Auf der Suche nach frühen Gendefekten beim sporadischen Mammakarzinom: Identifizierung zweier 4 und 6 Mb großer Deletionen auf Chromosom 6q24 bei einzelnen disseminierten Tumorzellen mit normalem CGH-Profil

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Andrea Eberhardt
aus Mitterfels

Auf der Suche nach frühen Gendefekten beim sporadischen Mammakarzinom: Identifizierung zweier 4 und 6 Mb großer Deletionen auf Chromosom 6q24 bei einzelnen disseminierten Tumorzellen mit normalem CGH-Profil

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Andrea Eberhardt
aus Mitterfels

Dissertation eingereicht am: 7. September 2006

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. T. Cremer
Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. H. Leonhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Dezember 2006

Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der entsprechenden Literaturzitate gekennzeichnet.

Die vorliegende Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

München, 7. September 2006

Andrea Eberhardt

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **4**

1 EINLEITUNG **6**

1.1 Die Krebserkrankung 6

1.2 Metastasierende Tumorzellen und ihre Eigenschaften 7

1.3 Zielgerichtete Krebstherapien 8

Tyrosinkinasen als Zielstrukturen molekularer Therapien 9

1.4 Zielsetzung der Arbeit: 11

Identifikation neuer therapeutischer Zielstrukturen auf der Oberfläche von disseminierten Tumorzellen 11

1.4.1 Lysosomale Cathepsine 12

1.4.2 Die Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren 13

1.4.3 Der Zusammenhang von IGF2-Rezeptor und Cathepsin 13

1.5 Überprüfung der aufgestellten Hypothese 14

2 MATERIAL **15**

2.1 Enzyme 15

2.2 Oligonukleotide 15

2.3 Antikörper 17

2.4 Zelllinien 18

2.5 Chemikalien und Biochemikalien 19

2.6 Geräte 20

2.7 Verbrauchsmaterialien 20

2.8 Puffer und Lösungen 21

3 METHODEN 22

3.1 Immunfluoreszenz-Färbungen gegen Cathepsin B 22
3.1.1 Kultivierung der verwendeten Zelllinien 22
3.1.2 Kultivierung der Zelllinien in Zellkultur-Kammerobjektträger 22
3.1.3 Färbung epithelialer Tumorzelllinien in Kammerobjektträgern 23
3.1.4 Antikörper-Färbung membrangebundener Cathepsine für die FACS-Analyse 24
3.1.4.1 Etablierung einer Positivkontrolle durch Stimulation monozytärer Zelllinien 24
3.1.4.2 Generierung von Sphäroiden adhärent wachsender Zelllinien 24
3.1.4.3 Antikörperfärbung 25
3.1.4.4 Nachweis der Cathepsin-Oberflächenbindung durch einen speziellen Inhibitor 26
3.1.4.5 Fluoreszenzdurchflusszytometrie (FACS-Analyse) 28

3.2 Allelverlust-Analysen Zytokeratin-positiver Einzelzellen 29
3.2.1 Kontroll- und Patientenkollektive 29
3.2.1.1 Kontrollkollektive 29
3.2.1.2 Aufarbeitung peripherer Blutlymphozyten von Testpersonen 29
3.2.1.3 Vimentin-Antikörperfärbung der Kontrollzellen 30
3.2.1.4 Isolierung der Einzelzellen 30
3.2.1.5 Einzelzell-PCR 31
3.2.1.6 Patientenkollektiv 34
3.2.2 Mikrosatelliten- bzw. Tetranukleotid-Polymorphismen und Allelverlust 36
3.2.2.1 Lokalisation der einzelnen Mikrosatelliten-Marker 36
3.2.2.2 PCR der Mikrosatelliten-Marker 39
3.2.2.3 Auftrennung der Allele auf Polyacrylamidgelen 40
3.2.3 Single Nukleotid-Polymorphismen 42
3.2.3.1 Lokalisationen der einzelnen SNPs 42
3.2.3.2 PCR der SNPs, enzymatischer Verdau und Auftrennung der Allele auf Agarosegelen 46
3.2.4 Auswertung aller Allelverlust-Analysen 46

4 ERGEBNISSE 48

4.1 Genom- und Expressionsanalysen sowie Immunfluoreszenz bei disseminierten Tumoreinzelzellen 48

4.2 Detektion membranständiger Cathepsine 50
4.2.1 Immunfluoreszenz-Mikroskopie epithelialer Tumorzelllinien 50
4.2.2 Immunfluoreszenz-Analysen anhand von Durchflusszytometrie 53
4.2.2.1 Überprüfung der Bindungsspezifität des biotinylierten Antikörpers 53
4.2.2.2 Immunfluoreszenz stimulierter hämatopoietischer Tumorzelllinien zur Etablierung einer Positivkontrolle 56

4.2.2.3 Immunfluoreszenz epithelialer Tumorzelllinien 61

4.3 Allelverlust-Analyse von Zytokeratin-positiven Zellen aus dem Knochenmark von Mammakarzinompatienten 62
4.3.1 Technisches Vorgehen 62
4.3.1.1 Isolation der Einzelzelle und globale Amplifizierung des Genoms 62
4.3.1.2 Primerauswahl zur Amplifikation polymorpher DNA-Sequenzen und Auswertung 64
4.3.1.3 Analyse von Kontrollzellen 68
4.3.2 Charakterisierung der Region 6q24-26 71
4.3.2.1 Allelverlust in der Region des *IGF2*-Rezeptors 71
4.3.2.2 Neudefinition der „region of interest“ 73
4.3.3 Allelverlust-Analysen des Patientenkollektivs in der Region 75
4.3.4 Identifizierung deletierter Markersequenzen 80

5 DISKUSSION 84

5.1 Cathepsine auf der Oberfläche von Tumorzellen 84
Zusammenhang zwischen Verlust des IGF2-Rezeptors und der Oberflächenexpression von Cathepsin 87

5.2 Chromosomale Aberrationen auf Chromosom 6q 87
5.2.1 Kontrollzellen 88
5.2.2 Allelverlust-Analyse in der Region 6q25 89
5.2.3 Allelverlust-Analyse der Region auf Chromosom 6q22-25 91
5.2.4 Gene in den häufig deletierten Regionen 94
5.2.5 Relevanz der durch Allelverlust-Analysen identifizierten Gene 96

6 ZUSAMMENFASSUNG 100

7 LITERATURVERZEICHNIS 102

8 LEBENSLAUF 107

Abkürzungsverzeichnis

Formelgrößen wurden mit den SI-Einheiten und chemische Elemente entsprechend ihrer Bezeichnung im Periodensystem abgekürzt. Für die Abkürzung gebräuchlicher Wörter der deutschen Sprache wurde gemäß Duden verfahren.

A ..... Adenin
APS ..... Ammoniumpersulphat
ATP ..... Adenosintriphosphat

BCIP ..... 5-Bromo-4-chloroindol-3-ol Dihydrogenphosphatester Mono-p-toluidiniumsalz
bp ..... Basenpaar(e)
BSA ..... Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)

C ..... Cytosin
Cy3 ..... Indocarbocyanin
°C ..... Grad Celsius

DAPI ..... 4', 6-Diamidino-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
dd ..... dideoxy
dH_2O ..... Destilliertes (vollentsalztes) Wasser
DMSO ..... Dimethylsulfoxid
DNA ..... Desoxyribonucleinsäure
dNTP ..... 2´-Desoxynucleosid-5´-triphosphat

EDTA ..... Ethylendiamintetraacetat

FACS ..... Fluorescence Activated Cell Sorter (Fluoreszenzaktivierter Zellsorter)
FCS ..... Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
FITC ..... Fluoresceinisothiocyanat
FSC ..... Forwardscatter (Vorwärtsstreulicht)

g ..... Gramm bzw. Erdbeschleunigung
G ..... Guanin

h ..... Stunde
HBSS ..... Hanks' Balanced Salt Solution

k ..... Kilo
kb ..... Kilobasenpaare

l ..... Liter
LPS ..... Lipopolysaccharid

m ..... Milli
M ..... Molar
Mb(p) ..... Mega Basen(paare)

min ..... Minute
Mio ..... Million
µ ..... Mikro
MOPC ..... Mineral oil-induced plasmocytoma
mRNA..... messenger RNA (Boten-RNA)

n ..... Nano

PAA..... Polyacrylamid
PBS..... Phosphatbuffer-Saline
PCR..... Polymerase Chain Reaction
(Polymerasekettenreaktion)
PE ..... Phycoerythrin
PFA ..... Paraformaldehyd
PMA ..... Phorbol 12-Myristinsäure 13-Acetat

RNA..... Ribonucleinsäure
RT ..... Raumtemperatur

sec..... Sekunde
SSC..... Sideward Scatter (Seitwärtsstreulicht)

T ..... Thymin
TBE ..... Tris-Borat-EDTA
TEMED..... Tetramethylethylendiamin

Upm..... Umdrehungen pro Minute
UV ..... ultraviolett

V..... Volt

W..... Watt

1 Einleitung

1.1 Die Krebserkrankung

Krebs ist die Bezeichnung für die unkontrollierte Teilung von Organ- oder Gewebezellen, die das umliegende Gewebe zerstören und Tochtergeschwulste (Metastasen) bilden können. Bösartige Neubildungen werden unterschieden in Karzinome (maligne epitheliale Tumore), Sarkome (maligne mesenchymale Tumore) und Hämoblastosen (maligne Erkrankungen des Blutes oder der blutbildenden Zellen). Weltweit erkranken jährlich etwa 10 Mio. Menschen an Krebs, wobei 7 Mio. Menschen pro Jahr an einer Krebserkrankung versterben. Die Anzahl der Todesfälle, die auf bösartige Neubildungen zurückzuführen sind, beläuft sich auf 12,5 %. Männer erkranken häufig an Tumoren der Lunge und des Magens, Frauen hingegen entwickeln zumeist Brust- oder Gebärmutterhalskrebs (World Health Organization, 2006). Nach Schätzungen der WHO könnte etwa ein Drittel aller Krebserkrankungen verhindert werden, wenn auf den Tabakkonsum verzichtet, die Exposition kanzerogener Stoffe vermieden und auf gesunde Ernährung geachtet werden würde. Die Ursachen der Krebserkrankung sind neben Umwelt- und Ernährungsbedingungen häufig auch in einer genetischen Disposition zu finden. Oftmals bleiben jedoch die Ursachen unbekannt, die dazu führen, dass eine Körperzelle vermutlich in mehreren Schritten genetische Defekte erwirbt und dadurch eine Krebserkrankung auslösen kann [1]. Tumorzellen akkumulieren also genetische Veränderungen, die ihnen ein unkontrolliertes Wachstum erlauben. Dabei sind in vielen Fällen Tumorsuppressor- oder Onkogene von Aberrationen betroffen. Der Verlust eines Tumorsuppressorgens oder die übermäßige Expression eines Onkogens, verursacht durch eine Amplifikation, kann zur unkontrollierten Zellproliferation führen [2]. Obwohl der Primärtumor in der Regel chirurgisch entfernt werden kann, starben in Deutschland im Jahre 2004 etwa 215000 Krebspatienten (Statistisches Bundesamt, 2004). Sie versterben aufgrund von Lokalrezidiven, die sich im bereits befallenen Organ oder Gewebe manifestieren, oder aufgrund von Tochtergeschwulsten, den sogenannten Fernmetastasen, die sich zu einem späteren Zeitpunkt bilden, wobei sich die Krebserkrankung auf andere Organe

ausbreitet. Dabei verlassen metastasierende Zellen den Tumor, wandern auf lymphogenem oder hämatogenem Wege in andere Organe und bilden dort durch Proliferation eine Tochtergeschwulst.

1.2 Metastasierende Tumorzellen und ihre Eigenschaften

Bei etwa 30% der Brustkrebspatienten ohne diagnostizierte Fernmetastasen (M0) können in Knochenmark, Lymphknoten oder Blut Zellen mit epithelialen Eigenschaften gefunden werden. Bei diesen Patienten können durch immunzytochemische Färbungen ein bis zwei epitheliale Zellen unter 2 x 10^6 Zellen im Knochenmark nachgewiesen werden, die das epitheliale Protein Zytokeratin exprimieren. Bei gesunden Menschen dagegen lassen sich diese epithelialen, Zytokeratin-positiven Zellen nur in 2% aller untersuchten Knochenmarksproben detektieren [3, 4]. Es zeigte sich, dass allein der Nachweis epithelialer Zellen im Knochenmark mit einer schlechteren Prognose dieser Patientinnen einhergeht. Dies beinhaltet nicht nur die Dauer der krankheitsfreien Zeit bis zur Diagnose eines erneut auftretenden Tumors, sondern spiegelt sich auch in der Gesamtüberlebenszeit und der Wahrscheinlichkeit, an einer Karzinose zu erkranken, wieder [5-7]. Da der Nachweis dieser epithelialen, Zytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark prognostische Relevanz für das Auftreten von Tochtergeschwulsten besitzt, könnten diese einzelnen Zellen Vorläuferzellen von Metastasen sein [3] [8]. Epitheliale Zellen können teilweise über Jahre hinweg in einer Art Ruhezustand persistieren, ohne zu proliferieren [9]. Was letztlich die Ursachen für dieses Verhalten von disseminierten Tumorzellen darstellt, ist bislang unbekannt.

Aus genomischen Analysen der disseminierten Tumorzellen wurde die überraschende Einsicht gewonnen, dass Zytokeratin-positive Zellen aus dem Knochenmark und Zellen des Primärtumors bei Mammakarzinompatienten nur wenige oder keine gemeinsamen genomischen Aberrationen teilen. Auch disseminierte Tumorzellen eines Patienten zeichneten sich untereinander durch chromosomale Heterogenität aus [8]. Die Disseminierung von Zellen aus dem Primärtumor könnte somit in einer sehr frühen Phase der Tumorentwicklung oder sogar bereits vor der Erstdiagnose stattfinden. Bei den vorhandenen Aberrationen

in den disseminierenden Tumorzellen würde es sich damit um frühzeitige Veränderungen im Genom handeln.
Der genomischen Charakterisierung disseminierter Tumorzellen, die Veränderungen wie Amplifikationen oder Deletionen von DNA-Sequenzen und deren Folgen auf die Genexpression aufzeigt, kommt daher große Bedeutung zu. Durch die Kenntnis der zytogenetischen Veränderungen disseminierter Tumorzellen könnten fehlerhafte molekulare Mechanismen in der Zelle als Folge der Aberrationen entdeckt werden.

1.3 Zielgerichtete Krebstherapien

Ein gezielter Eingriff in die veränderte molekulare Biologie der Tumorzelle kann Möglichkeiten eröffnen, bereits innerhalb der adjuvanten Krebstherapie der Bildung von Metastasen entgegenzuwirken. Neben der Chemo- und Strahlentherapie können bei einer Krebserkrankung auch Therapien zum Einsatz kommen, die überwiegend Tumorzellen bekämpfen. Während bei der systemischen Chemotherapie durch Zytostatika das Zellwachstum und die Zellteilung in allen proliferierenden Geweben inhibiert werden, können neuartige Therapien gezielt in zelluläre Signalwege eingreifen, die nur in Tumorzellen aktiviert sind. Molekularbiologische Analysen, mit deren Hilfe die molekularen Veränderungen in Tumorzellen aufgedeckt und identifiziert werden können, liefern die Voraussetzung für diese zielgerichteten Krebstherapien [2]. Gene, die kausal an der Tumorentstehung beteiligt sind, bieten sich dabei als Ansatzpunkte zielgerichteter Krebstherapien an [2]. Zu solchen Onkogenen zählen die Tyrosinkinasen, die bei Krebserkrankungen häufig durch Mutation und/oder Überexpression betroffen sind. Diese Enzyme regeln als Phosphat-Transferasen Signalwege in der Zelle, wobei sie als zytoplasmatische Protein-Tyrosinkinasen oder Tyrosinkinase-Rezeptoren unter anderem Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose vermitteln. Eine Störung der Tyrosinkinase-Signalwege kann im Modellsystem zu maligner Transformation führen [10]. Da Kinase-Inhibitoren das Wachstum von Krebszellen mit veränderter Tyrosinkinase-Aktivität verhindern können, werden diese Inhibitoren in der Krebstherapie eingesetzt [11].

