-1140	-40.2	mRNA for SB classII histocompatibility antigen alpha-chain
Proteasen/Inhibitoren			
X16832	-11246	-3.5	mRNA for cathepsin H
U14394	-3820	-9.6	tissue inhibitor of metalloproteases-3 mRNA
Koagulation/Angiogenese			
L12350	-2 031	-3.7	thrombospondin 2 (THBS2) mRNA
Adhäsion			
J05581	-5653	-36.6	polymorphic epithelial mucin (PEM) mRNA
X68742	-4481	-26.4	mRNA for integrin, alpha subunit
J05582	-3792	-13.9	pancreatic mucin mRNA
Zytoskelett			
AJ011712	-3949	-36.1	sapiens TNNT1 (troponin) gene
AAC27079.1	-3497	-8,2	claudin-2
X90780	-667	-8.0	TNNI3 (troponin) gene
Transkription			
X52560	-9532	-3.0	gene for nuclear factor NF-IL6
U22431	-6261	-2.1	hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) mRNA
L19779	-4638	-5.0	histone H2A.2 mRNA
AB002803	-4515	-2.3	BACH1 mRNA
X70683	-3413	-2.2	mRNA for SOX-4 protein
L07648	-2996	-8.7	MXI1 mRNA
U90551	-2337	-5.6	histone 2A-like protein (H2A/l) mRNA
L19872	-1438	-2.9	AH-receptor mRNA
U00115	-1429	-2.4	zinc-finger protein (bcl-6) mRNA
AF019214	-1357	-2.9	HMG box containing protein 1 mRNA
D31716	-567	-5.3	mRNA for GC box bindig protein
Zellzyklus/Apoptose/Differenzierung			

M23379	-13474	-4.7	GTPase-activating protein ras p21 (RASA) mRNA
M30704	-9415	-2.8	amphiregulin (AR) mRNA
AB000584	-4515	-2.4	mRNA for TGF-beta superfamily protein
X61123	-3744	-3.5	BTG1 mRNA
X85750	-3638	-12.4	mRNA for transcript associated with monocyte to macrophage differentiation
M34309	-2563	-2.8	epidermal growth factor receptor (HER3) mRNA
AF002697	-2267	-2.6	E1B 19K/Bcl-2-binding protein Nip3 mRNA
AF029729	-1823	-2.2	neuralized mRNA
U97669	-1670	-19.4	Notch3 mRNA
U47414	-1370	-4.0	cyclin G2 mRNA
AB017365	-1121	-8.4	mRNA for frizzled-7
U70312	-951	-13,3	integrin binding protein Del-1 (Del1)
AF053712	-923	-11.3	osteoprotegerin ligand mRNA
Rezeptoren			
J05068	-11683	-47.5	transcobalamin I
U53347	-6589	-2.0	neutral amino acid transporter B mRNA
U36336	-2336	-2.8	lysosome-associated membrane protein-2b (LAMP2) mRNA
U79745	-2256	-10.1	monocarboxylate transporter homologue MCT6 mRNA
U31449	-1367	-10.3	intestinal and liver tetraspan membrane protein (il-TMP) mRNA
Signaltransduktion			
U27768	-3429	-7.2	RGP4 mRNA
U96922	-2748	-3.0	inositol polyphosphate 4-phosphatase type II-alpha mRNA
Enzyme			
U08021	-2 0480	-181.4	nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) mRNA
X94754	-10943	-2.8	mRNA for Yeast methionyl-tRNA synthetase homologue
D50840	-6760	-4.1	mRNA for ceramide glucosyltransferase
M27396	-6649	-2.2	asparagine synthetase mRNA
U23143	-6644	-3.0	mitochondrial serine hydroxymethyltransferase gene,
X92720	-3432	-2.2	mRNA for phosphoenolpyruvate carboxykinase
Z11559	-3149	-2.1	mRNA for iron regulatory factor
U84573	-3091	-2.0	lysyl hydroxylase isoform 2 (PLOD2) mRNA
M29877	-2633	-3.1	alpha-L-fucosidase
M68840	-2142	-6.3	monoamine oxidase A (MAOA) mRNA
U72936	-2 073	-2.1	putative DNA dependent ATPase and helicase (ATRX) mRNA
BAA89247.1	-1257	-15,4	heparan sulfate 6-sulfotransferase 2
L33881	-1200	-2.2	protein kinase C iota isoform
AF102542	-1116	-5,5	beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase
S52028	-466	-4.9	cystathionine gamma-lyase
Sonstige			
S73591	-9168	-2.4	brain-expressed HHCPA78 homolog VDUP1 mRNA
AF000152	-4659	-2.0	OS-4 protein (OS-4) mRNA
AJ002030	-3690	-3.8	mRNA for putative progesterone binding protein
AF044311	-3209	-23.0	gamma-synuclein gene
U94592	-2982	-6.0	uncoupling protein homolog (UCPH) mRNA
D87953	-2693	-2.6	mRNA for RTP
X77196	-1429	-3.0	mRNA for lysosome-associated membrane protein-2
U42349	-1217	-2.5	N33 mRNA
AAA42064.1	-938	-11,4	salivary proline-rich protein

4. Tabelle hochregulierter ESTs

Tabelle 9: In der metastasierenden Pankreastumorzelllinie SUIT-2 007 hochregulierte ESTs. Die ‚Fold Change' ist im Material und Methoden-Teil näher erklärt. Die Accession-Nummer (AC) bezieht sich auf die Datenbank Medline. Die Buchstaben in der Spalte ‚Nr.' stehen für die Bezeichnung des entsprechenden Chips des HG-U95B,C,D,E-Sets. Die pankreas-spezifische Verteilung bedeutet, dass in x von 24 Proben des Pankreas die mRNS nachgewiesen wurde. Die differentielle Expression der grau unterlegten ESTs wurde mittels Northern-Blot-Analysen überprüft.

Nr.	AC	Fold Change	Ursprung	Beschreibung	Pankreas-spezifische Verteilung	Funktion
B1	AA044830	98.7	Soares pregnant uterus Homo sap. cDNA clone	978403.6 Incyte Unique	1/24	-
B2	W73842	16.7	Soares fetal heart Homo sapiens cDNA clone IMAGE:344069 5'	U20938 Human lymphocyte dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA	1/24	Enzym
B3	AA131626	13.9	Soares pregnant uterus Homo sapiens cDNA clone IMAGE:503701 5'	CAB40552.1 p210 protein	1/24	Membran-protein
B4	AW001066	11.6	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2495174 3'	AB033061 Human mRNA for KIAA1235 protein	0/24	-
B5	AI659436	10.7	NCI_CGAP_Pr28 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2252560 3'	AF130988 Human ectodysplasin-A receptor protein (EDAR) mRNA	0/24	Rezeptor
B6	AA191718	9.9	Stratagene HeLa cells Homo sapiens cDNA clone IMAGE:626752 3'	AB033061 Human mRNA for KIAA1235 protein	0/24	-
B7	T79945	9.7	Soares fetal liver spleen Homo sapiens cDNA clone IMAGE:115012 3'	AF114494 Human putative tyrosine phosphatase (PTPLA) mRNA	0/24	Intra-zelluläre Signal-trans-duktion
B8	AF063527	9.3	Homo sapiens library (Yu Y) Homo sapiens cDNA clone HA0083	AK000841 Human cDNA FLJ20834 fis, clone ADKA02953	6/24	-
B9	AI970797	9.0	NCI_CGAP_Pr22 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2482033 3'	AF114494 Human putative tyrosine phosphatase (PTPLA) mRNA	0/24	Intra-zelluläre Signal-trans-duktion
B10	AA625198	8.7	Soares Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1047384 5'	215283.5 Incyte Unique	0/24	-
B11	C14031	8.4	Human fetal brain cDNA 3'-end	AB032996 Human mRNA for KIAA1170 protein	0/24	-
B12	AA135720	7.8	Soares pregnant uterus Homo sapiens cDNA clone IMAGE:501591 3'	AAF55584.1 CG7709 gene product	2/24	-
B13	AI131052	7.8	Soares fetal heart Homo sap. cDNA clone IMAGE:1706659 3'	AB040905 Human mRNA for KIAA1472 protein	0/24	-
B14	AI800576	7.3	Soares Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2364843 3'	AF195765 Human L2DTL protein (L2DTL) mRNA	1/24	-
B15	AL046946	7.2	Homo sapiens mRNA ; DKFZp586J1217_s1	X69086 Human mRNA for utrophin	2/24	Zytoskelett

B16	AA776720	7.2	Soares_testis_NHT Homo sapiens cDNA clone 1292853 3'	333338.2 Incyte Unique	0/24	-
B17	AA452295	6.9	Soares total fetus Homo sapiens cDNA clone IMAGE:787986 5'	231160.1 Incyte	0/24	-
B18	AI093702	6.8	Soares_NhHMPu_S1 Homo sap. cDNA clone IMAGE:1688385 3'	AL163259 Human genomic DNA, chromosome 21q	1/24	-
B19	N70077	6.5	Soares fetal lung Homo sapiens cDNA clone IMAGE:297938 3'	AK001295 Human cDNA FLJ10433 fis, clone NT2RP1000478	1/24	Zellzyklus
B20	AA130958	6.4	Stratagene colon (#937204) Homo sapiens cDNA clone IMAGE:586929 3'	AF169034 Human protein kinase (SGK2alpha) mRNA, alternatively spliced	1/24	Intra-zelluläre Signal-trans-duktion
B21	N45214	5.9	Soares multiple sclerosis Homo sapiens cDNA clone IMAGE:283073 3'	983462.1 Incyte Unique	0/24	-
B22	AA887118	5.6	Homo sap. cDNA clone IMAGE:1476418 3'	AF132495 Human glutaredoxin-2 mRNA	2/24	Elektronen-transfer
B23	AA625519	5.5	Soares Homo sap. cDNA clone IMAGE:1047598 5'	AF113020 Human clone FLB9138 mRNA	4/24	-
B24	AI972848	5.4	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2490537 3'	Y07921 Human mRNA for serine protease	5/24	Protease
B25	N30008	5.3	Soares melanocyte Homo sapiens cDNA clone IMAGE:268262 3'	CAA78398.1 Pistil extensin like protein	0/24	Struktur-protein
B26	AI669212	5.1	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2315058 3'	AF096160 Human protein phosphatase 2A BR gamma subunit gene	0/24	Zellzyklus
B27	W02617	4.8	Soares fetal liver spleen Homo sapiens cDNA clone IMAGE:296140 5'	BAA87047.1 C184M protein	3/24	-
B28	AI819929	4.6	NCI_CGAP_Kid12 Homo sap. cDNA clone IMAGE:2402512 3'	AK001556 Human cDNA FLJ10694 fis, clone NT2RP3000397	5/24	Splicing faktor
B29	AA121663	4.5	Stratagene lung carcinoma 937218 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:564389 5'	CAA84230.1 extensin-like protein	0/24	Differen-zierung
B30	AA059377	4.3	Soares retina N2b4HR Homo sapiens cDNA clone IMAGE:381864 3'	AK000660 Human cDNA FLJ20653 fis, clone KAT01739	5/24	-
C1	AA166620	10.7	Stratagene ovarian cancer (#937219) Homo sapiens cDNA clone IMAGE:593703 3'	AAC83205.1 (mouse) lysyl oxidase-related protein 2	1/24	Enzym
C2	AA526079	10.2	NCI_CGAP_Pr21 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:984483 3'	AF233349 Human neuronal phosphoprotein DARPP-32 mRNA	1/24	-
C3	H11333	8.1	Soares infant brain Homo sapiens cDNA clone IMAGE:47841 3'	205457.7 Incyte Unique	0/24	-
C4	AA494131	7.2	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:901159 3'	AF052183 Human clone 24804 mRNA	7/24	-
C5	AI357639	6.7	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2012049 3'	221395.1 Incyte Unique	0/24	-
C6	AI656481	6.6	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2244296 3'	196199.1 Incyte Unique	0/24	-

C7	AA026429	5.3	Soares_fetal_heart_NbHH19W Homo sapiens cDNA clone IMAGE:366414 5'	AF129507 Human transcription factor ICBP90 (ICBP90) mRNA	2/24	Trans-kription
C8	AA156906	5.1	Soares pregnant uterus Homo sapiens cDNA clone IMAGE:502445 5'	475309.1 Incyte Unique	3/24	-
C9	AI421474	5.1	NCI_CGAP_Brn23 Homo sap. cDNA clone IMAGE:2096760 3'	AB002336 Human mRNA for KIAA0338 gene	1/24	-
C10	AA469071	4.9	NCI_CGAP_Co3 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:881517 3'	AK000747 Human cDNA FLJ20740 fis, clone HEP07118	2/24	-
C11	AA781184	4.6	Soares testis Homo sapiens cDNA clone 1391270 3'	BAA91715.1 unnamed protein product	0/24	
C12	AI446414	4.0	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2141155 3'	482309.3 Incyte Unique	1/24	-
C13	AA150254	3.9	Soares pregnant uterus Homo sapiens cDNA clone IMAGE:491644 5'	AK000140 Human cDNA FLJ20133 fis, clone COL06539	0/24	-
C14	N46649	3.7	Soares_multiple_sclerosis_2NbHMSP Homo sapiens cDNA clone IMAGE:276814 5'	AF016098 Human vascular endothelial cell growth factor 165 receptor 2 (VEGF165R2) mRNA	1/24	Rezeptor
C15	AA234919	3.7	Soares_NhHMPu_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:669562 5'	AL163260 Human genomic DNA, chromosome 21q	0/24	-
C16	AA995447	3.6	NCI_CGAP_GC2 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1612075 3'	AF126164 Human alternative HHLA3 protein (HHLA3) mRNA	0/24	-
C17	N36885	3.4	Soares melanocyte Homo sapiens cDNA clone IMAGE:273443 3'	AK000092 Human cDNA FLJ20085 fis, clone COL03604	1/24	-
C18	AL042830	3.3	Homo sapiens mRNA; EST DKFZp434G1222_r1	1387585.1 Incyte Unique	2/24	-
C19	AI983784	3.0	Soares Dieckgraefe colon Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2520573 3'	AL110227 Human mRNA; cDNA DKFZp434J194	3/24	-
C20	AA775865	3.0	Soares_NbHFB Homo sapiens cDNA clone IMAGE:878550 3'	AB033018 Human mRNA for KIAA1192 protein	3/24	-
D1	AI982870	34.1	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2559433 3'	Z19554 Human vimentin gene	5/24	Zytoskelett
D2	W87446	20.0	Soares fetal liver spleen Homo sapiens cDNA clone IMAGE:416903 3'	CAB79833.1 putative protein	1/24	-
D3	AW007343	5.8	NCI_CGAP_Brn25 Homo sap. cDNA clone IMAGE:2500715 3'	U90913 Human clone 23665 mRNA sequence	3/24	-
D4	AW008020	5.5	NCI_CGAP_Gas4 Homo sap. cDNA clone IMAGE:2532785 3'	AK001170 Human cDNA FLJ10308 fis, clone NT2RM2000260	0/24	-
D5	AI675101	4.3	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2316017 3'	364482.4 Incyte Unique	0/24	-
D6	AI695001	4.3	NCI_CGAP_Lu24 Homo sap. cDNA clone IMAGE:2344036 3'	M94345 Human macrophage capping protein mRNA	3/24	Zytoskelett
D7	AI739473	3.7	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2390192 3'	D13643 Human mRNA for KIAA0018 protein	3/24	-