Tyrosinkinasen als Zielstrukturen molekularer Therapien

Die Entwicklung einiger gezielter Krebstherapien wurde durch Fortschritte in der Zytogenetik ermöglicht. Bereits im Jahre 1960 entdeckten Peter Nowell and David Hungerford mit dem verkürzten Chromosom 22, dem sogenannten Philadelphia-Chromosom, erstmals die genetische Ursache für die Chronisch Myeloische Leukämie (CML) [12]. Mehr als 10 Jahre später konnte mit Hilfe neuer Techniken die reziproke Translokation zwischen Chromosom 9 und 22 gezeigt werden, welche dieser die Leukozyten betreffenden Blutkrebserkrankung zugrunde liegt [12-14]. Bei dieser charakteristischen Translokation fusionieren die Gene *BCR* und *C-ABL* auf Chromosom 9, so dass dadurch das Fusionsprotein BCR-ABL entsteht. Das Onkogen *C-ABL*, das für eine Protein-Tyrosinkinase kodiert, wird unter dem Einfluss des *BCR*-Gens konstitutiv aktiviert. Dies wiederum hat die schnelle klonale Expansion der hämatopoietischen Stammzellen bei der CML zur Folge. Durch die Kenntnis der Überaktivität von ABL wurde gezielt ein Inhibitor dieser Protein-Tyrosinkinase gesucht, der eine medikamentöse Behandlung der CML ermöglicht. Als eines der ersten, erfolgreich eingesetzten Krebsmedikamente, die aufgrund der Kenntnis der molekulargenetischen Veränderungen entwickelt wurden, gilt der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib. Der Inhibitor fungiert als ATP-Kompetitor, der intrazellulär um die Bindungsstelle der Tyrosinkinase-Domäne konkurriert [14]. Neben ABL blockiert Imatinib auch andere Tyrosinkinasen wie den c-Kit- und den PDGF-Rezeptor, so dass weitere Signalwege in der Tumorzelle gestoppt werden können [15].

Auch zur Behandlung der Brustkrebserkrankung konnte ein Medikament entwickelt werden, das gezielt in einen molekularen Signalweg eingreift, der aufgrund einer genetischen Aberration fehlerhaft reguliert ist. In bis zu 30% der Mammakarzinome kann eine bis zu 100fache Amplifikation des *HER2*-Gens diagnostiziert werden. Damit einher geht auch die Überexpression des HER2/NEU-Proteins, das infolgedessen vermehrt auf der Oberfläche der Tumorzellen vorkommt. Das *HER2*-Gen ist auf Chromosom 17q21 lokalisiert und gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR), die insgesamt vier Mitglieder umfasst. Bei den Rezeptorproteinen handelt es sich um transmembrane Glykoproteine, deren zytoplasmatische Domäne eine Tyrosinkinase-Aktivität entfalten kann. Durch Bindung eines Liganden an den enzymatischen Rezeptor kommt es zu einer

Autophosphorylierung von zytoplasmatischen Tyrosinresten. Die dadurch erhöhte Kinaseaktivität bewirkt, dass nachgeschaltete Proteine in der Signalkaskade vermehrt phosphoryliert werden, was das Wachstumsverhalten, die Differenzierung und das Überleben einer Zelle beeinflussen kann [16]. Vermutlich hat die vermehrte Transkription des *HER2*-Gens eine proliferative Wirkung auf die Tumorzellen [17]. Patienten mit HER2/NEU-positiven Tumoren besitzen eine ungünstigere Prognose für den Krankheitsverlauf, denn eine Überexpression korreliert mit einer geringeren Überlebensrate und einem verkürzten krankheitsfreien Überlebensintervall [18-20]. Speziell für diese Patienten wurde mit Trastuzumab ein zielgerichtetes Medikament entwickelt. Trastuzumab ist ein humanisierter, monoklonaler Antikörper, der an den HER2-Rezeptor bindet und seit dem Jahre 2000 auf dem Arzneimittelmarkt zugelassen ist. Durch die Antikörperbindung an den Rezeptor kommt es zu einer Internalisierung und Degradierung des Rezeptors. Das hat eine verminderte Signaltransduktion zur Folge, was den Arrest im Zellzyklus und dieApoptose in der Tumorzelle fördert [21, 22]. Zudem wird durch die Bindung die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität durch das Immunsystem aktiviert, so dass natürliche Killerzellen die Tumorzelle lysieren können [23-25]. In Kombination mit anderen Chemotherapeutika wird dieser Antikörper bei metastasierten, HER2-positiven Mammakarzinomen erfolgreich eingesetzt. Das Medikament erhöht auch die Wirksamkeit anderer Chemotherapeutika, die sonst bei HER2-positiven Tumoren in der Regel weniger Therapieerfolge zeigen [16]. Obgleich Trastuzumab zunächst nur bei Patienten mit fortgeschrittenem, metastasierendem, HER2-positivem Mammakarzinom erfolgreich eingesetzt wurde, zeigten nachfolgende Studien, dass bereits die postoperative, adjuvante Behandlung mit Trastuzumab, auch in Kombination mit Chemotherapie, die Rückfallquote der Krebserkrankung reduzieren und damit das Überleben der Patienten verlängern konnte [26, 27]. Daher erhielt Trastuzumab im Mai 2006 die Zulassung, so dass der Wirkstoff bei Patienten mit HER2-positiven Brusttumoren bereits im Frühstadium nach einer Operation und einer Standard-Chemotherapie eingesetzt werden kann (Medieninformation der Firma Roche, 24. Mai 2006).

1.4 Zielsetzung der Arbeit:

Identifikation neuer therapeutischer Zielstrukturen auf der Oberfläche von disseminierten Tumorzellen

Bislang wurden therapeutische Zielstrukturen wie auch die Auswahl der Patienten für eine zielgerichtete Therapie an den Zellen des Primärtumors identifiziert. Da aber disseminierte Tumorzellen, die als Zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark von Tumorpatienten detektiert werden können, für die Bildung neuer Metastasen verantwortlich sind, sollten neue Therapien direkt für diese Vorläuferzellen der Metastasen entwickelt werden [28]. Dabei sollten diese Zielstrukturen zum einen spezifisch bei Tumorzellen nachgewiesen werden können, zum anderen sollte dem Vorkommen der Zielstrukturen, wie bei BCR-ABL und HER2/NEU, ein genetischer Defekt zugrunde liegen. Sollte der genetische Defekt zu Neoepitopen auf der Tumorzelloberfläche führen, wäre sowohl eine spezifische Detektion als auch eine tumorzellspezifische Therapie möglich. Ein derartiger Mechanismus könnte bei einer Deletion des Insulin-like Growth Factor 2 Rezeptors (IGF2-Rezeptors) und der membranständigen Expression lysosomaler Proteasen vorhanden sein. Häufig konnte nämlich bei diversen epithelialen Tumoren einerseits ein Verlust von Chromosom 6q, der Genort des IGF2-Rezeptors [29-31], andererseits das Vorkommen von lysosomalen Proteasen auf der Tumorzelloberfläche beobachtet werden [32]. Interessanterweise konnte dieser 6q-Verlust ebenso in disseminierten Tumoreinzelzellen detektiert werden, die im Knochenmark von Mammakarzinompatienten gefunden wurden [8].

Basierend auf diesen Beobachtungen wird in der vorliegenden Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass eine Deletion des IGF2-Rezeptors zu einer membranständigen Expression von lysosomalen Proteasen, nämlich den Cathepsinen führt. Somit sollte die Deletion des IGF2-Rezeptors als genetische Aberrationen auf Chromosom 6q bei disseminierten Tumorzellen identifiziert und als Folge dieser genetischen Veränderung Cathepsine als neue Zielstrukturen auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

1.4.1 Lysosomale Cathepsine

Als erste lysosomale Cystein-Protease wurde Cathepsin C (Dipeptidyl Peptidase I) um 1940 entdeckt [33]. Etwa 30 Jahre später konnten drei weitere Enzyme, nämlich Cathepsin B, H und L, gefunden werden. Erst in den 1990er Jahren konnte neben der Entdeckung weiterer Cathepsine auch deren physiologische Rollen zunehmend aufgeklärt werden [34].

Die als Cathepsine (griechisch: kathepsein = verdauen) bezeichneten Proteasen sind in der Zelle hauptsächlich in den Lysosomen, aber auch in sekretorischen Vesikeln zu finden, wo sie am Proteinabbau bzw. der Prozessierung von Hormonen beteiligt sind [35, 36]. Zudem gehören viele physiologische Prozesse, wie Knochenumbildung und Antigenpräsentation, zu ihren Aufgaben [37, 38]. Cathepsine scheinen aber auch eine maßgebliche Rolle bei der Tumorprogression und Metastasierung zu spielen, da sie bei der Degradierung der extrazellulären Matrix, dem Tumorwachstum, der Invasion, Migration und Angiogenese beteiligt sind [39-43]. Bei diesen pathogenen Prozessen treten die lysosomalen Proteasen, wie beispielsweise Cathepsin B auf der Tumorzelloberfläche auf [32, 42], während sie normalerweise nach der Synthese mit Hilfe des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors in die Lysosomen sortiert werden.

Der Weg der Cathepsine in der Zelle vom Endoplasmatischen Retikulum in die Lysosomen wird maßgeblich über den Mannose-6-Phosphat-Weg reguliert. Die am rauen Endoplasmatischen Retikulum synthetisierten Enzyme gelangen zunächst in das cis-Kompartiment des Golgi-Apparats. Hier werden die Mannosereste der lysosomalen Enzyme phosphoryliert. Im trans-Golgi-Netz erfolgt bei neutralem pH-Wert eine Bindung zwischen dem Mannoserest und dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor. Der Bindungskomplex aus Rezeptor und phosphoryliertem Enzym wird in ein Vesikel eingeschlossen und entfernt sich aus dem Golgi-Netz. Diese Vesikel fusionieren mit dem späten Endosom, in dem der pH-Wert nur noch 5,5 beträgt. Aufgrund des sauren Millieues in diesen Organellen löst sich die Bindung zwischen Rezeptor und Enzym, das zudem von einer Phosphatase dephosphoryliert wird. Rezeptor und Enzym gelangen nun in jeweils getrennten Vesikeln zu ihren unterschiedlichen Zielen. Der Rezeptor gelangt entweder zurück zum Golgi-Apparat oder an die Zelloberfläche, die Vesikel hingegen, welche die Enzyme beinhalten, fusionieren schließlich mit den Lysosomen. Somit übernimmt der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor die

entscheidende Rolle bei der korrekten Sortierung der lysosomalen Enzyme vom Golgi-Apparat in die Lysosomen, wobei eine fehlerhafte Sortierung eine extrazelluläre Anhäufung der Enzyme zufolge hat [44].

1.4.2 Die Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren

Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren sind dafür verantwortlich, dass neu synthetisierte lysosomale Enzyme vom Golgi-Apparat zu den Lysosomen transportiert werden. Dafür stehen zwei Rezeptoren zur Verfügung, die aufgrund ihrer molekularen Masse in den MPR 46 (46000 Dalton) und MPR 300 (300000 Dalton) unterschieden werden können und die in ihrer Funktion teilweise redundant zu sein scheinen [45, 46]. Hier soll allerdings nur der Genlokus des MPR 300, der hinsichtlich seiner Bindungseigenschaften auch als Insulin-like Growth Factor Rezeptor (IGF2-Rezeptor) bezeichnet wird, untersucht werden. Der IGF2-Rezeptor ist ein transmembranes Glykoprotein, das sich hauptsächlich in intrazellulären Kompartimenten, wie dem trans-Golgi-Netz und den Endosomen, befindet. Nur 5-10% des Rezeptors können auf der Zelloberfläche gefunden werden [47]. Neben seiner Hauptaufgabe, der Sortierung der lysosomalen Enzyme in die Lysosomen, fungiert er als Rezeptor für den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor (Insulin-like Growth Factor 2, IGF2), was zur Degradierung des Wachstumsfaktors führt. Durch Bindung des Transformierenden Wachstumsfaktors β (Transforming Growth Factor-β, TGF-β) wird er in seiner Funktion als Wachstumsinhibitor aktiv [47-49]. Der Rezeptor kann dadurch die Verfügbarkeit der Wachstumsfaktoren regulieren und somit auch als ein Tumorsuppressor betrachtet werden [50]. Allelverluste und/oder Mutationen im *IGF2*-Rezeptor-Gen konnten bei Karzinomen der Brust, Leber, Lunge, Kopf- und Halsbereich sowie bei gastrointestinalen Tumoren nachgewiesen werden, was zum Teil auch mit einer schlechteren Prognose einhergeht [51-55].

1.4.3 Der Zusammenhang von IGF2-Rezeptor und Cathepsin

Aufgrund der Funktion des IGF2-Rezeptors, der korrekten Sortierung der lysosomalen Enzyme vom Golgi-Apparat in die Lysosomen, und der beobachteten erhöhten Expression und Aktivität von lysosomalen Proteasen bzw. Cathepsinen

in Tumorzellen [56], könnte ein direkter Zusammenhang zwischen einem Rezeptorverlust und sezerniertem Cathepsin vermutet werden. Zudem wird diese Vermutung dadurch unterstützt, dass die genomische Lokalisation des Rezeptors auf Chromosom 6q25 in einer Region liegt, in der bei disseminierten Tumorzellen ein vermehrter genomischer Verlust durch komparative Genom Hybridisierung (CGH) ermittelt werden konnte.
Diese Beobachtungen bezüglich des IGF2-Rezeptors und der Cathepsine führten zur Hypothese, die Ausgangspunkt dieser Arbeit war, dass ein Verlust bzw. eine Mutation mit nachfolgendem Funktionsverlust des IGF2-Rezeptors eine erhöhte Oberflächenexpression von Cathepsinen auf Tumorzellen zu Folge hat.

1.5 Überprüfung der aufgestellten Hypothese

Um die hier aufgestellte Hypothese zu überprüfen, sollte bei disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark von Mammakarzinompatienten auf Chromosom 6q eine Deletion des *IGF2*-Rezeptors nachgewiesen werden. Mögliche Allelverluste in dieser Region sollten mit der Allelverlust-Analyse untersucht werden. Für die Detektion dieser minimalen chromosomalen Aberrationen sollten disseminierte Tumorzellen verwendet werden, die in der komparativen Genom Hybridisierung (CGH) auf Chromosom 6q keinerlei genetische Veränderungen aufwiesen, da somit Regionen oder Gene identifiziert werden können, die als frühzeitige genetische Veränderungen in allen Tumorzellen auftreten.
Parallel dazu sollte geprüft werden, ob bei einem Verlust dieser chromosomalen Region auch Cathepsine als lysosomale Proteasen auf der Oberfläche von Tumorzellen auftreten, da bereits eine erhöhte Expression von lysosomalen Proteasen als mRNA sowie als Protein anhand von Immunfluoreszenzfärbungen in Zytokeratin-positiven Zellen gefunden wurde. Der Nachweis für Cathepsine auf der Oberfläche von Tumorzellen sollte mit Hilfe von Immunfluoreszenz sowohl durch Mikroskopie als auch durch Durchflusszytometrie erfolgen.