D8	AW015777	3.6	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2711356 3'	AK001387 Human cDNA FLJ10525 fis, clone NT2RP2000892	3/24	-
D9	AW016563	3.5	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2712044 3'	AF077044 Human RNA polymerase I 16 kDa subunit mRNA	3/24	Zytoskelett
D10	AW015934	3.3	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2711703 3'	AL163293 Human genomic DNA, chromosome 21q	1/24	-
D11	AI979335	3.2	NCI_CGAP_GC6 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2515928 3'	J00312 Human non-muscle (fibroblast) tropomyosin gene	7/24	Enzym
D12	AW007508	3.2	NCI_CGAP_GC6 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2515928 3'	U76713 Human apobec-1 binding protein 1 mRNA	0/24	-
D13	AI351790	3.0	NCI_CGAP_GC4 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1947078 3'	X13482 Human mRNA for U2 snRNP-specific A' protein	1/24	Splicing faktor
D14	AA112121	3.0	Stratagene fibroblast Homo sapiens cDNA clone IMAGE:530383 3'	AB043104 Human mRNA for Nop10p	0/24	-
D15	AW024107	3.0	NCI_CGAP_GC6 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2524642 3'	U83867 Human alpha II spectrin mRNA	7/24	Zytoskelett
E1	AI038014	19.5	Soares total fetus Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1657762 3'	AAF01257.1 coxsackie-adenovirus-receptor homolog	0/24	-
E2	AI656044	13.5	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2243487 3'	431774.1 Incyte Unique	0/24	-
E3	AF121164	13.1	Homo sapiens liver (Chang L-Y) Homo sap. cDNA clone PFGTG1-2	25074.1 Incyte Unique	0/24	-
E4	AI962640	11.2	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2475124 3'	1398955.2 Incyte Unique	1/24	-
E5	AA639753	9.0	Homo sap. cDNA clone IMAGE:1158838 3'	I 977936.10 ncyte Unique	0/24	-
E6	R60139	8.9	Soares infant brain 1NIB Homo sap. cDNA clone IMAGE:42809 3'	201913.1 Incyte Unique	0/24	-
E7	AI631895	6.2	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2300273 3'	159724.1 Incyte Unique	0/24	-
E8	AI654835	5.3	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2309575 3'	987465.1 Incyte Unique	0/24	-
E9	AI652706	5.2	NCI_CGAP_GC6 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2307236 3'	AF125098 Human HSPC037 protein mRNA	0/24	-
E10	AI188089	5.1	Soares_testis_NHT Homo sap. cDNA clone IMAGE:1734331 3'	CAB70912.1 hypothetical protein	3/24	-
E11	AA621983	4.5	NCI_CGAP_Co10 Homo sap. cDNA clone IMAGE:1144805 3'	AJ223366 Human mRNA for OCIM (Oncogene in Multiple Myeloma) protein	1/24	Differen-zierung
E12	AW022355	4.1	Morton Fetal Cochlea Homo sap. cDNA clone IMAGE:2485672 5'	Y08890 Human mRNA for Ran_GTP binding protein 5	7/24	-
E13	AA612864	4.1	NCI_CGAP_Co10 Homo sap. cDNA clone IMAGE:1145187 3'	AL163202 Human chromosome 21 segment HS21C002	0/24	Trans-kriptions-faktor
E14	AI870624	4.0	NCI_CGAP_Brn25 Homo sap. cDNA clone IMAGE:2430763 3'	AL096723 Human mRNA; cDNA DKFZp564H2023	2/24	-
E15	AW006485	4.0	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2506572 3'	J04456 Human 14 kd lectin mRNA	8/24	Adhäsion

E16	AI701483	4.0	NCI_CGAP_Lu24 Homo sap. cDNA clone IMAGE:2343106 3'	AL117477 Human mRNA; cDNA DKFZp727G051	1/24	-
E17	AW026512	3.7	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2529515 3'	M69040 Human SF2p33 mRNA	5/24	Splicing faktor

5. Tabelle herunterregulierter ESTs

Tabelle 10: In der metastasierenden Pankreastumorzelllinie SUIT-2 007 herunterregulierte ESTs. Die ‚Fold Change' ist im Material und Methoden-Teil näher erklärt. Die Accession-Nummer (AC) bezieht sich auf Medline. Die Buchstaben in der Spalte ‚Nr.' stehen für die Bezeichnung des entsprechenden Chips des HG-U95B,C,D,E-Sets. Die pankreas-spezifische Verteilung bedeutet, dass in x von 24 Proben des Pankreas die mRNS nachgewiesen wurde. Die differentielle Expression der grau unterlegten ESTs wurde mittels Northern-Blot-Analysen überprüft.

Nr.	AC	Fold Change	Ursprung	Beschreibung	Pankreas-spezifische Verteilung	Funktion
B1	AA458524	-26.1	Soares ovary tumor Homo sapiens cDNA clone IMAGE:811581 5'	AL117662 Human mRNA; cDNA DKFZp586K0524	2/24	-
B2	N62126	-25.4	Soares multiple sclerosis Homo sapiens cDNA clone IMAGE:287577 3'	BAA96052.1 KIAA1528 protein	2/24	-
B3	T89094	-23.6	Soares infant brain Homo sapiens cDNA clone IMAGE:22355 3'	U27768 Human RGP4 mRNA	1/24	Intra-zelluläre Signal-trans-duktion
B4	AI767756	-15.4	NCI_CGAP_Kid11 Homo sap. cDNA clone IMAGE:2383121 3'	BAA89247.1 heparan sulfate 6-sulfotransferase 2	0/24	Enzym
B5	C16443	-15.2	Human aorta cDNA 5'-end GEN-321F12	AAD54512.1 supported by human EST AA331940	1/24	-
B6	AA633240	-14.2	NCI_CGAP_Co9 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1148003 3'	AB037780 Human mRNA for KIAA1359 protein	2/24	-
B7	AI625959	-14.1	Barstead colon Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2172988 3'	21902.2 Incyte Unique	1/24	-
B8	AL079983	-11.9	EST DKFZp586N1218_r1	X68742 Human mRNA for integrin, alpha subunit	5/24	Adhäsion
B9	AI949781	-11.8	NCI_CGAP_Kid12 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2470211 3'	U02019 Human AU-rich element RNA-binding protein AUF1 mRNA	5/24	-
B10	AA044844	-11.6	Soares pregnant uterus Homo sapiens cDNA clone IMAGE:488589 5'	AF231121 Human iron-regulated transporter IREG1 (IREG1) mRNA	6/24	Transporter
B11	AI075039	-11.1	Homo sap. cDNA clone IMAGE:1637209 3'	243946.1 Incyte Unique	0/24	-
B12	W55852	-9.3	Soares melanocyte Homo sapiens cDNA clone IMAGE:292102 5'	D86996 Human Ig lambda gene locus DNA, clone:23F1	1/24	Immunity and defense
B13	AW015998	-8.2	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2712025 3'	AAC27079.1 claudin-2	1/24	Membran-protein
B14	AI139548	-8.2	Soares pregnant uterus Homo sap. cDNA clone IMAGE:1713286 3'	234087.1 Incyte Unique	0/24	-

B15	AW006504	-8.1	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2506592 3'	AAC27079.1 claudin-2	1/24	Membran-protein
B16	N59856	-7.6	Soares multiple sclerosis Homo sapiens cDNA clone IMAGE:284756 3'	446775.1 Incyte Unique	0/24	-
B17	AI148745	-7.4	Soares placenta Homo sap. cDNA clone IMAGE:1714876 3'	898430.2 Incyte Unique	1/24	-
B18	N47315	-6.9	Soares multiple sclerosis Homo sapiens cDNA clone IMAGE:280511 3'	AB037800 Human mRNA for KIAA1379 protein	0/24	-
B19	AA618602	-5.6	NCI_CGAP_Lu1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1118638 3'	AK000507 Human cDNA FLJ20500 fis, clone KAT09159	3/24	-
B20	AI376944	-5.2	Soares total fetus Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2066483 3'	AK002058 Human cDNA FLJ11196 fis, clone PLACE1007688	1/24	-
B21	AI147256	-5.2	Soares pregnant uterus Homo sap. cDNA clone IMAGE:1698405 3'	983657.1 Incyte Unique	1/24	-
B22	AI697679	-4.8	NCI_CGAP_Lu24 Homo sap. cDNA clone IMAGE:2341235 3'	AB037762 Human mRNA for KIAA1341 protein	1/24	-
B23	AA400080	-4.6	Soares_testis_NHT Homo sapiens cDNA clone IMAGE:742596 3'	216457.1 Incyte Unique	0/24	-
B24	AI738919	-4.4	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2389998 3'	AAC40076.1 LNXp70	4/24	-
B25	H98105	-4.4	Soares melanocyte Homo sapiens cDNA clone IMAGE:261211 3'	AB030001 Human gene for SGRF	1/24	-
B26	AA165313	-4.3	Stratagene ovarian cancer (#937219) Homo sapiens cDNA clone IMAGE:594693 3'	Z59458 Human CpG island DNA genomic Mse1 fragment, clone 156c9	0/24	-
B27	AW024527	-4.1	NCI_CGAP_Kid3 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2528605 3'	AF230904 Human c-Cbl-interacting protein (CIN85) mRNA	2/24	-
B28	W85913	-3.9	Soares fetal liver spleen Homo sapiens cDNA clone IMAGE:415696 3'	AAC78802.1 insulin receptor substrate like protein	0/24	-
B29	AA151651	-3.4	Soares pregnant uterus Homo sapiens cDNA clone IMAGE:503263 3'	AF151885 Human CGI-127 protein mRNA	3/24	-
B30	AI290991	-3.3	NCI_CGAP_Lu5 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1881338 3'	AP000506 Human genomic DNA, chromosome 6p21.3, HLA Class I region	1/24	Immunity and defense
B31	T84315	-3.3	Soares fetal liver spleen Homo sapiens cDNA clone IMAGE:111416 5'	AF187318 Human F-box protein Fbx2 mRNA	1/24	-
B32	W51773	-3.2	Soares senescent fibroblasts Homo sapiens cDNA clone IMAGE:325515 5'	AB037791 Human mRNA for KIAA1370 protein	0/24	-
B33	AA946755	-3.0	Homo sap. cDNA clone IMAGE:1589759 3'	AL132665 cDNA DKFZp566E034	2/24	-
B34	H81554	-3.0	Weizmann Olfactory Epithelium Homo sapiens cDNA clone IMAGE:238689 3'	AK000157 Human cDNA FLJ20150 fis, clone COL08263	1/24	-

B35	N52088	-3.0	Soares_multiple_sclerosis_2NbHMSP Homo sapiens cDNA clone IMAGE:282581 3'	AP000494 Human genomic DNA, chromosome 3p21.3, clone:301 to 308, anti-oncogene region	0/24	Differen-zierung
C1	AI056877	-15.8	Soares fetal liver spleen Homo sap. cDNA clone IMAGE:1674273 3'	BAA20840.1 KIAA0386	1/24	-
C2	W38021	-13.4	Soares parathyroid tumor Homo sapiens cDNA clone IMAGE:322223 5'	AK000157 Human cDNA FLJ20150 fis, clone COL08263	1/24	-
C3	AL047586	-13.3	EST DKFZp586G1121_s1	U70312 Human integrin binding protein Del-1 (Del1) mRNA	1/24	Differen-zierung
C4	H84681	-11.8	Soares retina N2b4HR Homo sapiens cDNA clone IMAGE:219899 3'	AB029025 uman mRNA for KIAA1102 protein	0/24	-
C5	AI961431	-9.4	NCI_CGAP_Ut1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2508230 3'	AK002047 Human cDNA FLJ11185 fis, clone PLACE1007511,	2/24	Zytoskelett
C6	AI291126	-9.3	NCI_CGAP_Lu5 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1881915 3'	AF220189 Human uncharacterized hypothalamus protein HBEX2 mRNA	2/24	-
C7	AI982768	-7.3	Homo sap. cDNA clone IMAGE:2517100 3'	898430.10 Incyte Unique	0/24	-
C8	AI752682	-6.9	Normal Human Trabecular Bone Cells Homo sapiens cDNA clone NHTBC_cn18b08 random	AL137540 Human mRNA; cDNA DKFZp434O1519	1/24	-
C9	AI247103	-6.7	Homo sapiens cDNA IMAGE:2004990 3'	AAD01887.1 neuralized	3/24	Differen-zierung
C10	AI749525	-6.6	Barstead colon Homo sapiens cDNA IMAGE:2373484 3'	U21049 Human DD96 mRNA	3/24	-
C11	AI948574	-6.1	Homo sapiens cDNA IMAGE:2470537 3'	326048.1 Incyte Unique	0/24	-
C12	AI629041	-6.1	NCI_CGAP_Kid11 Homo sapiens cDNA IMAGE:2285350 3'	230539.1 Incyte Unique	0/24	-
C13	AA034458	-5.8	Soares fetal heart Homo sapiens cDNA IMAGE:364859 5'	AL137298 Human mRNA; cDNA DKFZp434N2116	0/24	-
C14	AI935353	-5.7	NCI_CGAP_Kid11 Homo sapiens cDNA IMAGE:2461847 3'	AF203815 Human alpha gene sequence	4/24	-
C15	AA651720	-4.7	NCI_CGAP_Pr22 Homo sapiens cDNA IMAGE:1188652 5'	201640.3 Incyte Unique	1/24	-
C16	AA186324	-4.5	Stratagene HeLa cell s3 937216 Homo sapiens cDNA IMAGE:626532 3'	AB033080 Human mRNA for KIAA1254 protein	6/24	-
C17	AA872415	-4.3	NCI_CGAP_Kid5 Homo sapiens cDNA IMAGE:1472765 3'	U21049 Human DD96 mRNA	3/24	-
C18	AA158597	-4.2	Stratagene pancreas (#937208) Homo sapiens cDNA IMAGE:590965 5'	S72487 orf1 5' to PD-ECGF/TP...orf2 5' to PD-ECGF/TP	1/24	Nukleotid Metabo-lismus
C19	AI571452	-4.1	NCI_CGAP_Pan1 Homo sapiens cDNA IMAGE:2222305 3'	AL137274 Human mRNA; cDNA DKFZp434J1114	12/24	-

C20	AI951932	-3.7	NCI_CGAP_Pit1 Homo sapiens cDNA IMAGE:2546048 3'	BAA92637.1 KIAA1399 protein	5/24	-
C21	AA910946	-3.3	NCI_CGAP_Kid3 Homo sapiens cDNA IMAGE:1520794 3'	AF020797 Human AP-mu chain family member mu1B (HSMU1B) mRNA	0/24	-
D1	AI744130	-8.6	NCI_CGAP_Pr28 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2317285 3'	AAA72341.1 No description found	0/24	-
D2	AI247408	-7.0	Soares_NFL_T_GBC_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1847646 3'	AL359055 Human mRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE 2344436	0/24	-
D3	AI864617	-5.7	Soares_NSF_F8_9W_OT_PA_P_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2371392 3'	95701.1 Incyte Unique	0/24	-
D4	AI421663	-5.2	NCI_CGAP_Brn23 Homo sap. cDNA clone IMAGE:2099056 3'	AF088886 Human cathepsin F precursor	0/24	-
D5	AA737831	-4.9	NCI_CGAP_GC3 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1256107 3'	28918.1 nIncyte Unique	0/24	-
E1	AA535031	-19.3	NCI_CGAP_Co3 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:926504 3'	Z58072 Human CpG island DNA genomic Mse1 fragment, clone 28f1	3/24	-
E2	AI979193	-13.1	NCI_CGAP_Ut1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2493173 3'	K01506 Human mRNA for SB classII histocompatibility antigen alpha-chain	0/24	Immunity and defense
E3	AI468969	-12.4	NCI_CGAP_Lym12 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2133280 3'	AP000514 Human genomic DNA, chromosome 6p21.3, HLA Class I region	0/24	Immunity and defense
E4	AI280876	-11.4	NCI_CGAP_Co8 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1872086 3'	AAA42064.1 salivary proline-rich protein	0/24	Extra-zelluläre Matrix
E5	AI276259	-6.3	Soares_NhHMPu_S1 Homo sap. cDNA clone IMAGE:1877213 3'	AAF58988.1 CG8073 gene product	0/24	-
E6	AA243868	-5.5	Soares_NhHMPu_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:668597 3'	199134.2 Incyte Unique	1/24	-