2 Material

2.1 Enzyme

Alu I.....New England BioLabs, Frankfurt
APAAP .....Dako, Hamburg
Bsr I.....New England BioLabs, Frankfurt
DNA-Polymerase I (*E. coli*) .....New England BioLabs, Frankfurt
DNA-Polymerase I (*E. coli*) .....New England BioLabs, Frankfurt
Expand Long Template .....Roche, Mannheim
HpyCH4 III .....New England BioLabs, Frankfurt
Hpy188 I.....New England BioLabs, Frankfurt
Kpn I.....New England BioLabs, Frankfurt
Mse I 50 U/µl.....New England BioLabs, Frankfurt
Mwo I .....New England BioLabs, Frankfurt
Nsi I.....New England BioLabs, Frankfurt
Proteinase K.....Roche, Mannheim
Sau96 I.....New England BioLabs, Frankfurt
T4 DNA Ligase .....Roche, Mannheim
Taq-Polymerase.....Roche, Mannheim

2.2 Oligonukleotide

CK 19 5' ..... GAA GAT CCG CGA CTGGTA C
CK 19 3' ..... TTC ATG CTC AGC TGT GAC TG

D6S308 5'..... GCC TTG GAG AGA ATT TCA CGT A
D6S308 3'..... GGC CTC ATA GTC TAA TCA ACT G

D6S311 5'..... AAT TCT CAT CCT TCC AAC CTC
D6S311 3'..... GAT TCA GAG CCC AGG AAG AT

D6S314 5'..... TAA TCC ACT TCC TTG ACC TAG
D6S314 3'..... CTT CCC AGG TGA TTC TCA TG

D6S975 5'..... TAA AAC ATA TCC ACT TGC ACA TAA A
D6S975 3'..... GGG TGA GAT GGG AAT CAT GT

D6S1626 5'..... TTG GAA AAC TTT TTG GCA GA
D6S1626 3'..... GAA AGA GAT TGC CGA TTA CCA

D6S1633 5'..... CTC ATG GAG CTT ATA GCC TG
D6S1633 3'..... TGT TCC TTC TGG CTA GCA TG

ddMSE11..... TAA CTG ACA G-didesoxy C

LIB1..... AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT

TP53 exon 2/3 5' ..... GAA GCG TCT CAT GCT GGA TC
TP53 exon 2/3 3' ..... CAG CCC AAC CCT TGT CCT TA

rs920812 5'..... GCC ACT GTC GAA GTC TGC A
rs920812 3'..... GGA TCT TGG TAC CAC TCA TG

rs161064 5'..... AAG GCA GTG TCA TCA AAT ATC AG
rs161064 3'..... CCT CAG TAG GAT TGT CCA CT

rs1342646 5'..... TTT CTG CAT GCT TCA CCT AA
rs1342646 3'..... AAG CCA GAA ACA GAA ATC ATC AA

rs1934534 5'..... CTC ACT GTG TCT CCT CTC TA
rs1934534 3'..... CCT TCC AAA TAA ATC AGG GTC

rs2234693 5'..... ATG AAC CAC CAT GCT CAG TC
rs2234693 3'..... CAA CTC TAG ACC ACA CTC AG

rs2268443 5'..... GCT ATA AAT CCA GGC ACT TGT
rs2268443 3'..... TAG GTT ACA GTG TGC TTT CAG

rs3777675 5'..... AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT
rs3777675 3'..... CTC ATT GGG CAT TCA GTG TG

rs3822903 5'..... TAA GAT AGG CTT TCC ATA CAG CA
rs3822903 3'..... TAT AAC TAA TAA AGG ATT GGA GGT GGA

rs7741506 5'..... ACT GAA CAG AGC AGG TCT AC
rs7741506 3'..... TGT GAG AAA GAC TTG GAG TTC

rs8191962 5'..... CTG TTC TAT GCC TTT AGT CAG
rs8191962 3'..... CAA ATC AAT CTT TGG GCA GG

rs9390141 5'..... TGA CTC CTC TTC TCG GGC A
rs9390141 3'..... AGG GTG AGT TGT GAG AAG TC

2.3 Antikörper

Antikörper-spezifität	Isotyp	Klon	Verwendete Verdünnung oder Konzentration	Bezugsquelle
anti-human Zytokeratin 8,18,19 (monoklonal)	Maus IgG1	A45 B/B3	2 µg/ml	Micromet, München
anti-human Cathepsin B (monoklonal)	Maus IgG2a	3E1	5 µg/ml	Acris, Hiddenhausen
anti-human Cathepsin B	Kaninchen (polyklonal)		1:200	Dr. Weber, Jena
anti-human Cathepsin B Biotin-konjugiert	Kaninchen (polyklonal)		15 µg/ml	Dr. Weber, Jena
anti-human Cathepsin D	Kaninchen (polyklonal)		1:100	Dr. Weber, Jena
anti-human Cathepsin S	Kaninchen (polyklonal)		1:100	Dr. Weber, Jena
anti-human Cathepsin H	Kaninchen (polyklonal)		1:100	Dr. Weber Jena
anti-human CD3	Maus IgG2a	X35	5µg/ml	Immunotech, Marseille
anti-human EMMPRIN	Maus IgG2a		1:750	Dr. V. Horejsi, Prag
anti-human Vimentin	Maus IgG1	V9	10 µg/ml	Dako, Hamburg
anti-Kaninchen IgG Biotin-konjugiert	Ziege		2,75 µg/ml	Dako, Hamburg
anti-Maus Ig RPE-konjugiert	Kaninchen		10 µg/ml	Dako, Hamburg
anti-Maus IgG	Kaninchen		1:20	Dako, Hamburg
anti-Maus IgG, Fcγ Cy3-konjugiert	Ziege $F(ab')_2$		10 µg/ml	Dianova, Hamburg
anti-Biotin Streptavidin Cy3-konjugiert			1,8 µg/ml	Dianova, Hamburg

Antikörper mit irrelevanter Spezifität	Klon	Verwendete Verdünnung oder Konzentration	Bezugsquelle
Maus IgG1	MOPC-21	5 µg/ml	Sigma, Deisenhofen
Maus IgG2a	UPC-10	5 µg/ml	Sigma, Deisenhofen

2.4 Zelllinien

Mammakarzinomzelllinien:

BT20

Cal 51

CAMA

MCF-7

SkBr 3

T47 D

Lungenkarzinomzelllinien:

A549

HTB 174

HTB 177

HTB 178

Hämatopoietische Tumorzelllinien:

HL-60 (akute promyelozytische Leukämie)

Mono-Mac-6 (akute monozytische Leukämie)

U-937 (histiozytisches Lymphom)

Jurkat (akute T-Zell-Leukämie)

Nierenkarzinomzelllinie:

RCC26

Immortalisierte Nierenzelllinie:

NN26

2.5 Chemikalien und Biochemikalien

AB-Serum	Biotest, Dreieich
Acrylamid 30%	BioRad, München
Agarose	Sigma, Deisenhofen
APS	Pharmacia Biotech, Schweden
ATP	Roche, Mannheim
BCIP/NBT (AP Color Reagent)	BioRad, München
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA für PCR	Roche, Mannheim
DAPI	Roche, Mannheim
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Amersham Biosciences, Freiburg
DNA-Größenmarker	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Eisessig 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol unvergällt	JT Baker, Griesheim
Ethanol vergällt	Roth, Karlsruhe
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Formaldehydlösung (mind. 37%)	Merck, Darmstadt
L-Glutamin (100x)	PAA, Linz, Österreich
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HBSS	Sigma, Deisenhofen
Igepal	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaninchenserum	Southern Associates Biotechnologie, Inc., Birmingham (USA)
LPS	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Sigma, Deisenhofen
NS-196	Geschenk von Dr. Norbert Schaschke
One-Phor-All Buffer Plus	Amersham Biosciences, Freiburg
Orange G	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Linz (Österreich)
Paraformaldehyd	Merk, Darmstadt
PMA	Sigma, Deisenhofen
RPMI ohne L-Glutamin	PAA, Linz (Österreich)
SYBR® Gold	Molecular Probes, Leiden, (Niederlande)
TEMED	Amersham Biosciences, Freiburg
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA (10x)	PAA, Linz (Österreich)
Wasser (LiChrosolv für Chromatographie)	Merck, Darmstadt

2.6 Geräte

Brutschrank BB 6220	Heraeus, Hanau
CCD-Kamera (Agarose-Gel)	INTAS, Göttingen
Fluoreszenzdurchflusszytometer	FACScan, BD Biosciences, Heidelberg
FluorImagerSI vistra Fluorescence (PAA-Gel)	Molecular Dynamics, Sunnyvale (USA)
Fluoreszenzmikroskop DMXA-RF8	Leica, Wetzlar
Hämatocytometer *Neubauer Zählkammer*	Leica, Wetzlar
Invertmikroskop	Leica DM IRB, Wetzlar
Mikromanipulator Microinjector 5242	Eppendorf, Hamburg
PCR-Maschine PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Biozym, Oldenburg
Spannungsquelle EPS 200 (Agarose-Gel)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Spannungsquelle (PAA-Gel)	LKB Bromma (Schweden)
UV-Schirm	INTAS, Göttingen

2.7 Verbrauchsmaterialien

Baysilone Paste	Bayer, Leverkusen
Bind-Silane	Pharmacia Biotech (Schweden)
Deckgläser	Langenbrinck, Teningen
Facsröhrchen 1,2ml Microtubes Loose NS	Alpha Laboratories, Hamshire (UK)
Falcon-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Filterpipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg
Glas-Küvetten	Roth, Karlsruhe
Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Kammerobjektträger (8 well)	Nunc, Rochester (USA)
Mehrfachkulturschalen Costar 24-Loch	Vitaris, Baar
Mikropipetten	Gilson, Middleton (USA)
Mikrotiterplatten (96-Loch-Platte)	TPP, Trasadingen (Schweiz)
Objektträger (Mattrand)	Langenbrinck, Teningen
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 200 µl Thermo-Fast 96	Abgene, Hamburg
Repel-Silane	Amersham Biosciences AB, Uppsala (Schweden)
Transferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen	Nunc, Rochester (USA)
Zellkultur-Kammer-Objektträger	Nunc, Rochester (USA)

2.8 Puffer und Lösungen

PBS-Puffer	Na_2HPO_4	8,5 mM
	KH_2PO_4	2 mM
	NaCl	150 mM
	pH 7,4	
TBE-Puffer:	Tris	89 mM
	Borat	89 mM
	EDTA	2 mM
	pH 8,3	
FACS-Puffer:	PBS-Puffer pH 7,4	
	NaN_3	0,01%
Agarose-Gel Ladepuffer:	Ficoll 400	6,25 g
	BPB + XF	375 µl
	(Bromphenolblau 10 µg + Xylencyanol 10 µg in 1 ml H_2O)	
	TBE 1 x	25 ml
PAA-Gel Ladepuffer:	Formamid	5 ml
	BPB + XF	250 µl
	(Bromphenolblau 10 µg + Xylencyanol 10 µg in 1 ml H_2O)	
	EDTA 0,5 M	100 µl

3 Methoden

3.1 Immunfluoreszenz-Färbungen gegen Cathepsin B

3.1.1 Kultivierung der verwendeten Zelllinien

Für den Nachweis der Oberflächenexpression der lysosomalen Proteasen wurden die Mammakarzinomzelllinien BT 20, Cal 51, CAMA, MCF-7, SkBr 3 und T 47-D verwendet. Zudem wurden die Bronchialkarzinomzelllinien A549, HTB 174, HTB 177, HTB 178, sowie die Nieren(karzinom)zelllinien RCC26 und NN26 gefärbt. Neben diesen epithelialen, adhärent wachsenden Zellen wurden die hämatopoietischen Tumorzelllinien HL-60, Jurkat, Mono-Mac-6 sowie U-937 verwendet. Alle Zelllinien wurden in 80 cm^2 Zellkulturflaschen mit RPMI-Medium mit Zusatz von 5% L-Glutamin, 10% FCS und 2% Penecillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert.

3.1.2 Kultivierung der Zelllinien in Zellkultur-Kammerobjektträger

Um die epithelialen Zelllinien in Kammerobjektträger zu kultivieren, wurden die in der Kulturflasche möglichst konfluent gewachsenen Zellen zunächst mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst und mit PBS gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer wurde das Volumen mit einer Zellzahl von 10000 Zellen mit Medium auf ein Gesamtvolumen von 1600 µl gebracht. Von dieser Zellsuspension wurden je 200 µl in die acht Kammern des Kammerobjektträgers pipettiert. Die Inkubation der Zelllinien in den Kammerobjektträgern erfolgte in den Körbcheneinsätzen autoklavierter Metallboxen, deren Boden mit autoklaviertem PBS vollständig bedeckt wurde. Damit wurde ein für die ausgesäten Zellen zu trockenes Klima während der folgenden Inkubationszeit von 48 h verhindert.

3.1.3 Färbung epithelialer Tumorzelllinien in Kammerobjektträgern

Vor der Antikörperfärbung wurde das Medium aus den Kammern durch Abklopfen entfernt. Pro Kammer wurden 50 µl der Antikörperverdünnung zugegeben. Nach 15 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der Primärantikörper wieder durch Abklopfen entfernt und anschließend dreimal mit 100 µl 10% AB-PBS mit 0,01% NaN_3 gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe der entsprechenden Sekundärantikörper. Auch hier wurden 50 µl der Antikörperverdünnung in die jeweiligen Kammern gegeben. Die Sekundärantikörper wurden für 15 min inkubiert, ehe sie durch dreimaliges Waschen mit je 100 µl 10% AB-PBS mit 0,01% NaN_3 wieder entfernt wurden. In den Ansätzen mit biotinylierten Sekundärantikörpern erfolgte noch die Zugabe von 50 µl des Fluorochroms Streptavidin-Cy3 für 15 min bei Raumtemperatur. Die Kammern mit bereits abgeschlossener Antikörperfärbung wurden während der dritten Inkubationszeit mit 10% AB-PBS mit 0,01% NaN_3 im entsprechenden Volumen befüllt, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern.
Alle verwendeten Antikörper wurden stets in 10% AB-PBS mit 0,01% NaN_3 verdünnt (verwendetet Verdünnung oder Konzentration siehe 2.3).

Tabelle 1: Verwendete Antikörper und Fluorochrome für die Immunfluoreszenzfärbung epithelialer Tumorzelllinien in Kammerobjektträger

Primärantikörper	Sekundärantikörper	Fluorochrom
Kaninchen anti-human Cathepsin B	Ziege anti-Kaninchen IgG-Biotin	Streptavidin-Cy3
Kaninchen anti-human Cathepsin D		
Kaninchen anti-human Cathepsin S		
Kaninchen anti-human Cathepsin H		
Kaninchen IgG (Serum) (Negativkontrolle)		
Maus anti-human Zytokeratin 8, 18, 19	Ziege anti-Maus IgG-Cy3	
Maus anti-human EMMPRIN (M6/2)		
Maus IgG1 (Isotypkontrolle)		

Nach der letzten Inkubationszeit und anschließendem dreimaligen Waschen wurde zusätzlich eine DAPI-Färbung durchgeführt, um das Auffinden der Zellen unter dem Mikroskop zu erleichtern. Dazu wurde in einem Volumen von 10 ml PBS 0,1 µl DAPI gelöst. Nach dem Entfernen der Kammertrennwände und des Bodengummis wurden etwa 2 ml der angesetzten DAPI-Lösung möglichst homogen verteilt auf die Objektträger pipettiert. Die Inkubation mit DAPI erfolgte

für 2 min im Dunkeln. Unmittelbar danach wurden die gefärbten Objektträger zum Waschen in eine Küvette mit PBS gestellt und abschließend mit Gelatine eingedeckelt. Die Auswertung der gefärbten Objektträger erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

3.1.4 Antikörper-Färbung membrangebundener Cathepsine für die FACS-Analyse

3.1.4.1 Etablierung einer Positivkontrolle durch Stimulation monozytärer Zelllinien

Um eine Positivkontrolle für die Cathepsin B-Antikörperfärbung zur Verfügung zu haben, wurden die in Suspension wachsenden Monozyten Mono-Mac-6, HL 60 und U-937 mit dem Phorbolester Phorbol 12-Myristinsäure 13-Acetat (PMA) oder Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert. Lipopolysaccharid ist eine Membrankomponente Gram-negativer Bakterien und führt zu einer Differenzierung von Monozyten zu Granulozyten. Ebenso kann durch die Behandlung mit PMA oder LPS eine erhöhte mRNA-Expression und Sekretion von Cathepsin B auf der Zelloberfläche induziert werden [57]. Zudem konnte gezeigt werden, dass aus Monozyten gereifte Makrophagen Cathepsin B, L und S sezernieren [58].
Für die Suspensionsfärbung wurden je 1 x 10^5 Zellen in einem Volumen von 200 µl Medium pro Loch einer 96-Loch-Platte mit V-Boden ausgesät. Um die optimale Stimulationskonzentration zu bestimmen, wurden die Zelllinien jeweils mit 100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml LPS stimuliert. Die Konzentration des Stimulans PMA betrug 62,5 ng/ml, 125 ng/ml und 250 ng/ml bzw. 50 ng/ml, 620 ng/ml sowie 6200 ng/ml. Die stimulierten Zellen wurden für 24 h oder 48 h im Brutschrank inkubiert. Als Negativkontrolle wurden in jeder Platte unstimulierte Zellen mitgeführt.