6. Klonierung der *UKW*-Sequenz

```
   1  GGTAGGAGGC AACCATGTGG TTCCAGCTGA ATTTTTTTTT TCCCTCTCTC

  51  TTTCTTCACT CCTTTTTCTT TCCAAACAGG GAAAAGTGTT CCACGAAGCG

 101  GTAGCGCCTT TCCGCCTCGC GTTTTCCTCC CTGACCCTGG TCCCGGCTCC

 151  CGTCCGGGCG CCAGCTGGTG GGGCGAGCGC CGGGAGCCCA TCTGCCCCCA

 201  GGGGCACGGG GCGCGGGGCC GGCTCCCGCC CGGCACATGG CTGCAGCCAC

 251  CTCGCGCGCA CCCCGAGGCG CCGCGCCCAG CTCGCCCGAG GTCCGTCGGA

 301  GGCGCCCGGC CGCCCCGGAG CCAAGCAGCA GCTGAGCGGG GAAGCGCCCG

 351  CGTCCGGGGA TCGGGATGTC CCTCCTCCTT CTCCTCTTGC TAGTTTCCTA
           UKW7-sense >>>>> >>>>>>>>>> >>>>>>
         UKW8-sense >>>>>>>> >>>>>>>>>>

 401  CTATGTTGGA ACCTTGGGGA CTCACACTGA GATCAAGAGA GTGGCAGAGG

 451  AAAAGGTCAC TTTGCCCTGC CACCATCAAC TGGGGCTTCC AGAAAAAGAC

 501  ACTCTGGATA TTGAATGGCT GCTCACCGAT AATGAAGGGA ACCAAAAAGT

 551  GGTGATCACT TACTCCAGTC GTCATGTCTA CAATAACTTG ACTGAGGAAC

 601  AGAAGGGCCG AGTGGCCTTT GCTTCCAATT TCCTGGCAGG AGATGCCTCC

 651  TTGCAGATTG AACCTCTGAA GCCCAGTGAT GAGGGCCGGT ACACCTGTAA

 701  GGTTAAGAAT TCAGGGCGCT ACGTGTGGAG CCATGTCATC TTAAAAGTCT

 751  TAGTGAGACC ATCCAAGCCC AAGTGTGAGT TGGAAGGAGA GCTGACAGAA

 801  GGAAGTGACC TGACTTTGCA GTGTGAGTCA TCCTCTGGCA CAGAGCCCAT

 851  TGTGTATTAC TGGCAGCGAA TCCGAGAGAA AGAGGGAGAG GATGAACGTC

 901  TGCCTCCCAA ATCTAGGATT GACTACAACC ACCCTGGACG AGTTCTGCTG

 951  CAGAATCTTA CCATGTCCTA CTCTGGACTG TACCAGTGCA CAGCAGGCAA

1001  CGAAGCTGGG AAGGAAAGCT GTGTGGTGCG AGTAACTGTA CAGTATGTAC

1051  AAAGCATCGG CATGGTTGCA GGAGCAGTGA CAGGCATAGT GGCTGGAGCC

1101  CTGCTGATTT TCCTCTTGGT GTGGCTGCTA ATCCGAAGGA AAGACAAAGA

1151  AAGATATGAG GAAGAAGAGA GACCTAATGA AATTCGAGAA GATGCTGAAG

1201  CTCCAAAAGC CCGTCTTGTG AAACCCAGCT CCTCTTCCTC AGGCTCTCGG

1251  AGCTCACGCT CTGGTTCTTC CTCCACTCGC TCCACAGCAA ATAGTGCCTC

1301  ACGCAGCCAG CGGACACTGT CAACTGACGC AGCACCCCAG CCAGGGCTGG

1351  CCACCCAGGC ATACAGCCTA GTGGGGCCAG AGGTGAGAGG TTCTGAACCA
```

```
1401  AAGAAAGTCC ACCATGCTAA TCTGACCAAA GCAGAAACCA CACCCAGCAT

1451  GATCCCCAGC CAGAGCAGAG CCTTCCAAAC GGTCTGAATT ACAATGGACT
      UKW7-antisense <<<<<< <<<<<<<<<< <<<<
           UKW8-antisense < <<<<<<<<<< <<<<<<<<<< <<<

1501  TGACTCCCAC GCTTTCCTAG GAGTCAGGGT CTTTGGACTC TTCTCGTCAT

1551  TGGAGCTCAA GTCACCAGCC ACACAACCAG ATGAGAGGTC ATCTAAGTAG

1601  CAGTGAGCAT TGCACGGAAC AGATTCAGAT GAGCATTTTC CTTATACAAT

1651  ACCAAACAAG CAAAAGGATG TAAGCTGATT CATCTGTAAA AAGGCATCTT

1701  ATTGTGCCTT TAGACCAGAG TAAGGGAAAG CAGGAGTCCA AATCTATTTG

1751  TTGACCAGGA CCTGTGGTGA GAAGGTTGGG GAAAGGTGAG GTGAATATAC

1801  CTAAAACTTT TAATGTGGGA TATTTTGTAT CAGTGCTTTG ATTCACAATT

1851  TTCAAGAGGA AATGGGATGC TGTTTGTAAA TTTTCTATGC ATTTCTGCAA

1901  ACTTATTGGA TTATTAGTTA TTCAGACAGT CAAGCAGAAC CCACAGCCTT

1951  ATTACACCTG TCTACACCAT GTACTGAGCT AACCACTTCT AAGAAACTCC

2001  AAAAAAGGAA ACATGTGTCT TCTATTCTGA CTTAACTTCA TTTGTCATAA
      UKW5-sense >>>>>>>>>> >>>>>>>>>> >

2051  GGTTTGGATA TTAATTTCAA GGGGAGTTGA AATAGTGGGA GATGGAGAAG

2101  AGTGAATGAG TTTCTCCCAC TCTATACTAA TCTCACTATT TGTATTGAGC

2151  CCAAAATAAC TATGAAAGGA GACAAAAATT TGTGACAAAG GATTGTGAAG

2201  AGCTTTCCAT CTTCATGATG TTATGAGGAT TGTTGACAAA CATTAGAAAT

2251  ATATAATGGA GCAATTGTGG ATTTCCCCTC AAATCAGATG CCTCTAAGGA

2301  CTTTCCTGCT AGATATTTCT GGAAGGAGAA AATACAACAT GTCATTTATC
          <<<<<< <<<<<<<<<< <<< UKW5-antisense

2351  AACGTCCTTA GAAAGAATTC TTCTAGAGAA AAAGGGATCT AGGAATGCTG

2401  AAAGATTACC CAACATACCA TTATAGTCTC TTCTTTCTGA GAAAATGTGA

2451  AACCAGAATT GCAAGACTGG GTGGACTAGA AAGGGAGATT AGATCAGTTT

2501  TCTCTTAATA TGTCAAGGAA GGTAGCCGGG CATGGTGCCA GGCACCTGTA

2551  GGAAAATCCA GCAGGTGGAG GTTGCAGTGA GCCAAGATTA TGCCATTGCA

2601  CTCCAGCCTG GGTGACAAAG CAAGACTCCA TCTCAAAAAA AAAAAAAAAT

2651  CAAGGAAGGA TAAAAGGAAG TTCAGTATTG TACCACACTT GGAACTTCCT

2701  CCATTTCTTC CATTTTAGAA GGATATGAAC CTGGAACTTT TGATGATTCT

2751  AAGCCTTAAA CTATCAAAAA GATCAGGGAT TGCCAATGCT TCTAATGGCA
```

```
2801  CTGCAAGTAT ATGCCATAAC CGTTCCCTCC TAAAAGTGAA AAATGAGAGA

2851  AATTCAGTAT TTTCCCAGGC TCAGCATCCA GAAGTCTAGC TCTGGGCTGG

2901  AAGAAAAGGG TACTAATATT TAGGGAAGAG ATGAGAATAA GTAGTGGGTG

2951  GCAGGAGAGG GCTGAGCTAG TGCCTGCTAA CATTTTAGTT GTATCTTGGA

3001  AAGATTTAGC AAAAATAACT CACCAGGATA GCTGCTGAAG AGTTGATGAA

3051  TGGGAGAAGA AAGATGTTTG AGAAATAAAG AAAACAGCAG CCTGCAATAC

3101  AATAACTTGC CTTTTTAATA GTTTTGATTA CTCTTGATAC CTACAGCACA

3151  AATGCTGGAC CTGAATCAGC TCTTCAAGGA CCCTAGCACA AATGTCAACT

3201  GATCACCTCT GGGAGAGTAG AAAACTTTTT TTTTTTTGAG ACGAAGTCTC

3251  GCTCTGTTGC CCAGGCTGGA GTGCAGTGGC ACCATCTCAG CTCACTGCAG

3301  CGTCCGCCTC TTGGGTTCAA GTGATTCTCC TGCCTTGTCC TCCTGAGTCG

3351  CTGGTATTAC AGGTGCCTGC CATCACACCC AGCTAATTTT TGGAGTTCTG

3401  ATAGAGACAG GGTTTCTCCA TGTTGGCCAG GCTTGTCTCA AGCTCCTGAC

3451  CTCAAGTGAC CTACCCACCC TTGGCCTCCC ACAGTGCTGG AAGCCACTGC

3501  ACCTGGCTCA GAATACTTTT TTTTTTGAGA TGCAGTCTTG CTCTCATCAC

3551  GCAGGCTGGA GTGCAGTGGC GTATCTCGGC TCACTGCGAC CTCCACCTCC

3601  CGAGTTCAAG CGATTCTCCT TCCTCAGTCC CCCAAGTAGC TTGGATTATA

3651  GGTGTGCGCC ACCACGTACA GCTAATTTTT GTATTTTTAG TAGAGATGGG

3701  GTTTCGCCAT GTTGACCAGG CTGGTCTCAA AACGCCTGAC CTCAGGTGAT

3751  CCACCCACCT CGGCCCCACA AAGTGCTAGG ATTACAGGTG TGAGCCACCA

3801  TGCCCGGCCC AGAATACTTT TTAAAAGAAG AGCAGGTTAG AGGAAAGAAA

3851  AAAATTGATG CTGAATGTGG TGATGAAAGC ATGTTTCTAA AATGGGAAGC

3901  AGATGCTTAA AGAGGAAAGA CTAATCTGGG ATTTTGCCCC ATTTCTCTGG

3951  TTTTTCACTC CTATATTTAA TTCTCACAAT CGTGTCGTCA CATAGTGCAA

4001  AAAACAAAAT TCTTGTAAAG TCCCCAGGAG TTTATGCTTG GGTGAAAGTT
                UKW2-sense >>>>>>>>> >>>>>>>>>> >

4051  TTAGCCTGAG TATTTTCTTC CTCTAAAAAA GGTGGGAAAT GAGACATTGA

4101  GGAATTAACA TATAAATGTC TGCTATGGGT TTAAGAGAAC TGGCGTATTT

4151  GGAATGCTTC TTACACTAAC ACTGTCTCAT TGTAAAATAT AAAACCCCTT

4201  ACTCTAACTA CATTTTTATT CCTCTGGTAG TGTGGTATCC AGGCAACATA
            UKW2-antisense <<<<<<< <<<<<<<<<< <<<<
```

```
4251  TCACTTCTGC TATGTAATTC TAAGAATTCT CATTTCTAGA GTACCTGAGC
                    B1i-sense >>>>>> >>>>>>>>>> >>>>>>>

4301  CAAACAAATA CACAACGGAA GCTGCAGCTG TATCATCACT AGCAATTTGC

4351  TCATCATTAT TTACTACCTT TGAACCTAAG GTTTCCTGCC TATGCTTTTG

4401  AAAGCAAAAA TCAGTCTCCT TTGCATGAAA AAGAGCCTTA GATTTTTAAA

4451  CATGTTAGTT ACCAGAATGC TAAAATACCA GTTGATTACC CAAATTATTT

4501  TGGAAATCTA TCCATAATGG AAGTCTACAA CAAACACATA AAACAGATTA

4551  CACTAAGAGC TGAGAAATTC AAAGGAACTG AAGATTCTGA GAGATAAACT

4601  GTTCAAGTCT TAGCAATGAT ACTGCACTTC TCTTTGACAG GTTCTGGGCT

4651  TAAGTTAGAG GCCCTACTGG TTCCAAACCA TATTCCACTG ACTTTGCAAG

4701  TAAAATAAAT TTGATTCTGA AATAGGAAAC AAAAAAAGGA GAAATAACCG

4751  AATAGTAGAA GAAAAACTGT TTGTAGGAAG ACGATGCAGA TGGAATGATG
        B1i-antisense <<<<< <<<<<<<<<< <<<<<<

4801  TGGACATTGA GTAACCATGT CAATAAAATA TATAAACCAA ACTTAAATTT

4851  GTGAAATAAG GAAGTTGGTA CCTTTGTTGT TACAGTGTAT AAAAACAATT

4901  TCGGAACTGC TGTTGCAAAA AGACATATAT AGTTTTGCTT CCTTCTGGTG

4951  TTAAGCTGTT TATATTTCAG TTTCAGTTTT AACTTCTAAG TTGCCTTGTA

5001  ATTGGGACTG TGTTTCAGCA TCACAAAAAC CAAATATTTA TTATGGATGC

5051  ATCTGTATCA GCAATTAAAA AATAAACAAG TAAAAGTGAT ACTGTAGGAG

5101  AAGCTGAAGC TCAAAAAAAA
```