3.1.4.2 Generierung von Sphäroiden adhärent wachsender Zelllinien

Da das Ablösen adhärent wachsender Zellen aus Kulturflaschen mit Trypsin/EDTA auch die vorhandenen Oberflächenmoleküle zerstören kann, besitzt diese Behandlung möglicherweise eine Auswirkung auf die nachfolgende Detektion membranständiger Moleküle. Durch die Generierung von nicht-adhärenten

Sphäroiden konnte eine Anheftung der Zellen verhindert und eine Trypsin/EDTA-Behandlung vermieden werden. Dazu mussten zunächst 24-Loch-Platten mit Agarose ausgekleidet werden. Bei der verwendeten Agarose handelte es sich um eine Low-melt-Agarose, von der eine 4%ige, über Nacht gequollene und anschließend autoklavierte Stocklösung in 1 x PBS hergestellt wurde. Pro Platte wurden 6 ml vorgewärmtes Medium ohne FCS mit 2 ml geschmolzener Agarosestocklösung luftbalsenfrei gemischt. Pro Loch wurden nun zügig 300 µl der Agaroselösung zugegeben. Die 24-Loch-Platte wurde verschlossen und anschließend in möglichst gleichmäßigen Bewegungen in Form einer Acht geschwenkt, so dass sämtliche Löcher der Platte konvex bis zum Rand mit der Agarose ausgekleidet wurden.

Die für die Sphäroide verwendeten Zellen stammten aus einem konfluent gewachsenen Zellkulturrasen, der mit Trypsin/EDTA abgelöst und anschließend mit Medium auf 1 x 10^5 Zellen/ml verdünnt wurde. Pro Loch wurde ein Volumen von 1 ml der Zellsuspension ausgesät und die Platte für mindestens 24 h im Brutschrank inkubiert. Alle Zelllinien zeigten schon nach wenigen Stunden eine lockere Kumulation der Zellen in der Mitte der Vertiefungen. Um ein zu starkes Aneinanderhaften der Zellen im Zuge einer vollständigen Sphäroidbildung zu verhindern, wurde die Inkubationszeit auf maximal 48 h beschränkt. Die nur lockeren Zellkomplexe konnten problemlos mit einer Einmalpipette resuspendiert werden, so dass für die anschließende Antikörperfärbung wieder Einzelzellen vorlagen.

3.1.4.3 Antikörperfärbung

Die Cathepsin B-Färbung der monozytären sowie der Mamma- und Bronchialkarzinomzelllinien wurde jeweils in den Vertiefungen einer 96-Loch-Platte durchgeführt. Nachdem die Sphäroide vereinzelt worden waren, wurde die Zellzahl bestimmt und 1 x 10^5 Zellen pro Färbeansatz in die Vertiefungen pipettiert. Zum Waschen wurden in die jeweiligen Löcher der Platte ca. 50 µl PBS zugegeben und bei 4°C und 1500 rpm für 3 min zentrifugiert. Das Medium aus den Vertiefungen wurde durch schnelles, schwungvolles Abkippen entfernt. Die Resuspension der Zellen erfolgte durch kurzes Vortexen der 96-Loch-Platte. Die Primärantikörper und das Fluorochrom wurden nun in einem Volumen von jeweils

50 µl/well in folgenden Konzentrationen in 10% AB-PBS mit 0,01% NaN_3 verdünnt. Die Zellen wurden mit dem Primärantikörper und dem Fluorochrom für etwa 1 h im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Zwischen den beiden Inkubationszeiten und am Ende der Färbung wurden die Zellen mit 150 µl PBS gewaschen. Nach der abschließenden Zentrifugation, dem Abkippen des Überstandes und der Resuspension durch kurzes Vortexen wurden die Zellen mittels Multikanalpipette in einem Volumen von 200 µl PBS aufgenommen und vollständig in 1,2 ml Röhrchen überführt. Bis zur FACS-Analyse wurden die Proben auf Eis im Dunkeln aufbewahrt.

Färbeansatz für polyklonalen Kaninchen anti-human Cathepsin B-Antikörper:

Primärantikörper	**Fluorochrom**
Kaninchen anti-human Cathepsin B-bio	Streptavidin-Fitc
Ziege anti-Kaninchen IgG-bio (Negativkontrolle)	

Färbeansatz für monoklonalen Maus anti-human Cathepsin B-Antikörper:

Primärantikörper	**Fluorochrom**
Maus anti-human Cathepsin B	Ziege anti-Maus IgG-Cy3 oder alternativ Kaninchen anti-Maus Ig-RPE
Maus IgG2a (UPC 10) (Isotypkontrolle)	

3.1.4.4 Nachweis der Cathepsin-Oberflächenbindung durch einen speziellen Inhibitor

Als Alternative zur Antikörperfärbung wurde zur Detektion des Cathepsin B auch ein spezifischer Inhibitor verwendet. Für die Etablierung einer Positivkontrolle wurden Zellen der Zelllinie Jurkat mit dem Antikörper Maus anti-human CD3 stimuliert. Die Stimulation erfolgte in einer 96-Loch-Platte wie unter Abschnitt 3.1.4.1 beschrieben. Als Stimulus wurden 10 µg/ml Maus anti-human CD3 in HBSS eingesetzt. Als Folge der Antikörperbindung an den T-Zell-Rezeptor kommt es im Zuge der Immunabwehr neben einer Aktivierung der Caspasen auch zu einer rezeptorvermittelten granulären Exocytose. Bei diesem Mechanismus werden Perforin und Granzyme ausgeschüttet, die zur Apoptose einer Zielzelle führen können. Unter den sezernierten Enzymen befindet sich unter anderem das lysosomale Enzym Cathepsin B. Diesem Prozess obliegt der Schutz der T-Zellen

vor der eigenen Lyse durch die von ihnen selbst freigesetzten Enzyme [59, 60]. In einer Stimulationsreihe wurden die Jurkat-Zellen für je 2 h, 5 h und 12 h im Brutschrank inkubiert, um so die optimale Stimulationsdauer für eine Cathepsin B-Oberflächenexpression zu ermitteln. Auch hier wurden als Negativkontrollen jeweils unstimulierte Zellen mitgeführt.

Die Bindung des CD3-Antikörpers an die Zellen wurde anhand einer Färbung kontrolliert. Dazu wurden aus der 96-Loch–Platte, in der die Stimulation erfolgte, Zellen nach einer Inkubationszeit von 45 min entnommen und in die Vertiefungen einer neuen Platte überführt. Nach 3-minütiger Zentrifugation und anschließender Resuspendierung wurden die Zellen mit je 200 µl 10% AB-PBS mit 0,01% NaN_3 pro Loch gewaschen. Nach wiederholter Zentrifugation und Resuspendierung wurde ein Cy3-konjugierter Ziege anti-Maus IgG-Cy3 Antikörper in einer Konzentration von 10 µg/ml in einem Volumen von 50 µl 10% AB-PBS mit 0,01% NaN_3 zugegeben. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt für 45 min bei 4°C. Nach dem Waschen und erneutem Resuspendieren wurden die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen und vollständig in 1,2 ml Röhrchen überführt. Im unmittelbaren Anschluss wurde die Oberflächenfärbung am Durchflusszytometer gemessen. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nicht mit anti-CD3, sondern nur mit dem Sekundärantikörper behandelt wurden.

Der Inhibitor NS-196, der auf einem biotinylierten Epoxysuccinyl-Peptid basiert, bindet spezifisch an Cathepsin B. Da die Zellmembran für den Inhibitor nicht permeabel ist, eignet sich NS-196 zur Detektion von Cathepsin B auf der Zelloberfläche. Als Positivkontrolle für die Cathespin B-Färbung wurden die mit Maus anti-human CD3 stimulierten T-Zellen der Zelllinie Jurkat verwendet. Die Färbung der in der 96-Loch-Platte behandelten Zellen wurde wie unter Abschnitt 3.1.4.3 beschrieben durchgeführt. Der biotinylierte Inhibitor, der an das auf der Oberfläche sezernierte Cathepsin B bindet, wurde in einer Konzentration von 1 µM in HBSS eingesetzt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit HBSS erfolgte die Zugabe von 1,8 µg/ml Streptavidin-Cy3 für 45 min auf Eis. Nach erneutem Waschen mit HBSS wurden Zellen mit 200 µl PBS in ein 1,2 ml Röhrchen überführt und im unmittelbaren Anschluss mittels Fluoreszenzdurchflusszytometrie analysiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nicht mit dem Inhibitor, sondern nur mit dem Streptavidin-Cy3-Konjugat behandelt wurden.

3.1.4.5 Fluoreszenzdurchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Mit Hilfe der Fluoreszenzdurchflusszytometrie können die Größe und die Granularität von Zellen bestimmt werden. Über eine direkte oder indirekte Bindung von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern an die Zelloberfläche wird eine Analyse hinsichtlich ihrer Oberflächenbeschaffenheit ermöglicht.

Im Gerät werden die Zellen in ihrer Trägerflüssigkeit einzeln an einem Argon-Ionen-Laserlichtstrahl (488 nm) mit einer Saugleistung von 12 (low) bzw. 60 µl/min (high) vorbeigeleitet. Passiert eine Zelle den Laser, hat dies eine Streuung des Lichtstrahls zur Folge. Durch das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) kann somit die Größe der Zelle analysiert werden, wobei das Seitwärtsstreulicht (sideward scatter, SSC) das Maß der Granularität anzeigt. Mit Hilfe dieser Parameter können daher sowohl verschiedene Zellpopulationen als auch die Beschaffenheit der Zellen, wie tote Zellen oder Zelltrümmer, anhand ihrer Granularität ermittelt werden.

Fluorochrome, die auf der Zelloberfläche gebunden vorliegen, werden durch Anregung (Excitation) auf ein höheres energetisches Niveau gebracht. Dabei wird beim Zurückfallen auf das ursprüngliche Niveau Energie in Form eines Photons wieder abgegeben (Emission). Je nach verwendetem Fluoreszenzfarbstoff unterscheidet sich die Wellenlänge der Emission. Dieses Licht, das eine längere Wellenlänge als die Excitation besitzt, ist detektierbar, wenn ein entsprechender Filter im Bereich der maximalen Emission liegt.

Die Messung der Cathepsin B-Oberflächenfärbung wurde an dem Zellsorter *FACScan* der Firma *BD* durchgeführt. Die Auswertung der Messung erfolgte mit der Software *CellQuest (BD Biosciences, Heidelberg).*

3.2 Allelverlust-Analysen Zytokeratin-positiver Einzelzellen

3.2.1 Kontroll- und Patientenkollektive

3.2.1.1 Kontrollkollektive

Kontrollzellen gesunder Probanden:
Für die Allelverlust-Analysen wurde ein Kontrollkollektiv aus normalen Einzelzellen und Zellpools angefertigt. Das Kontrollzellkollektiv gesunder Probanden umfasste insgesamt 21 Normaleinzelzellen von vier Personen mit jeweils einem Zellpool. Das durchschnittliche Alter der Probanden betrug 29 Jahre. Dieses Kontrollkollektiv normaler Zellen von gesunden Probanden wurde als Vergleichsgruppe zu den disseminierten Tumorzellen der Patienten angelegt. Desweiteren wurden die Zellen des Kontrollkollektivs auch gefärbt, um zu testen, ob das Farbpräzipitat einen direkten Einfluss auf die PCR-Amplifikation hat.

3.2.1.2 Aufarbeitung peripherer Blutlymphozyten von Testpersonen

Von vier gesunden Probanden wurde je 20 ml Blut abgenommen. Das Blut wurde in einem 50 ml Falcon-Gefäß langsam auf die schon vorgelegten 20 ml einer Ficoll-Lösung pipettiert und anschließend 30 min bei 2300 rpm und 25 °C zentrifugiert. Die sich nun in der Interphase befindlichen peripheren Blutlymphozyten konnten mit einer Pipette aufgenommen und in ein neues Falcon-Gefäß überführt werden. Nach Zugabe von 25 ml PBS zum Waschen und anschließender, 5-minütiger Zentrifugation bei 1500 rpm und Raumtemperatur konnte der Überstand dekantiert werden. Das Pellet wurde daraufhin resuspendiert. Nach der Zugabe von 1,8 ml PBS wurde in einem Gesamtvolumen von 2 ml die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellzahl im Falcon-Gefäß wurde auf eine Konzentration von 10^6/ml verdünnt. Auf die Haftobjektträger wurde pro Areal das entsprechende Volumen von 500000 Zellen aufgetragen. Nach ca. 1 h Sedimentationszeit der Zellen konnte das PBS abgekippt und die Haftobjektträger über Nacht getrocknet werden. Bis zur Antikörperfärbung fand eine Lagerung der Objektträger im Kühlschrank bei 4°C statt.

3.2.1.3 Vimentin-Antikörperfärbung der Kontrollzellen

Für die Färbung der peripheren Blutlymphozyten wurde das mesenchymale Zytoskelettprotein Vimentin gewählt. Die Färbung wurde zum einen durchgeführt, damit auch die Kontrollzellen der gleichen Behandlung unterzogen wurden wie die Patientenzellen. Zum anderen konnte somit überprüft werden, ob das Färbepräzipitat Einfluss auf die DNA-Amplifikation der Zellen hat.
Zu Beginn der Färbung fand eine Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit 10% AB-PBS für etwa 45 min statt. Dafür wurden 500 µl der Blockierlösung pro Zellareal pipettiert. Nach Abkippen der Lösung erfolgte die 30-minütige Inkubation des Antikörpers gegen Vimentin in einer Konzentration von 10 µg/ml in 250 µl 10% AB-PBS. Als Isotypkontrolle wurden 5 µg/ml Maus IgG1 (MOPC 21) in entsprechendem Volumen eingesetzt. Zum Waschen wurden die Objektträger für 3 x 3 min in Glasküvetten mit PBS gestellt. Die Zellen wurden mit dem Brückenantikörper Kaninchen anti-Maus Immunglobulin in einer Verdünnung von 1:20 für 30 min inkubiert. Nach dem Waschen in der Küvette wie oben beschrieben wurde der alkalische Phosphatase anti-alkalische-Komplex (APAAP) in einer Verdünnung von 1:100 für 30 min auf die zu färbenden Areale pipettiert. Während dieser Inkubationszeit wurde die BCIP-Lösung vorbereitet. Für je ein Färbeareal wurden 250 µl 1 x AP-Puffer mit je 10% Lsg. A, Lsg. B und Lsg. H des AP Conjugate Substrate Kit entsprechend der Herstellerangaben angesetzt und filtriert, um eventuelle Kristalle zu entfernen. Nachdem die Objektträger wiederum für 3 x 3 min gewaschen worden waren, wurde die Färbung für 10 min mit dem BCIP-Komplex entwickelt. Nach dem erneuten Waschen erfolgte eine 10-minütige Fixierung der Färbung in einer Küvette mit 1,35 ml Formaldehydlösung (mindestens 37%) in 100 ml PBS. Ein abschließendes Waschen mit PBS beendete die Färbung. Die gefärbten Haftobjektträger verblieben in einer mit PBS gefüllten Küvette bis zur Isolierung der gefärbten Zellen mit dem Mikromanipulator. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Zeitraum zwischen dem Färben und der Zellisolierung maximal 2 Tage betrug.