Abbildung 48: Klonierung der Nukleotidsequenz von *UKW*. Dargestellt ist die vollständige Länge von *UKW* und einige, im Screening einer humanen cDNS-Bibliothek bzw. zur Klonierung in bestimmte Vektoren, verwendete Oligonukleotide. Mittels dieser Oligonukleotide konnte die vollständige Länge von 5,1 kb bestimmt werden. Schwarz unterlegt sind das Start-Codon ATG und das Stop-Codon TGA. Die *UKW*-Sequenz umfasst einen 1122 bp großen offenen Leserahmen. Die Oligonukleotide UKW7-sense und UKW7-antisense wurden in einer RT-PCR unter Verwendung von DNase-verdauter Gesamt-RNS von SUIT-2 007-Zellen eingesetzt. Die kodierende Sequenz wurde in den pCR2.1-Vektor kloniert und anschließend zur Überprüfung sequenziert.

7. cDNS- und Protein-Sequenz von UKW

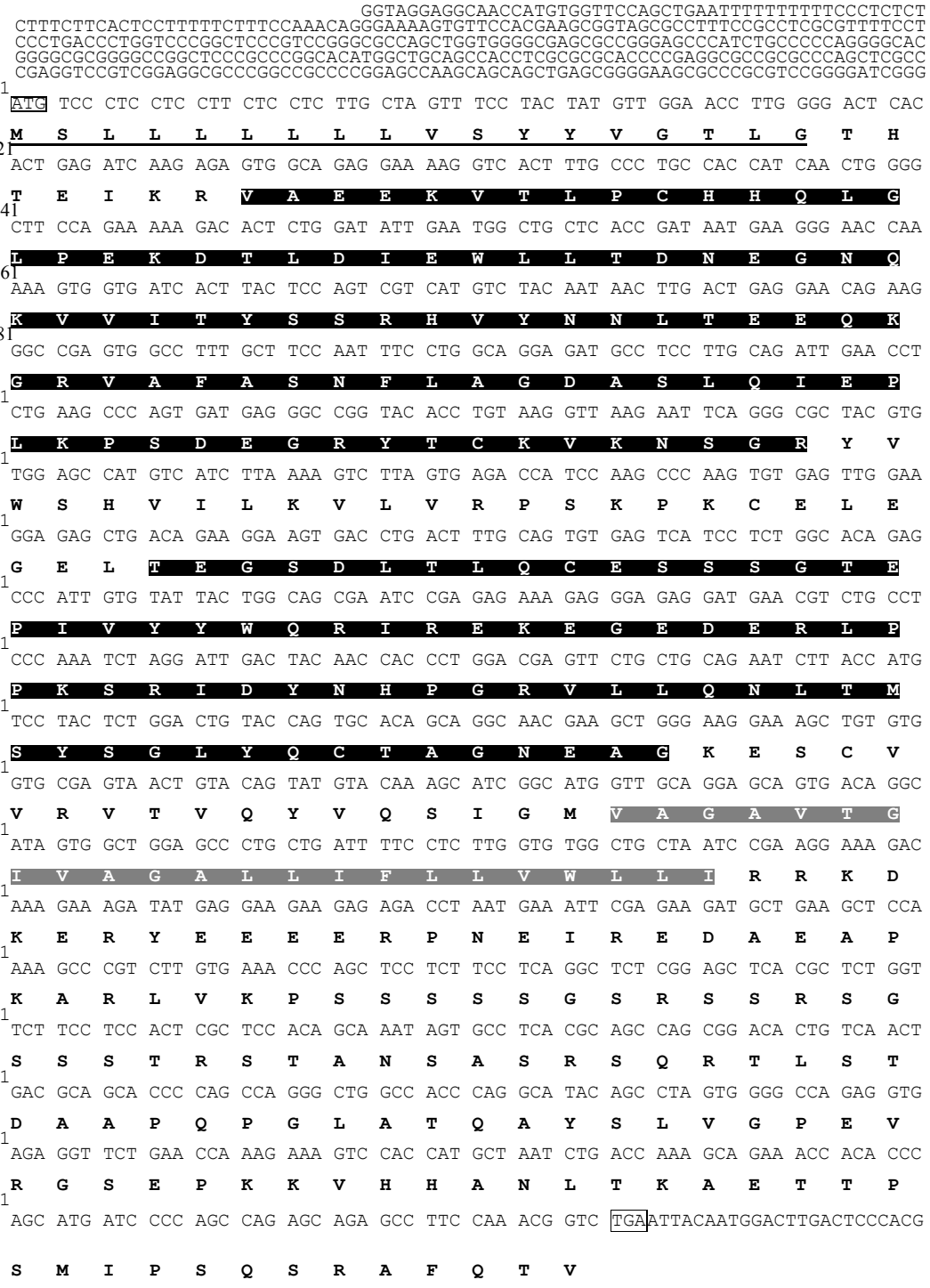


Abbildung 49: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von UKW. Die zwei Immunglobulin C-2-Typ-Domänen sind schwarz und die putative Transmembrandomäne ist grau unterlegt. Die postulierte Signalpeptidsequenz ist unterstrichen. Das Start-Codon ist in einer Box umrandet dargestellt.

8. Klonierung der *LKW*-Sequenz

```
   1  GCGATCCCGG GCCCGAGGGC ATCAGACGGC GGCTGATTAG CTCCGGTTTG

  51  CATCACCCGG ACCGGGGGAT TAGCTCCGGT TTGCATCACC CGGACCGGGG

 101  GATTAGCTCC GGTTTGCATC ACCCGGACCG GGGGCCGGGC GCGCACGAGA

 151  CTCGCAGCGG AAGTGGAGGC GGCTCCGCGC GCGTCCGCTG CTAGGACCCG

 201  GGCAGGGCTG GAGCTGGGCT GGGATCCCGA GCTCGGCAGC AGCGCAGCGG

 251  GCCGGCCCAC CTGCTGGTGC CCTGGAGGCT CTGAGCCCCG GCGGCGCCCG

 301  GGCCCACGCG GAACGACGGG GCGAGATGCG AGCCACCCCT CTGGCTGCTC
                     LKW9-sense >>>>> >>>>>>>>>> >>>

 351  CTGCGGGTTC CCTGTCCAGG AAGAAGCGGT TGGAGTTGGA TGACAACTTA

 401  GATACCGAGC GTCCCGTCCA GAAACGAGCT CGAAGTGGGC CCCAGCCCAG

 451  ACTGCCCCCC TGCCTGTTGC CCCTGAGCCC ACCTACTGCT CCAGATCGTG

 501  CAACTGCTGT GGCCACTGCC TCCCGTCTTG GGCCCTATGT CCTCCTGGAG
       <<<<<<<<< <<<<<<<<<< < LKW7-nested

 551  CCCGAGGAGG GCGGGCGGGC CTACCAGGCC CTGCACTGCC CTACAGGCAC

 601  TGAGTATACC TGCAAGGTGT ACCCCGTCCA GGAAGCCCTG GCCGTGCTGG

 651  AGCCCTACGC GCGGCTGCCC CCGCACAAGC ATGTGGCTCG GCCCACTGAG

 701  GTCCTGGCTG GTACCCAGCT CCTCTACGCC TTTTTCACTC GGACCCATGG

 751  GGACATGCAC AGCCTGGTGC GAAGCCGCCA CCGTATCCCT GAGCCTGAGG

 801  CTGCCGTGCT CTTCCGCCAG ATGGCCACCG CCCTGGCGCA CTGTCACCAG

 851  CACGGTCTGG TCCTGCGTGA TCTCAAGCTG TGTCGCTTTG TCTTCGCTGA
                                    LKW6-antisense <<<<<<<<<<

 901  CCGTGAGAGG AAGAAGCTGG TGCTGGAGAA CCTGGAGGAC TCCTGCGTGC
      <<<<<<<<<< <

 951  TGACTGGGCC AGATGATTCC CTGTGGGACA AGCACGCGTG CCCAGCCTAC

1001  GTGGGACCTG AGATACTCAG CTCACGGGCC TCATACTCGG GCAAGGCAGC
      <<<<<<<<<< <<<<<<<<<< LKW5-nested

1051  CGATGTCTGG AGCCTGGGCG TGGCGCTCTT CACCATGCTG GCCGGCCACT

1101  ACCCCTTCCA GGACTCGGAG CCTGTCCTGC TCTTCGGCAA GATCCGCCGC

1151  GGGGCCTACG CCTTGCCTGC AGGCCTCTCG GCCCCTGCCC GCTGTCTGGT

1201  TCGCTGCCTC CTTCGTCGGG AGCCAGCTGA ACGGCTCACA GCCACAGGCA

1251  TCCTCCTGCA CCCCTGGCTG CGACAGGACC CGATGCCCTT AGCTCCAACC
```

```
1301  CGATCCCATC TCTGGGAGGC TGCCCAGGTG GTCCCTGATG GACTGGGGCT

1351  GGACGAAGCC AGGGAAGAGG AGGGAGACAG AGAAGTGGTT CTGTATGGCT

1401  AGGACCACCC TACTACACGC TCAGCTGCCA ACAGTGGATT GAGTTTGGGG

1451  GTAGCTCCAA GCCTTCTCCT GCCTCTGAAC TGAGCCAAAC CTTCAGTGCC
                     LKW9-antisense << <<<<<<<<<< <<<<<<<

1501  TTCCAGAAGG GAGAAAGGCA GAAGCCTGTG TGGAGTGTGC TGTGTACACA

1551  TCTGCTTTGT TCCACACACA TGCAGTTCCT GCTTGGGTGC TTATCAGGTG

1601  CCAAGCCCTG TTCTCGGTGC TGGGAGTACA GCAGTGAGCA AAGGAGACAA

1651  TATTCCCTGC TCACAGAGAT GACAAACTGG CATCCTTGAG CTGACAACAC

1701  TTTTCCATGA CCATAGGTCA CTGTCTACAC TGGGTACACT TTGTACCAGT
                               LKW4-antisense << <<<<<<<<<<

1751  GTCGGCCTCC ACTGATGCTG GTGCTCAGGC ACCTCTGTCC AAGGACAATC
      <<<<<<<

1801  CCTTTCACAA ACAAACCAGC TGCCTTTGTA TCTTGTACCT TTTCAGAGAA

1851  AGGGAGGTAT CCCTGTGCCA AAGGCTCCAG GCCTCTCCCC TGCAACTCAG

1901  GACCCAAGCC CAGCTCACTC TGGGAACTGT GTTCCCAGCA TCTCTGTCCT

1951  CTTGATTAAG AGATTCTCCT TCCAGGCCTA AGCCTGGGAT TTGGGCCAGA

2001  GATAAGAATC CAAACTATGA GGCTAGTTCT TGTCTAACTC AAGACTGTTC

2051  TGGAATGAGG GTCCAGGCCT GTCAACCATG GGGCTTCTGA CCTGAGCACC

2101  AAGGTTGAGG GACAGGATTA GGCAGGGTCT GTCCTGTGGC CACCTGGAAA

2151  GTCCCAGGTG GGACTCTTCT GGGGACACTT GGGGTCCACA ATCCCAGGTC
                                LKW3-nested <<<<<< <<<<<<<<<<

2201  CATACTCTAG GTTTTGGATA CCATGAGTAT GTATGTTTAC CTGTGCCTAA
      <<<<<<                      LKW2-antisense < <<<<<<<<<<

2251  TAAAGGAGAA TTATGAAATA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
      <<<<<<<<<

2301  AAAA
```

Abbildung 50: Klonierung der Nukleotidsequenz von *LKW*. Dargestellt ist die vollständige Länge von *LKW* und die in der 5´-RACE-PCR verwendeten Oligonukleotide. Mittels dieser Oligonukleotide konnte die vollständige Länge von 2304 nt bestimmt werden. Schwarz unterlegt sind das Start-Codon ATG und das Stop-Codon GGC. Die *LKW*-Sequenz umfasst einen 1074 bp großen offenen Leserahmen. Die Oligonukleotide LKW9-sense und LKW9-antisense wurden in einer RT-PCR unter Verwendung von DNase-verdauter Gesamt-RNS von SUIT-2 028-Zellen eingesetzt und ergaben eine Größe von 1173 nt. Die kodierende Sequenz wurde in den pCR2.1-Vektor kloniert und anschließend zur Überprüfung sequenziert.

9. cDNS- und Protein-Sequenz der dual-spezifischen Kinase LKW

Abbildung 51: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von LKW. Die Serin/Threonin Proteinkinase katalytische Domäne ist grau unterlegt und die Tyrosinkinase katalytische Domäne ist schwarz unterlegt.

10. ‚Multiple Tissue Expression Array' Ubiquitin-Kontrolle

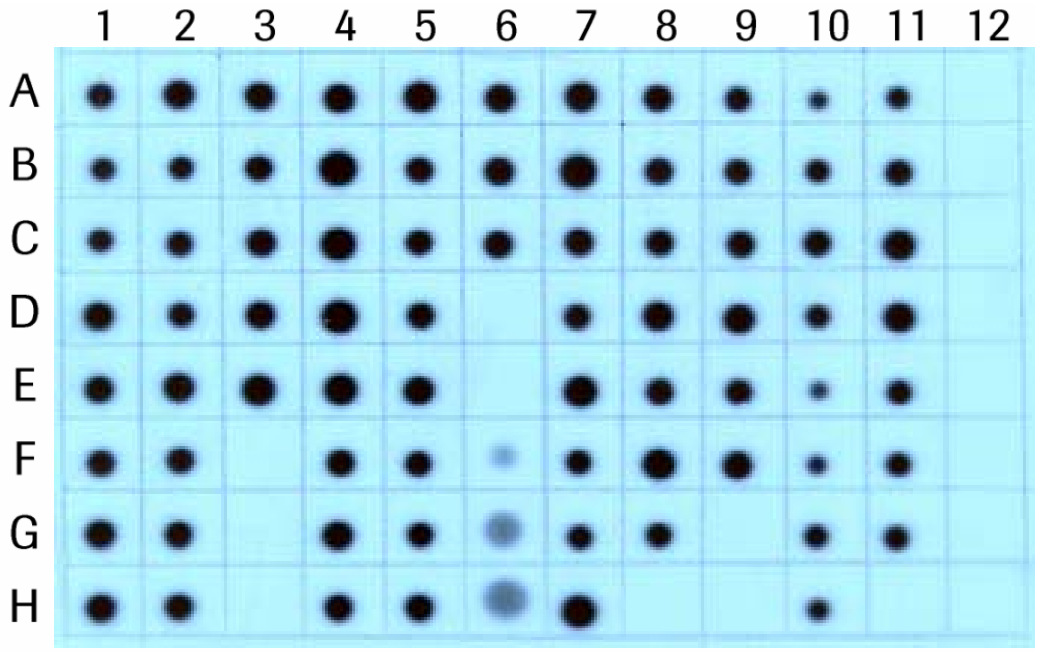


Abbildung 52: ‚Multiple Tissue Expression Array' der Ubiquitin-Expression zur Kontrolle der poly-A+-Menge. Der Blot wurde mit einer α-[^{32}P]dATP markierten Ubiquitin-spezifischen Sonde hybridisiert.