3.2.1.4 Isolierung der Einzelzellen

Mit Hilfe eines Mikromanipulators an einem Invertmikroskop wurden mit einer Glaskapillare einzelne Zellen vom Objektträger isoliert. Dazu wurde das gefärbte

Areal mit 0,5 % Tween in 1 x PBS bedeckt, die gefärbte Zelle unter mikroskopischer Beobachtung einzeln aufgenommen und in ein neues Feld mit 1 x PBS und 0,5 % Tween überführt. Die so isolierte Zelle wurde in einem Volumen von 1 µl mit einer Pipette in ein 200 µl Gefäß überführt, in dem ein Reaktionsgemisch (2 µl) mit Proteinase K vorgelegt worden war.

Proteinase K-Verdau :

0,2 µl	One-Phor-All plus-Puffer
0,13 µl	Tween 10 %
0,13 µl	Igepal 10%
0,26 µl	Proteinase K 10 mg/ml
1,28 µl	H_2O

Der Verdau der Proteine durch die Proteinase K erfolgte für 10 h bei 42°C in der PCR-Maschine. Eine anschließende 10-minütige Erwärmung auf 80°C führte zur gewünschten Inaktivierung des Enzyms.

3.2.1.5 Einzelzell-PCR

Nach dem Proteinase K-Verdau der isolierten Einzelzellen wurde die genomische DNA durch das Enzym Mse I geschnitten. Dazu wurde in das Reaktionsgefäß mit der Proteinase K-verdauten Zelle folgender Ansatz pipettiert:

Mse I-Verdau:

0,2 µl	OneForAll plus Puffer
0,2 µl	Mse I (10 U/µl)
1,6 µl	H_2O

Während einer Inkubationszeit von 3 h bei 37°C entstanden DNA-Fragmente mit der Mse I-Schnittstelle T / TAA. Danach wurde das Enzym durch eine 5-minütige Erwärmung auf 65°C inaktiviert.

Unterdessen wurden Adaptoren für die spätere Ligation an die Mse I-Fragmente generiert. Dafür wurden die Oligonukleotide LIB 1 und ddMSE 11 in einem Reaktionsgefäß hybridisiert. Dies erfolgte in einem Reaktionsgemisch bestehend aus 0,5 µl OnePhorAll plus Puffer, jeweils 0,5 µl LIB 1 (100 µM) und ddMSE 11 (100 µM) sowie 1,5 µl H_2O. Die Hybridisierungsreaktion fand in der PCR-Maschine bei einer Temperaturabsenkung von 1°C/min von 65°C auf 15°C statt.

Für die Ligation der Adaptoren an die Mse I-Fragmente wurden je 1 µl ATP (10 mM) und T4 DNA-Ligase (5 U) in das Reaktionsgefäß mit den hybridisierten Adaptoren pipettiert. Aus diesem Reaktionsgemisch wurden 5 µl zu den Mse I-verdauten Zellen gegeben. Nach der Ligation über Nacht bei 15 °C wurde für die primäre PCR folgender Ansatz in die Reaktionsgefäße pipettiert:

1 x Ansatz für die primäre PCR:

3 µl	Expand-Long-Template Puffer1
2 µl	dNTPs 10 mM
35 µl	H_2O
1 µl	Expand-Long-Template PolMix 3,5 U/ml

Die gesamten genomischen DNA-Fragmente wurden in der PCR-Maschine wie folgt amplifiziert:

Programm der primären Amplifikation:

Temperatur	Dauer	Zyklen
68°C	3 min	1
94°C	40 sec	15
57°C	30 sec	
68°C	1 min 30 sec + 1 sec/Zyklus	
94 °C	40 sec	8
57°C-65°C	30 sec + 1°C/Zyklus	
68 °C	1 min 45 sec + 1 sec/Zyklus	
94°C	40 sec	22
65°C	30 sec	
68°C	1 min 53 sec + 1 sec/Zyklus	
68°C	3 min 40 sec	1

Diese primären PCR-Produkte der Einzelzellen bzw. Zellpools wurden anschließend reamplifiziert, da alle nun folgenden, spezifischen Amplifizierungen jeweils nur mit den Reamplifikaten der primären PCR durchgeführt wurden.

Ansatz der Reamplifikation:

5 µl	Lib1 (10 µM)
5 µl	Expand-Long-Template Puffer1
1,75 µl	dNTPs (10 mM)
1,25 µl	BSA
0,5 µl	Expand-Long-Template PolMix 3,5 U/ml
36,5 µl	H_2O
1 µl	Zell-DNA (primäres PCR-Produkt)

Die Reamplifizierung erfolgte nach folgendem PCR-Programm:

Temperatur	Dauer	Zyklen
94°C	1 min	1
60°C	30 sec	1
72°C	2 min	1
94°C	30 sec	10
60 °C	30 sec	
72°C	2 min + 20 sec/Zyklus	

Um die erfolgreiche Reamplifizierung der primären PCR-Produkte zu überprüfen, wurde anschließend eine spezifische Kontroll-PCR mit den Fragmenten der Gene *KRT19* und *TP53* durchgeführt. In das Kontrollkollektiv wurden, wie bei den Patientenzellen, nur Zellen aufgenommen, die für mindestens eine Kontroll-PCR eine positive Amplifizierung aufwiesen.

Die spezifische Amplifikation wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

7,25 µl	H_2O
1 µl	Puffer (10 mM MgCl2, 100 mMTris pH 8,5, 500 mM KCl, 1mM dNTPs)
0,5 µl	5' Primer
0,5 µl	3' Primer
0,25 µl	BSA
0,1 µl	PanTaq

Kontrollzellen von Patienten:

Neben dem bisherigen Kollektiv der Kontrollzellen, das ausschließlich aus jungen Probanden bestand, wurde ein weiteres Kollektiv verwendet, dessen Personen ein Durchschnittsalter besaß, das dem der zu untersuchenden Tumorpatienten

entsprach. Dieses Kontrollkollektiv bestand aus 53 Zytokeratin-negativen Einzelzellen aus dem Knochenmark von 34 Patienten mit malignen, epithelialen Tumoren. Als Positivkontolle fungierte je ein Zellpool pro Patient. Von den Einzelzellen und den Zellpools der Kontrollen standen bereits die primären Amplifikate der genomischen DNA zur Verfügung, so dass nur noch die Reamplifikate generiert werden mussten. Ebenso wurden die spezifischen Kontrollamplifikationen auf die Gene *KRT19 und TP53* durchfgeführt, so dass wiederum nur diejenigen Zellen in das Kontrollkollektiv aufgenommen wurden, die bei mindestens einer PCR ein positives Amplifikat aufwiesen. Die Häufigkeit der Allelverluste bei den Kontrollzellen der jungen Probanden und der Patienten mit epithelialen Tumoren wurden mittels Fisher's Exact Test sowie χ^2-Test verglichen.

3.2.1.6 Patientenkollektiv

Das für die Allelverlust-Analysen verwendete Patientenkollektiv bestand aus 43 Mammakarzinompatienten mit insgesamt 57 Zytokeratin-positiven Einzelzellen, deren CGH-Profil bereits zur Verfügung stand [8]. Alle aus dem Knochenmark der Patienten stammenden Zellen wurden nach der bereits oben erwähnten Methode isoliert und gegen den epithelialen Marker Zytokeratin gefärbt. Von allen Patienten war neben den Einzelzellen auch ein Zellpool aus ca. 10^6 Zellen vorhanden, der häuptsächlich aus Zytokeratin-negativen Zellen bestand. Anhand der DNA dieses Zellpools war es möglich, die Homo- oder Heterozygosität bestimmter Allele einer Person zu bestimmen. Da im Gegensatz zu einer einzelnen Zelle ein Allelverlust ausgeschlossen werden konnte, diente dieser Zellpool als Positivkontrolle. Das Genom der Zytokeratin-positiven Einzelzellen und des Normalzellpools wurde dem Protokoll entsprechend aufgearbeitet. Nur Einzelzellen bzw. Zellpools, die in mindestens einer der spezifischen Kontroll-PCRs positiv waren, wurden in das Patientenkollektiv aufgenommen. Zellen, die in der CGH-Analyse eine Veränderung auf Chromosom 6q aufwiesen, wurden aus dem Kollektiv ausgeschlossen. Alle Zellen bzw. Zellpools des Patientenkollektivs standen für die Allelverlust-Analyse bereits als Reamplifikate der primären PCR zur Verfügung. Die Zellen des Kollektivs waren nach Stadium der Erkrankung und anhand der bereits vorhandenen CGH-Analysen eingeteilt. Patienten, die zum Zeitpunkt der Knochenmarkaspiration keine Metastasen aufwiesen und deren

Zytokeratin-positive Zellen keine in der CGH detektierbaren Veränderungen zeigten, waren der Gruppe *M0/CGH-normal* zugeteilt. Patientenzellen mit aberrantem CGH-Profil und ohne Metastasierung waren mit *M0/CGH-aberrant* bzw. bei vorhandener Metastasierung mit *M1/CGH-aberrant* bezeichnet. Aufgrund der geringen Anzahl der Zellen, die über ein aberrantes CGH-Profil verfügten, wurden die Zellen in Gruppen eingeteilt. Demnach wurde das gesamte Patientenzellkollektiv unterschieden in die Gruppe der Zellen *M0/CGH-normal* und *M0* (Tabelle 2).

Tabelle 2: Bezeichnung und Einteilung der Zellen des Patientenkollektivs in Gruppen nach Stadium und CGH-Profil

Bezeichnung	**Erklärung**	**Anzahl der Patienten**	**Anzahl der Zellen**	**Gruppen**		
M0/ CGH normal	Patienten ohne Metastasen, Zellen ohne CGH-Aberration	31	38	*M0/ CGH-normal*	*M0*	*Zellen gesamt*
M0/ CGH aberrant	Patienten ohne Metastasen, Zellen mit CGH-Aberration*	5	8			
M1/ CGH aberrant	Patienten mit Metastasen, Zellen mit CGH-Aberration*	6	11			

* ausschließlich Zellen ohne 6q-Aberration

Eine Übersicht über das gesamte Patienten- und Kontrollkollektiv, anhand derer die Allelverlust-Analysen durchgeführt wurden, zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3: Übersicht über das gesamte Patienten- und Kontrollkollektiv

Patienten		**Kontrollen**	
Anzahl der Mammakarzinompatienten:	Anzahl der Zytokeratin-positiven Einzelzellen:	Anzahl der Probanden bzw. Patienten: Probanden: 4 Patienten: 34	Anzahl der Normaleinzelzellen: 21 53
42	57	38	74

3.2.2 Mikrosatelliten- bzw. Tetranukleotid-Polymorphismen und Allelverlust

Mikrosatelliten besitzen die Eigenschaft, aus 10 bis 50 Sequenzwiederholungen von einer bis zu sechs Basen zu bestehen. Statistisch gesehen kommt im Genom ein Mikrosatellit alle 15 kb vor (International Human Genome Sequencing Consortium 2001). Da diese Sequenzwiederholungen meist polymorph sind, macht man sich diesen Polymorphismus zu Nutze, um die beiden Allele im Genom zu detektieren, sofern sie informativ, d.h. heterozygot sind. Das ist der Fall, wenn die vererbten Allele von Mutter und Vater verschieden, also polymorph sind. Liegt ein Allelverlust in der heterozygoten Zelle vor, kann dies am Fehlen des entsprechenden PCR-Produkts des einen Allels detektiert werden. Bei den hier verwendeten Mikrosatelliten handelt es sich um Dinukleotid-Polymorphismen, das heißt CA-Wiederholungen, bei dem die Basenfolge unterschiedlich oft vorkommt, und um einen Tetranukleotid-Polymorphismus, bei dem eine Insertion oder Deletion der Basenfolge ACAA vorkommen kann.

3.2.2.1 Lokalisation der einzelnen Mikrosatelliten-Marker

Die verwendeten Polymorphismen sind auf Chromosom 6q23-25 lokalisiert, wobei die Dinukleotid-Wiederholungen meist intergenetisch, das heißt in nichtkodierenden Bereichen des Genoms liegen. Die zwei intragenetischen Marker bestehen zum einen aus einem Tetranukleotid-Polymorphismus, der in der 3' untranslatierten Region des *IGF2*-Rezeptors liegt und zum anderen aus einem Dinukleotid-Polymorphismus, der sich innerhalb von Intron 1 des Gens *SASH1* befindet.

Die Auswahl der polymorphen Marker richtete sich zum einen nach der möglichst hohen Wahrscheinlichkeit der zu erwartenden Heterozygosität, zum anderen nach der Länge des Mse I-verdauten DNA-Fragments, das den polymorphen Marker beinhaltet. Aufgrund von Erfahrungswerten werden optimale PCR-Bedingungen und somit erfolgreiche Amplifikationen meist erzielt, wenn das DNA-Fragment eine Länge von 200 bis 600 bp besitzt.

Die jeweiligen Bedingungen einer erfolgreichen Amplifizierung und die charakteristischen Daten der polymorphen Marker werden im Folgenden gesondert angeführt. Die Lokalisationen der Marker wurden der Datenbank

Ensembl entnommen. Aufgrund der variablen Längen der polymorphen Mikrosatelliten wird die Größe des PCR-Produktes entsprechend der vom *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* verfügbaren Sequenzen angegeben. Die tatsächliche Länge des PCR-Produkts ist somit einer Variabilität unterworfen, die von den jeweiligen Individuen abhängt. Die zu erwartende Heterozygosität wurden von der Datenbank des *Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH)* übernommen (Stand: Mai 2006).

Marker D6S308
Polymorphismus: CA-Wiederholungen
Heterozygosität: 61,54 %
Lokalisation: 141 298 417 – 141 298 615 bp
Primer: 5': GCC TTG GAG AGA ATT TCA CGT A
3': GGC CTC ATA GTC TAA TCA ACT G
Annealingtemperatur: 61°C
PCR-Produkt: 214 bp
Mse I-Fragment: 262 bp

Marker D6S311 (innerhalb Intron 1 von *SASH1*)
Polymorphismus: CA-Wiederholungen
Heterozygosität: 92,86%
Lokalisation: 148 731 454 – 148 731 678 bp
Primer: 5': AAT TCT CAT CCT TCC AAC CTC
3': GAT TCA GAG CCC AGG AAG AT
Annealingtemperatur: 58°C
PCR-Produkt: 160 bp
Mse I-Fragment: 405 bp

Marker D6S314
Polymorphismus: CA-Wiederholungen
Heterozygosität: 81,48 %
Lokalisation: 140 056 224 – 140 056 474 bp
Primer: 5': TAA TCC ACT TCC TTG ACC TAG
3': CTT CCC AGG TGA TTC TCA TG
Annealingtemperatur: 61°C
PCR-Produkt: 212 bp
Mse I-Fragment: 277 bp

Marker D6S975

Polymorphismus: CA-Wiederholungen

Heterozygosität: 78,57 %

Lokalisation: 133 588 066 – 133 588 272 bp

Primer: 5': TAA AAC ATA TCC ACT TGC ACA TAA A

3': GGG TGA GAT GGG AAT CAT GT

Annealingtemperatur: 58°C

PCR-Produkt: 151 bp

Mse I-Fragment: 163 bp

Marker D6S1626

Polymorphismus: CA-Wiederholungen

Heterozygosität: 71,43 %

Lokalisation: 136 323 958 – 136 324 167 bp

Primer: 5': TTG GAA AAC TTT TTG GCA GA

3': GAA AGA GAT TGC CGA TTA CCA

Annealingtemperatur: 58°C

PCR-Produkt: 215 bp

Mse I-Fragment: 584 bp

Marker rs8191962 (Insulin-like growth factor 2 receptor, IGF2R)

Polymorphismus: Tetranukleotid-Polymorphsimus (ACAA Deletion oder Insertion)

Heterozygosität: 42,4 %

Lokalisation: 160 497 314 – 160 497 317 bp

Primer: 5': CTG TTC TAT GCC TTT AGT CAG

3': CAA ATC AAT CTT TGG GCA GG

Annealingtemperatur: 58°C

PCR-Produkt: 131 bp

Mse I-Fragment: 356 bp

Die Angaben für Marker D6S1633 beziehen sich auf die im Jahre 2002 verfügbaren Daten. Mittlerweile ist der Marker D6S1633 nicht mehr in der Datenbank von *Ensembl* gelistet. Um die Vollständigkeit des gesamten Markerkollektivs zu wahren, wird hier auch der Marker D6S1633 aufgeführt, da er zu Beginn der Arbeit Verwendung fand.

Marker D6S1633
Polymorphismus: CA-Wiederholungen
Heterozygosität: 82%
Lokalisation: 174 673 776 bp
Primer: 5': CTC ATG GAG CTT ATA GCC TG
3': TGT TCC TTC TGG CTA GCA TG
Annealingtemperatur: 61°C
PCR-Produkt: 266 bp
Mse I-Fragment: 1445 bp

3.2.2.2 PCR der Mikrosatelliten-Marker

Für die spezifische PCR, wie sie für die LOH-Marker angewendet wurde, gilt allgemein folgender Ansatz:

7,25 µl	H_2O
1 µl	Puffer (10 mM MgCl2, 100 mMTris pH 8,5, 500 mM KCl, 1mM dNTPs)
0,5 µl	5' Primer
0,5 µl	3' Primer
0,25 µl	BSA
0,1 µl	PanTaq

Bei der spezifischen PCR wurde, wenn nicht anders angegeben, je Ansatz 0,5 µl vom DNA-Template des Reamplifikats eingesetzt. Alle Polymerase-Ketten-Reaktionen der polymorphen Marker konnten mit dem im Folgenden aufgeführten Programm amplifiziert werden. Die Marker D6S314, D6S308 und D6S1633, die jeweils CA-Dinukleotid-Polymorphismen besitzen, konnten mit einer Annealingtemperatur von jeweils 61°C amplifiziert werden. Für die erfolgreiche Amplifikation der Mikrosatelliten-Marker D6S311, D6S975 und D6S1626, die ebenso polymorphe CA-Wiederholungen beinhalten, und des

Tetranukleotid-Polymorphismus des Markers rs8191962 konnten jeweils eine Annealingtemperatur von 58°C ermittelt werden. In der nachstehenden Tabelle wird zunächst das PCR-Programm für die Amplifizierung der Marker angeführt.

Temperatur	Dauer	Zyklenanzahl
94°C	2 min	1
61°C	30 sec	1
72°C	2 min	14
94°C	15 sec	
58°C -61°C*	30 sec	
72°C	20 sec	
94°C	15 sec	24
61°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	2 min	1
4°C	∝	1

* die angegebene Temperaturspanne bezieht sich auf die jeweils ermittelten Temperaturen aller LOH-Marker. Die spezifische Annealingtemperatur für die Mikrosatelliten- und Single Nukleotid-Marker ist in den Punkten 3.2.2.1 bzw. 3.2.3.1 nachzuschlagen.

3.2.2.3 Auftrennung der Allele auf Polyacrylamidgelen

Die Auftrennung der in der PCR amplifizierten Allele erfolgte mit einem 7%igem Polyacrylamidgel (PAA-Gel). Grundlage dafür bildete eine 7%ige PAA-Stocklösung:

116,5 ml	Acrylamid (30%)
160 ml	Formamid
168 g	Harnstoff
50 ml	10 x TBE
ad 500 ml	H_20 dest.

Diese nach der Herstellung filtrierte Stammlösung wurde lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt. Um bei der Gelherstellung eine Polymerisation des Acrylamids zu erreichen, wurde APS als Radikalstarter und der Stabilisator TEMED benötigt.

Für das PAA-Gel wurden verwendet:

30 ml	PAA-Stammlösung
300 µl	10% Ammoniumpersulfat
20 µl	TEMED

Vor dem Gießen wurde je eine Platte mit Repel-Silane (2% Dimethyldichlorosilan in Octamethyl-cyclo-octasilane) bzw. mit 20% Bind-Silane (γ-Methacryloxy-propyl-trimethoxysilan), bestehend aus 50 ml EtOH (100%), 188 µl Bind-Silane und 10% Essigsäure behandelt. 500 ml Repel- bzw. 400 µl Bind-Silane mit 100 µl 10%iger Natriumacetatlösung wurden jeweils auf eine Glasplatte pipettiert und mit Papiertüchern gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden die Platten wieder mit 70%igem Alkohol gereinigt. Durch die Behandlung der Glasplatte mit Repel-Silane wurde die Oberfläche hydrophob, so dass das PAA-Gel später nicht an der Platte haften blieb. Entsprechend hatte das Einreiben der anderen Glasplatte mit Bind-Silane und Essigsäure zur Folge, dass auf dieser Oberfläche das PAA-Gel haften blieb. Das PAA-Gel wurde aus der PAA-Gelmischung zwischen zwei Glasplatten, die durch Abstandhalter nur etwa 0,1 mm getrennt waren, in leicht horizontaler Lage gegossen. Nach etwa 1 h war das Gel vollständig polymerisiert und wurde in die vertikale, mit 1 x TBE befüllte PAA-Gelapparatur eingespannt. Der Haifischzahnkamm wurde an der Oberseite in das Gel gesteckt.

Die PCR-Produkte, die sich in einem Volumen von 10 µl befanden, mussten zunächst mit 8 µl PAA-Gel Laufpuffer versehen und anschließend bei 95°C für 10 min denaturiert werden. Dann erfolgte die Beladung der Taschen, die jeweils von zwei Kammzähnen definiert wurden. Von jeder Probe wurden etwa 8 µl auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Tasche mit einem 50 kb DNA-Marker mit Laufpuffer geladen.

Je nach Fragmentlänge wurde das PAA-Gel bei etwa 1400 V für 1-2,5 h gefahren. Nach der Auftrennung der PCR-Produkte wurde das Gel aus der Apparatur genommen und die sich lösende Platte vorsichtig abgehoben. Die etwa 10-minütige Färbung des PAA-Gels erfolgte mit 4 ml SYBR® Gold in 30 ml 1 x TBE. Die gefärbten, im PAA-Gel aufgetrennten PCR-Produkte konnten dann mit einem FluorImager SI digital aufgenommen werden.

3.2.3 Single Nukleotid-Polymorphismen

Für die Allelverlust-Analyse wurden neben den Mikrosatelliten- auch Single Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) verwendet. Genomsequenzen mit SNPs werden dabei amplifiziert und die Polymorphismen mit Hilfe von geeigneten Restriktionsenzymen identifiziert. Das Schneiden des Fragments findet nur spezifisch an der entsprechenden Restriktionschnittstelle statt.

3.2.3.1 Lokalisationen der einzelnen SNPs

Im Folgenden sind die Informationen zu den für die Allelverlust-Analyse verwendeten Single Nukleotid-Polymorphismen und zu ihrer Amplifikation angeführt. Die Gene, welche die einzelnen SNPs beeinhalten, werden in Klammern angegeben. Für die Auswahl der SNP-Marker wurde nach den gleichen Kriterien verfahren wie bei den Mikrosatelliten-Markern, nämlich die Länge des Mse I-Fragments und der möglichst hohen Wahrscheinlichkeit der zu erwartenden Heterozygosität. Die genannte Rate an Heterozygosität der einzelnen Polymorphismen richtete sich nach den vom *NCBI* verfügbaren Informationen für die einzelnen SNP-Marker.

Marker rs920812 (Insulin-like growth factor 2 receptor; IGF2R)
Polymorphismus: ...CAGAT R CAGGTGGGGC... (R= A oder G)
Enzym: Mwo I
Restriktionssequenz: GCNNNNN / NNGC
Heterozygosität: 42,5%
Lokalisation: 160 460 725 bp
Primer: 5': GCC ACT GTC GAA GTC TGC A
3': GGA TCT TGG TAC CAC TCA TG
Annealingtemperatur: 58°C
PCR-Produkt: 217 bp
enzymatisch verdaute Fragmente: 139 bp + 78 bp
Mse I-Fragment: 647 bp

Marker rs161064 (Peroxisomal biogenesis factor 3, PEX3)

Polymorphismus: ...GTTCA Y TGGAT... (Y= C oder T)

Enzym: Bsr I

Restriktionssequenz: ACTGGN /

Heterozygosität: 46,5%

Lokalisation: 143 838 026 bp

Primer: 5': AAG GCA GTG TCA AAT ATC AG
3': CCT CAG TAG GAT TGT CCA CT

Annealingtemperatur: 59°C

PCR-Produkt: 152 bp

enzymatisch verdaute Fragmente: 93 bp + 59 bp

Mse I-Fragment: 392 bp

Marker rs1342646 (Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptor Typ K, PTPRK)

Polymorphismus: ...CATGC R TAAAG... (R= A oder G)

Enzym: Nsi I

Restriktionssequenz: ATGCA / T

Heterozygosität: 50%

Lokalisation: 128 163 347 bp

Primer: 5': TTT CTG CAT GCT TCA CCT AA
3': AAG CCA GAA ACA AAA TCA TCA A

Annealingtemperatur: 58°C

PCR-Produkt: 189 bp

enzymatisch verdaute Fragmente: 73 bp + 116 bp

Mse I-Fragment: 329 bp

Marker rs1934534 (Large Tumor Suppressor, Homolog 1, LATS1, (Drosophila))

Polymorphismus: ...GGGCC R CAGTA... (R= A oder G)

Enzym: HpyCH4 III

Restriktionssequenz: ACN / GT

Heterozygosität: 48,2%

Lokalisation: 150 125 146 bp

Primer: 5': CTC ACT GTG TCT CCT CTC TA
3': CCT TCC AAA TAA ATC AGG GTC

Annealingtemperatur: 58°C

PCR-Produkt: 216 bp

enzymatisch verdaute Fragmente: 75 bp + 141 bp

Mse I-Fragment: 336 bp

Marker rs2234693 (Estrogen Receptor 1, ESR1)

Polymorphismus: ...CCAGC Y GTTTT... (Y= C oder T)

Enzym: Alu I

Restriktionssequenz: AG / CT

Heterozygosität: 49,7 %

Lokalisation: 152 255 449 bp

Primer: 5': ATG AAC CAC CAT GCT CAG TC

3': CAA CTC TAG ACC ACA CTC AG

Annealingtemperatur: 58°C

PCR-Produkt: 254 bp

enzymatisch verdaute Fragmente: 200 bp + 54 bp

Mse I-Fragment: 361 bp

Marker rs2268443 (Pleiomorphic adenoma-like protein 1, PLAGL1)

Polymorphismus: ...TTCCA R CTTAC... (R= A oder G)

Enzym: Alu I

Restriktionssequenz: AG / CT

Heterozygosität: 48,6%

Lokalisation: 144 313 933 bp

Primer: 5': GCT ATA AAT CCA GGC ACT TGT

3': TAG GTT ACA GTG TGC TTT CAG

Annealingtemperatur: 58°C

PCR-Produkt: 185 bp

enzymatisch verdaute Fragmente: 123 bp + 62 bp

Mse I-Fragment: 377 bp

Marker rs3777675 (human_headcase, HECA)

Polymorphismus: ...CACTT S AGAAC... (S= C oder G)

Enzym: Hpy188 I

Restriktionssequenz: TCN / GA

Heterozygosität: 42,1 %

Lokalisation: 139 522 861 bp

Primer: 5': TTC ATG TGA TTC TGG GCA AA

3': CTC ATT GGG CAT TCA GTG TG

Annealingtemperatur: 61°C

PCR-Produkt: 182 bp

enzymatisch verdaute Fragmente: 126 bp + 56 bp

Mse I-Fragment: 263 bp

Marker rs3822903 (human_headcase, HECA)

Polymorphismus: ...TTGAG R GTCCA... (R= A oder G)

Enzym: Sau96 I

Restriktionssequenz: G / GNCC

Heterozygosität: nicht verfügbar

Lokalisation: 139 507 593 bp

Primer: 5': TAA GAT AGG CTT TCC ATA CAG CA

3': TAT AAC TAA TAA AGG ATT GGA GGT GGA

Annealingtemperatur: 61°C

PCR-Produkt: 150 bp

enzymatisch verdaute Fragmente: 117 bp + 33 bp

Mse I-Fragment: 151 bp

Marker rs7741506 (Phosphatase and actin regulator 2, PHACTR2)

Polymorphismus: ...GGTAC M ATGCC... (M= A oder C)

Enzym: Kpn I

Restriktionssequenz: GGTAC / C

Heterozygosität: 49,9%

Lokalisation: 143 993 560 bp

Primer: 5': ACT GAA CAG AGC AGG TCT AC

3': TGT GAG AAA GAC TTG GAG TTC

Annealingtemperatur: 58°C

PCR-Produkt: 205 bp

enzymatisch verdaute Fragmente: 48 bp + 157 bp

Mse I-Fragment: 239 bp

Marker rs9390141 (Phosphatase and actin regulator 2, PHACTR2)

Polymorphismus: ...CCAAC M CAGTG... (M= A oder C)

Enzym: HpyCH4 III

Restriktionssequenz: ACN / GT

Heterozygosität: 48%

Lokalisation: 144 174 969 bp

Primer: 5': TGA CTC CTC TTC TCG GGC A

3': AGG GTG AGT TGT GAG AAG TC

Annealingtemperatur: 59°C

PCR-Produkt: 179 bp

enzymatisch verdaute Fragmente: 49 bp + 130 bp

Mse I-Fragment: 255 bp

3.2.3.2 PCR der SNPs, enzymatischer Verdau und Auftrennung der Allele auf Agarosegelen

Die Amplifikation erfolgte unter den in 3.2.2.2 genannten Bedingungen. Nach der erfolgreichen Amplifikation der SNP-Fragmente wurde mit dem jeweiligen spezifischen Enzym verdaut, dessen Restriktionssequenz den SNP beinhaltet. Somit konnte je nach Vorhandensein der entsprechenden polymorphen Base das PCR-Produkt geschnitten werden. Der Verdau wurde in einem Gesamtvolumen von 30 µl durchgeführt. Entsprechend der Protokollvorgaben für das jeweilige Enzym wurde der Verdau angesetzt. Zu den jeweils 10 µl Volumen des PCR-Ansatzes wurden jeweils 3 µl des 10 x Enzympuffers und 10 Units des Restriktionsenzyms pipettiert. Falls BSA für die Reaktion erforderlich war, wurden zusätzlich 0,3 µl 100 x BSA beigegeben. Schließlich wurde das vorhandene Volumen mit H_2O auf 30 µl aufgefüllt. Der Verdau wurde daraufhin für 3 h bei 37°C, 60°C bzw. 65°C gemäß der Vorgaben für das jeweilige Enzym inkubiert.
Die potentiell verdauten PCR-Produkte wurden in der Gel-Elelektrophorese aufgetrennt. Dafür wurden die Ansätze mit jeweils 1 µl SYBR® Gold (Verdünnung 1:1600 in DMSO) und 2 µl Ladepuffer versehen. Die Taschen eines Agarosegels (2% Agarose in 1 x TBE) wurden jeweils mit dem gesamten Volumen der Verdaus befüllt. Die Auftrennung erfolgte bei 160 V und 400 mA je nach Fragmentlänge für ca. 1 h. Die DNA wurde auf einem UV-Schirm sichtbar gemacht und fotographiert.