11. ‚Cancer Profiling Array' Ubiquitin-Kontrolle

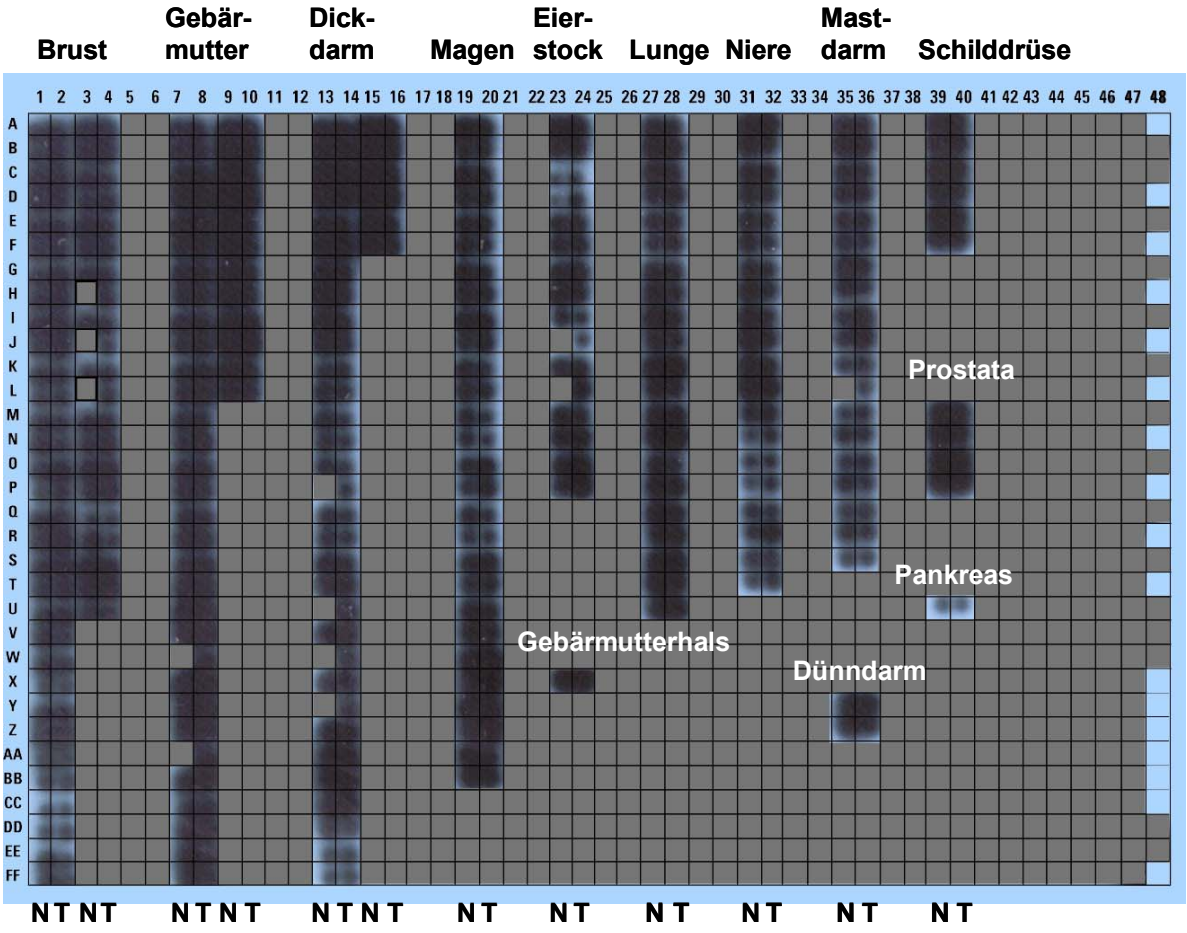


Abbildung 53: ‚Cancer Profiling Array' der Ubiquitin-Expression zur Kontrolle der poly-A+-Menge. Der Blot wurde mit einer α-[^{32}P]dATP markierten Ubiquitin-spezifischen Sonde hybridisiert.

Eidesstattliche Erklärung

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

Hanhofen, 12. Juli 2004

Eigene Veröffentlichungen

Tarbe N, Lösch S, Burtscher H, Jarsch M, Weidle UH: Identification of rat pancreatic carcinoma genes associated with lymphogenous metastasis. Anticancer Res 2002; 22 (4): 2015-2 027

Patentanmeldungen

Methods for diagnosis and therapy of pancreatic cancer and composition useful therein. Erfinder: Lösch SM, Weidle UH. EP Patentanmeldung Nr. 5202 NDR (Case 21460) vom 31.10.2002.

Methods for diagnosis and therapy of cancer and composition useful therein. Erfinder: Lösch SM, Weidle UH. EP Patentanmeldung Nr. 03021151.0 (Case 21929) vom 23.09.2003.

Danksagung

Frau Prof. Dr. Elisabeth H. Weiß danke ich sehr für die Erstellung des Erst-gutachtens, für ihre Betreuung und ihr stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Frau PD Dr. Bettina Kempkes gilt mein Dank für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Ulrich H. Weidle danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine Anregungen und sein Interesse am Erfolg des Projekts. Ich danke ihm auch herzlich dafür, dass mir im Labor alle theoretischen und praktischen Mittel zur Verfügung standen.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. M. Kubbies, der ein stetes Interesse an meiner Arbeit zeigte und mir durch konstruktive Kritik und seinen fachlichen Rat in zellbiologischen Fragen hilfreich zur Seite stand.

Ein großes Dankeschön an Herrn H. Barchet für seine ständige Diskussionsbereitschaft und für viele nützliche Tipps bei der Durchführung der Migrationsassays. Herrn Dr. S. Klostermann und Herrn Dr. M. Ebeling danke ich für die Unterstützung bei der Bioinformatik.

Besonders möchte ich mich auch bei meiner Laborkollegin Marina Schwirzke und bei meinen Mitdoktoranden Dr. Vesna Evtimova, Dr. Nesrine Tarbé, Robert de Lange, Nicole Euer, Dr. Tanja Ligensa, Dr. Tanja Schneider für die gegenseitige Unterstützung und Motivation bedanken.

Allen Mitgliedern der Abteilung Dr. A. Stern danke ich für ihre Offenheit und Hilfsbereitschaft.

Ich danke auch Ralf für die Unterstützung und den Rückhalt, den er mir gegeben hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie - meinen Eltern und meinem Bruder Christoph - die mir mein Studium ermöglicht hat. Sie hat mich stets unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Lebenslauf

Persönliche Daten

	Stephanie Maria Lösch
	geboren am 02. Juli 1974
	in Landau/Pfalz

Schulbildung

1981 - 1985	**Grundschule** Hanhofen
1985 - 1994	Edith-Stein-**Gymnasium** Speyer
06/1994	Erlangung der **Allgemeinen Hochschulreife**

Studium

10/1994 – 09/1998	**Studium der Lebensmittelchemie** an der Universität Kaiserslautern
09/1998	**Diplomprüfungen**
10/1998 – 03/1999	**Diplomarbeit** bei Dr. August Oetker Nahrungsmittel KG, F&E, Bielefeld
	Thema: „Untersuchungen zur Verlängerung der Haltbarkeit gebrauchter Fritierfette für Backprozesse – Möglichkeiten der Wiederaufbereitung, Rezeptureinflüsse, sensorische und rechtliche Rahmenbedingungen" unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. med. D. Schrenk
03/1999	**Erstes Staatsexamen** Lebensmittelchemie
04/1999 – 06/2000	**Zweites Staatsexamen** Lebensmittelchemie
07/2000 – 07/2003	**Dissertation** an der Ludwig-Maximilians-Universität, Fakultät für Biologie
	Thema: „Identifizierung und Charakterisierung von Tumorprogressionsgenen in einem Pankreastumor-Modellsystem"
	Angefertigt am Institut für Anthropologie und Humangenetik unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. E. H. Weiß
	Durchführung der praktischen Arbeiten bei der Roche Diagnostics GmbH, Pharma Forschung Penzberg, unter Anleitung von Prof. Dr. U. H. Weidle