3.2.4 Auswertung aller Allelverlust-Analysen

Um die Allelverluste sicher zu beurteilen, wurden die Einzelzellen und die dazugehörigen Zellpools jeweils nebeneinander auf das Polyacrylamid- oder Agarosegel aufgetragen. Somit konnte ein direkter Vergleich von (Tumor-) Einzelzelle und Zellpool als Positivkontrolle eines Patienten bzw. Probanden stattfinden. Ausgewertet wurden ausschließlich Personen, deren Zellpool zwei Allele aufwies, d. h. die heterozygot waren. Nur in diesem Fall kann nämlich ein Verlust eines Allels in der Einzelzelle aufgezeigt werden. Die Häufigkeit der Allelverluste aller Einzelzellen wurde bei den Kontrollgruppen mit Hilfe des χ^2–Tests verglichen. Die Ergebnisse der Allelverluste der Patientenzellen wurden mit dem Kontrollkollektiv anhand des Fisher's Exact Test verglichen.

Statistische Berechnungen erfolgten auf der Internetseite: http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html.

Mit den resultierenden p-Werten wurde anschließend eine Benjamini-Hochberg-Korrektur durchgeführt. Bei dieser Korrektur werden die p-Werte der einzelnen Vergleiche in absteigender Reihenfolge sortiert und anschließend mit einem Faktor, der aus dem Umkehrbruch der Anordnung in der nummerierten Reihenfolge der p-Werte besteht, multipliziert. Diese Korrektur ist notwendig, um die Fehlerrate beim Vergleich aller 16 LOH-Marker möglichst gering zu halten. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Genom- und Expressionsanalysen sowie Immunfluoreszenz bei disseminierten Tumoreinzelzellen

Die Resultate von Genom- und Expressionsanalysen Zytokeratin-positiver Einzelzellen aus dem Knochenmark von Mammakarzinompatienten bildeten die Grundlage der hier vorliegenden Arbeit. Mit Hilfe der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) wurde bei disseminierten Tumorzellen ein vermehrter Verlust von Chromosom 6q festgestellt [61] (Abbildung 1).

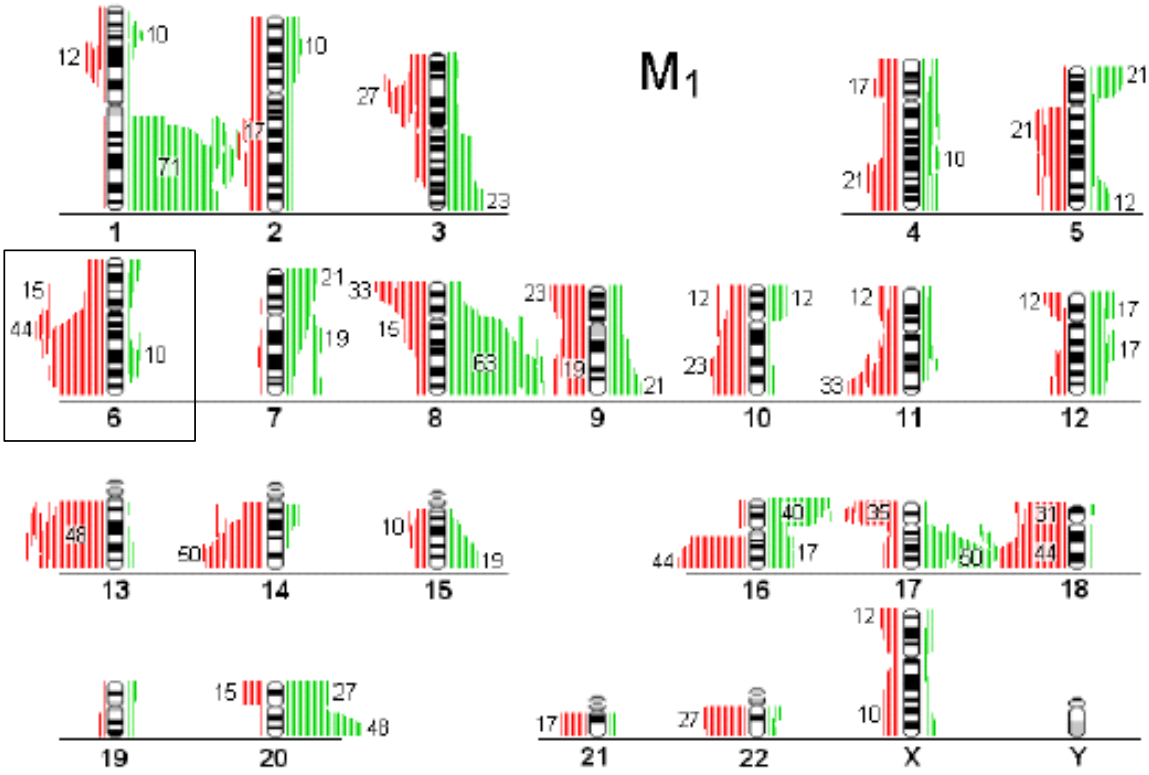


Abbildung 1: CGH-Profil mikrometastatischer Einzelzellen aus dem Knochenmark von Mammakarzinompatienten im Stadium M1 (modifiziert nach Schmidt-Kittler 2003)

Genomanalysen von disseminierten Einzelzellen zeigen einen vermehrten Verlust des Chromosoms 6q (rote Linien). Nur selten ist in diesem Bereich eine chromosomale Amplifikation nachgewiesen (grüne Linien). Die prozentualen Aberrationswerte sind neben den chromosomalen Loci vermerkt.

Zudem wiesen Zytokeratin-positive Einzelzellen in Expressionsanalysen, die auf Filterhybridisierungen basierten, eine erhöhte mRNA-Expression von Proteasen

auf. Dabei fielen besonders die Cathepsine B, D, S und H als Vertreter der lysosomalen Proteasen auf.

Auch durch Antikörperdoppelfärbungen konnten auf Zellen des Knochenmarks Zytokeratin-positive Zellen detektiert werden, die Cathepsin B, D, S oder H exprimierten (Abbildung 2).

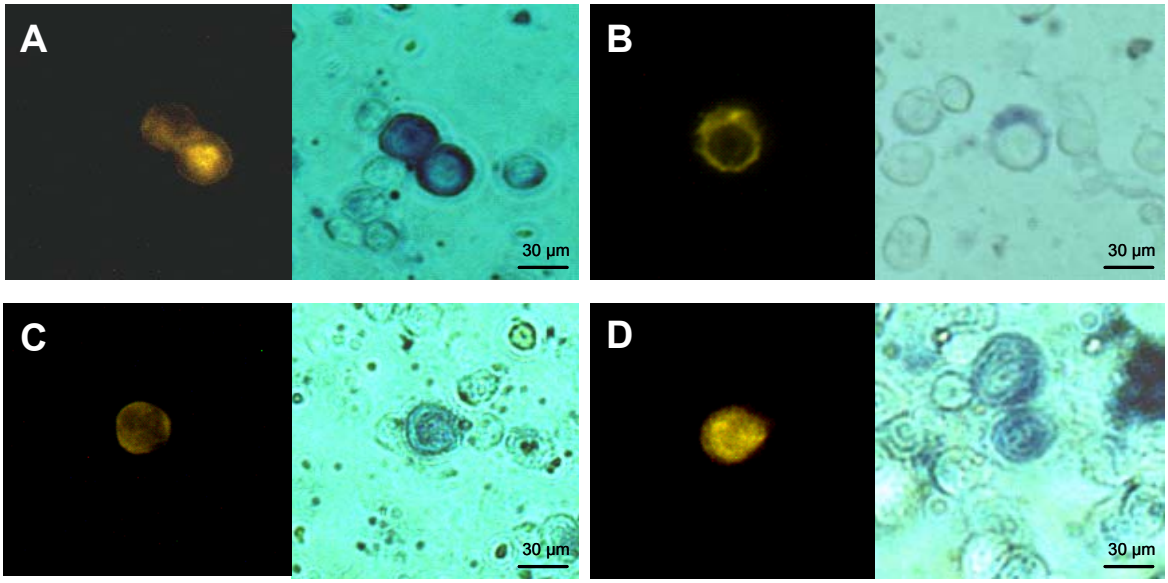


Abbildung 2: Antikörperdoppelfärbungen an Zellen aus dem Knochenmark von Mammakarzinompatienten

Zytokeratin-positive Tumorzellen aus dem Knochenmark wurden jeweils mit dem Fluorochrom Cy3 detektiert (A-D, linkes Bild). Sie zeigen (jeweils rechtes Bild) Cathepsin B (Bild A), membranständiges Cathepsin D (Bild B), Cathepsin H (Bild C) und Cathepsin S (Bild D).

Das Gen des IGF2-Rezeptors, der für die korrekte Sortierung der neu synthetisierten Proteasen vom Golgi-Apparat in die Lysosomen verantwortlich ist, ist auf Chromosom 6q lokalisiert. Bei Expressionsanalysen Zytokeratin-positiver Einzelzellen fehlte zudem oftmals die Expression des IGF2-Rezeptors.

Genomanalysen der disseminierten Einzelzellen zeigten zum einen häufig einen Verlust des Chromosoms 6q sowie eine fehlende Expression des IGF2-Rezeptors. Zum anderen wurde die erhöhte Expression von Cathepsinen festgestellt. Zwischen den Daten der Genom- und Expressionsanalysen sowie der Immunzytochemie kann somit der Zusammenhang hergestellt werden, dass die Deletion von Chromosom 6q und damit das Fehlen des IGF2-Rezeptors mit der erhöhten Expression von Cathepsinen einhergeht.

Demnach basiert die vorliegende Arbeit auf der Hypothese, dass ein Verlust des IGF2-Rezeptors zur Oberflächenexpression von Cathepsinen auf Tumorzellen führt. Der Nachweis für den möglichen Zusammenhang der fehlgeleiteten Proteasen an die Zelloberfläche und des deletierten *IGF2*-Rezeptorgens bildete den Ausgangspunkt für die nachfolgenden Experimente.

4.2 Detektion membranständiger Cathepsine

4.2.1 Immunfluoreszenz-Mikroskopie epithelialer Tumorzelllinien

Die Antikörperfärbung gegen die Cathepsine B, D, S und H wurde zunächst mit Zellininen ausgeführt, die 24 h zuvor in Kammerobjektträger ausgesät wurden. Bei jeder Färbung wurden jeweils sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen mitgeführt.

Immunfärbungen gegen Cathepsine sollten nicht deren intrazelluläre, lysosomale sondern die extrazelluläre, membranständige Lokalisation detektieren. Eine entsprechende Kontrolle über den Bindungsort der Antikörper wurde mit einem Antikörper gegen Zytokeratin, der je ein gemeinsames Epitop der intrazellulären Zytokeratine 8, 18 und 19 bindet, durchgeführt. Eine Antikörperbindung kann daher nur innerhalb der Zelle erfolgen. Die fehlende Antikörperbindung an die Zytokeratine gewährleistet somit eine intakte Zellmembran, so dass Antikörperbindungen ausschließlich auf der Zelloberfläche stattfinden können. Als Positivkontrolle fungierte das Oberflächenprotein EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer), das vermehrt auf der Oberfläche von Tumorzellen auftritt. Die Isotypkontrollen für Zytokeratin 8, 18, 19 und EMMPRIN wurden mit Maus IgG1 (MOPC 21), einem Antikörper mit unbekannter Spezifität eines Mineralöl-induzierten Plasmozytoms der Maus durchgeführt. Als Isotypkontrolle für die polyklonalen Antikörper gegen Cathepsin B, D, H und S wurde Kaninchen IgG Serum benutzt. Bei den Negativkontrollen war in den meisten Fällen keine Färbung erkennbar. Bei der Positivkontrolle EMMPRIN konnte immer ein sehr stark positives Signal festgestellt werden. Für die einzelnen Cathepsinfärbungen ergaben sich je nach Zelllinie und Cathepsin unterschiedliche Färbeintensitäten und Ergebnisse. Es zeigte sich, dass Cathepsin B die am häufigsten vorkommende Protease auf der Oberfläche darstellt, da alle analysierten

Tumorzelllinien eine Färbung aufwiesen. Mit Ausnahme von drei Zelllinien (BT 20, SkBr3, NN26) konnte Cathepsin H auf der Zelloberfläche detektiert werden. Die Expression von Cathepsin D konnte bei sechs Zelllinien in gut sichtbarer bzw. mäßiger Färbung gezeigt werden. Am seltensten gelang der Nachweis von Cathepsin S auf der Tumorzelloberfläche, denn nur die Zelllinien CAMA, SkBr3, HTB 174 und HTB 177 verfügten über extrazelluläres, membranständiges Cathepsin S. Die Mammakarzinomzelllinien CAMA und SkBr3 sowie die Bronchialkarziniomzelllinie HTB 177 zeigten für alle Cathepsine positive Färbeergebnisse. Wie bei den Mammakarzinomzelllinien BT 20 und MCF-7 konnte bei der immortalisierten Nierenzelllinie NN26 nur eine leichte, membranständige Cathepsin B-Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Diese Zelllinie wurde aus normalen Nierenzellen generiert, die durch Transformation Immortalität erlangten. Das Färbeergebnis für diese Normalzellen stand somit im Einklang mit den zuvor erhobenen Daten, dass Tumorzellen im Vergleich zu Normalzellen über eine erhöhte Cathepsin-Expression verfügen (Abbildung 3, Tabelle 4).

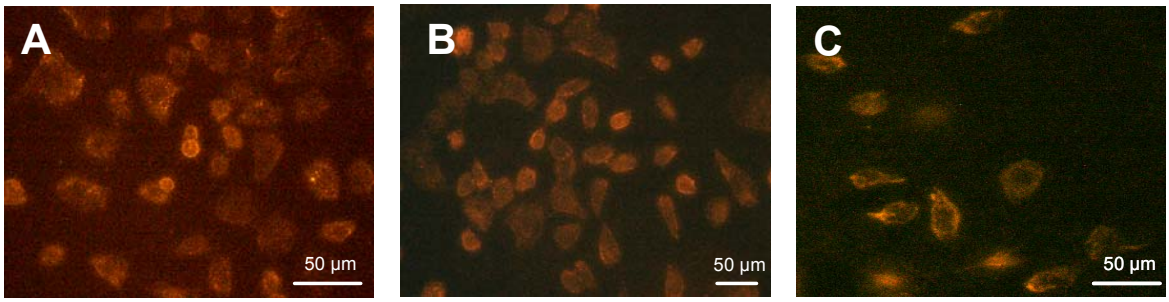


Abbildung 3: Cathepsin-Antikörperfärbungen auf der Brochialkarzinomzelllinie A549

Immunfluoreszenz mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gegen Cathepsin B (Bild A), Cathepsin D (Bild B) sowie Cathepsin H (Bild C). Der biotinylierte Sekundärantikörper wurde mit dem Fluorochrom Streptavidin Cy3 detektiert. Eine Bindung des Antikörpers gegen Zytokeratin konnte bei keiner Kontrollfärbung nachgewiesen werden. Diese Negativkontrolle gewährleistete, dass es sich bei der Immunfluoreszenzfärbung um die membranständige Detektion von Cathepsinen handelte.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse für die Antikörperfärbung gegen membranständiges Cathepsin auf den unterschiedlichen Zelllinien unter Angabe der jeweiligen Intensitäten der Färbungen: +++ stark gefärbt, ++ gut sichtbare Färbung, + mäßig gefärbt, (+) minimal gefärbt, - keine Färbung

Antikörper Zelllinie	Zyto-keratin*	Maus IgG1*	EMMPRIN*	IgG Serum+	Cath B+ pc	Cath D+ pc	Cath S+ pc	Cath H+ pc
A 549	-	-	+++	-	++	++	-	++
BT 20	-	-	+++	-	+	-	-	-
Cal 51	-	-	+++	+	++	-	-	+
CAMA	(+)	-	+++	-	++	++	++	++
MCF-7	-	-	+++	-	+	-	-	-
SkBr3	-	(+)	+++	-	+++	+	+	+
T-47D	-	(+)	+++	-	++	++	-	++
HTB 174	+	-	+++	-	(+)	+	(+)	(+)
HTB 177	-	-	+++	-	++	+	++	++
HTB 178	-	-	+++	-	+++	-	-	++
RCC 26	-	-	+++	-	++	-	-	++
NN26	-	-	+++	-	+	-	-	-

* Detektion mit Fluorochrom anti-Maus Cy3
+ Detektion mit anti-Kaninchen-Biotin und Fluorochrom Streptavidin Cy3

Nach einer Aufreinigung aller polyklonalen Antikörper gegen Cathepsin war es nicht mehr möglich, die Ergebnisse der Cathepsinfärbungen zu reproduzieren. Als erste Maßnahme wurden die Zellen vor der Färbung gemäß mehreren veröffentlichten Arbeiten über Cathepsin-Oberflächenfärbungen mit 4% PFA für ca. 5 min fixiert. Die daraus resultierende positive Färbung gegen Zytokeratin 8, 18 und 19 erlaubte allerdings keine Aussage mehr über eine Oberflächenexpression der Cathepsine, da eine intrazelluläre Färbung nicht ausgeschlossen werden konnte, sondern sehr wahrscheinlich wurde. Diese Oberflächenfärbung auf Zelllinien, die in Kammerobjektträgern kultiviert wurden, wurde daraufhin nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurde versucht, mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine quantitative Aussage über das Vorhandensein von membranständigem Cathepsin auf Tumorzellen zu erhalten. Da die Färbungen der Zelllinien in Kammerobjektträgern auf ein ubiquitär vorkommendes Cathepsin B

schließen ließen, beschränkten sich die nachfolgenden Immunfluoreszenz-Analysen ausschließlich auf Cathepsin B.

4.2.2 Immunfluoreszenz-Analysen anhand von Durchflusszytometrie

Die Verwendung von biotinylierten Primärantikörpern und mit einem Fluorochrom konjugierten Streptavidin kann die Intensität einer Färbung verstärken. Da der Primärantikörper durch das konjugierte Biotin mehrere Bindungsstellen für das Streptavidin bereitstellt, kann somit auch eine verhältnismäßig größere Anzahl von Fluorochromen an den primären Antikörper binden. Dies hat eine Intensivierung des Färbesignals zur Folge. Daher wurde der bis dahin verwendete polyklonale Kaninchen anti-human Cathepsin B-Antikörper biotinyliert. Neben dem nichtkonjugierten, polyklonalen Cathepsin B fand somit auch ein biotinylierter Antikörper gegen Cathepsin B Verwendung. Desweiteren kam ein monoklonaler Cathepsin B-Antikörper zum Einsatz.
Für Cathepsinfärbungen sollten die Zellen in Suspension vorliegen. Zum Ablösen der adhärent wachsenden Zelllinien wird üblicherweise Trypsin/EDTA verwendet. Da das Cathepsin aber mit dem Annexin-II-Tetramer an der Zelloberfläche assoziiert ist, löst EDTA als Chelator die Ca^{2+}-abhängige Bindung des Annexin-II-Tetramers zum Cathepsin. Nach dem Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA befindet sich die Protease im Überstand und kann somit nicht mehr als Oberflächenprotein auf der Zelle detektiert werden [43]. Um diesen Prozess der Ablösung zu umgehen, wurden die Zellen zunächst mit möglichst wenig EDTA abgelöst und aus der Zellsuspension Sphäroide generiert. Nach 24 h konnten die Zellen mittels Einmalpipette wieder vereinzelt werden und lagen für die Cathepsinfärbung wieder in Suspension vor, ohne unmittelbar vorher mit EDTA behandelt worden zu sein.

4.2.2.1 Überprüfung der Bindungsspezifität des biotinylierten Antikörpers

Um die Spezifität der Bindungseigenschaften nach der Biotinylierung des Cathepsin B-Antikörpers zu überprüfen, wurde eine Immunfluoreszenz-Analyse der verschiedenen Cathepsin B-Antikörper im Durchflusszytometer durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde die Zelllinie

SkBr3 für die Überprüfung ausgewählt, denn die Tumorzelllinie zeigte dabei eine starke Oberflächenexpression von Cathepsin B (vergl. Tabelle 4). Als Negativkontrolle für die Immunfärbung wurden periphere Blutlymphozyten einer gesunden Testperson gefärbt. Mit Hilfe des biotinylierten Antikörpers konnte auf der Zelloberfläche der Zelllinie SkBr3 Cathepsin B detektiert werden, wobei der Mittelwert der Fluoreszenz-Intensität (ΔMFI) 5,37 betrug. Anhand der FACS-Analyse wurde ebenso auf der Oberfläche peripherer Blutlymphozyten Cathepsin B nachgewiesen. Dabei konnten zwei Zellpopulationen definiert werden, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Fluoreszenz-Intensität der Färbung unterschieden werden konnten. Die größte Anzahl der Zellen besaßen einen ΔMFI von 0,23, während die kleinere Zellpopulation einen ΔMFI von 24,83 erreichte. Das Färbeergebnis beider Zellpopulationen zusammen resultierte in einem ΔMFI von 6,78. Damit überstieg dieser im FACS gemessene Wert der Fluoreszenz den Wert der Tumorzelllinie SkBr3 (Abbildung 4 A-B).

Aufgrund dieser Ergebnisse der Cathepsin B-Oberflächenfärbung auf der Tumorzelllinie SkBr3 und der peripheren Blutlymphozyten wurde die Färbung mit dem nicht konjugierten, polyklonalen und monoklonalen Cathepsin B-Antikörper wiederholt. Weder bei der Tumorzelllinie SkBr3 noch bei den peripheren Blutlymphozyten war eine Oberflächenexpression von Cathepsin B detektierbar (Abbildung 4 C-D).

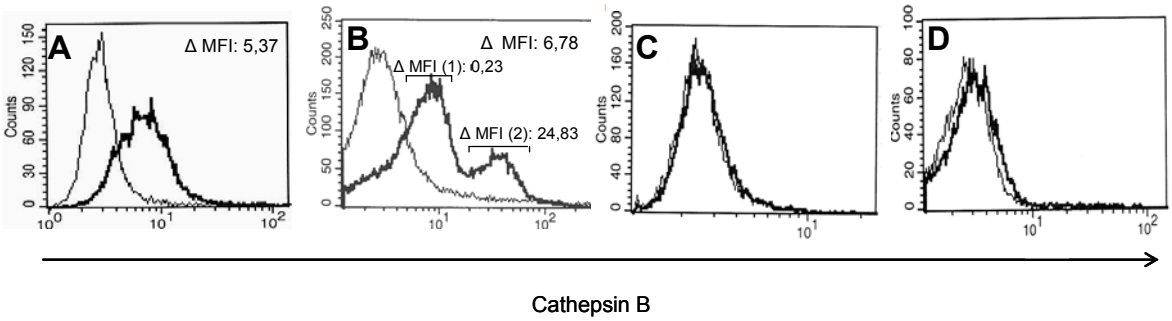


Abbildung 4: FACS-Analyse von membranständigem Cathepsin B mit Hilfe unterschiedlicher Cathepsin B-Antikörper auf der Zelllinie SkBr3 und peripheren Blutlymphozyten

Unspezifische Bindung des biotinylierten Cathepsin B-Antikörpers auf der Oberfläche der Mammakarzinomzelllinie SkBr3 (A) und auf peripheren Blutlymphozyten (B). Die Zellen der Zelllinie SkBr3 wurden ausgehend von lockeren Sphäroiden wieder zu einer Zellsuspension vereinzelt, um eine Trypsin/EDTA-Behandlung zu umgehen. Die Färbungen erfolgten mit polyklonalem, biotinyliertem Antikörper und FITC-konjugiertem Streptavidin (A-B). Die Zelllinie SkBr3 (C) und die peripheren Blutlymphozyten (D) zeigten kein Cathepsin B auf der Zelloberfläche. Die Färbungen erfolgten mit polyklonalem Antikörper und dem Fluorochrom Cy3 (C) bzw. mit monoklonalem Antikörper und dem Fluorochrom R-PE (D).

Wie aus den FACS-Analysen ersichtlich wurde, kam es weder mit dem nicht-biotinylierten, polyklonalen noch mit dem monoklonalen Cathepsin B-Antikörper zu einer Bindung auf der Oberfläche der Tumorzelllinie SkBr3 oder der peripheren Blutlymphozyten. Intrazellulär hingegen konnte mit beiden Antikörpern die Bindungsfähigkeit durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen werden. Lysosomales Cathepsin B war im Gegensatz zu membranständigem Cathepsin bei Zelllinien detektierbar, so dass dieses Ergebnis auf eine unspezifische Bindung des biotinylierten Antikörpers schließen ließ. Somit wurde alleine durch den Prozess der Biotinylierung des polyklonalen Cathepsin B-Antikörpers eine unspezifische Bindungsaffinität hervorgerufen. Alle weiteren Versuche wurden daraufhin mit dem monokonalen Maus anti-human Cathepsin B-Antikörper durchgeführt.

4.2.2.2 Immunfluoreszenz stimulierter hämatopoietischer Tumorzelllinien zur Etablierung einer Positivkontrolle

Bei hämatopoietischen Tumorzelllinien kann durch Stimulation der Zellen eine Oberflächenexpression von Cathepsinen induziert werden. Zunächst wurde versucht, die monozytären Zelllinien zu stimulieren und die damit induzierte Cathepsin B-Expression mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers zu detektieren. Alternativ zur Antikörperfärbung wurde die Immunfluoreszenz auch an einer lymphoiden Leukämie-Zelllinie mit Hilfe eines spezifischen Cathepsin B-Inhibitors druchgeführt.

Die Stimulantien PMA bzw. LPS lösen in den monozytären Leukämie-Zelllinien HL-60, Mono-Mac-6 und U-937 eine Differenzeirung hin zu Makrophagen aus [62-64]. Demnach sollte nach Stimulation mit LPS oder PMA eine Cathepsin-Oberflächenexpression induziert werden. Eine erhöhte Cathepsin B-Expression nach PMA-Stimulation konnte bei der Zelllinie HL-60 bereits gezeigt werden [57]. Um eine quantitative Aussage über die Cathepsinfärbung zu erlangen, wurden die Färbeansätze zunächst nicht am Mikroskop, sondern am Durchflusszytometer analysiert. Die Färbungen beschränkten sich ausschließlich auf einen monoklonalen Cathepsin B-Antikörper. Anhand einer Stimulationsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen von PMA und LPS konnte für die Zelllinie Mono-Mac-6 eine optimale Stimulation mit 125 ng/ml PMA erreicht werden. Der Stimulus induzierte eine leichte Expression von Cathepsin B auf der Zelloberfläche mit einem ΔMFI von 2,19. Die Zelllinie U-937 konnte sowohl mit PMA als auch mit LPS in einer Konzentration von 250 ng/ml stimuliert werden. Dabei bewirkte allerdings das Stimulans LPS mit einem ΔMFI-Wert von 7,16 einen höheren Mittelwert der Fluoreszenz-Intensität, während mit PMA nur ein ΔMFI von 1,04 erzielt werden konnte. HL-60, die Zelllinie einer akuten myeloischen Leukämie, zeigte nur bei einer Stimultation von 100 ng/ml LPS eine Oberflächenexpression von Cathepsin B mit einem ΔMFI von 3,07 (Abbildung 5).

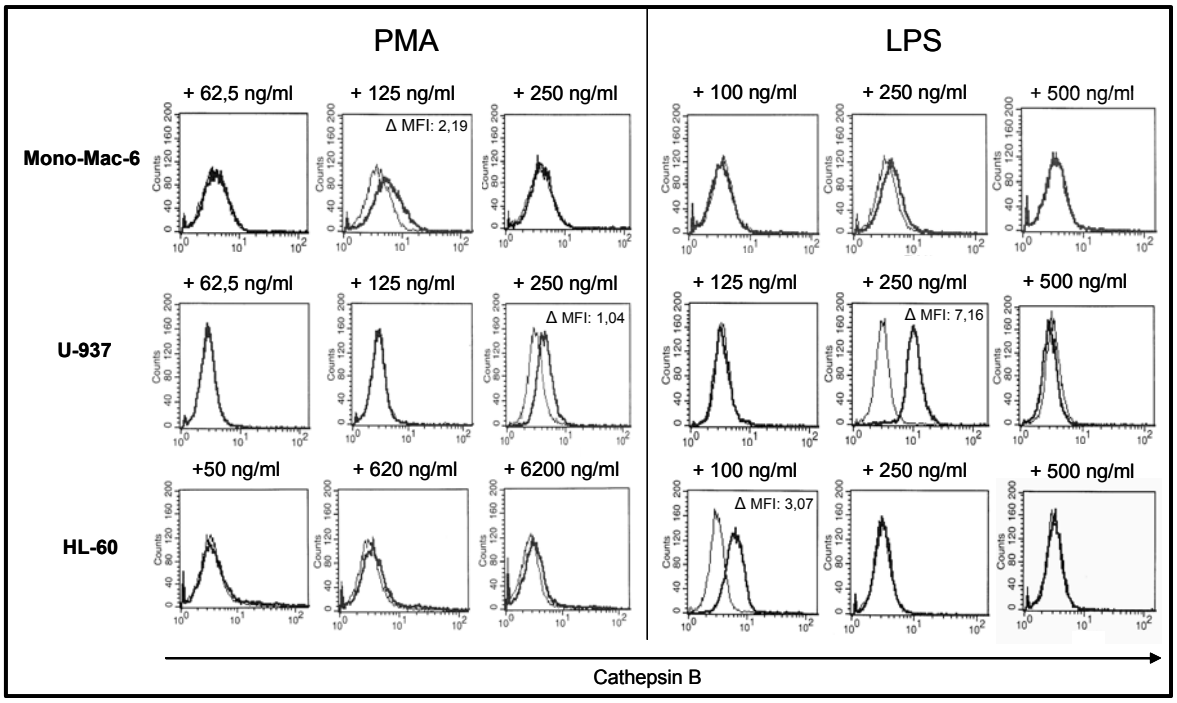


Abbildung 5: Cathepsin B-Oberflächenexpression auf stimulierten hämatopoietischen Zelllinien

Stimulation der Zelllinien Mono-Mac-6, U-937 sowie HL-60 mit unterschiedlichen Konzentrationen der Stimulantien PMA und LPS. Nach 24-stündiger Stimulation konnte die Expression von Cathepsin B auf der Oberfläche von Monozyten induziert werden. Die besten Stimulationsergebnisse konnten bei der Zelllinie U-937 mit 250 ng/ml LPS und HL-60 mit 100 ng/ml LPS erzielt werden. Bei der Stimulation von U-937 konnte die mit einem ΔMFI von 7,16 die höchste Oberflächenexpression von Cathepsin B induziert werden.

Den Ergebnissen zufolge war die durch einen Stimulus induzierte Expression von Cathepsin B auf der Zelloberfläche in der FACS-Analyse bei den monozytären Zelllinien detektierbar. Das verwendete Protokoll war damit für die Monozyten als Positivkontrolle der Cathepsinfärbung etabliert.

Bei wiederholten Experimenten zeigte sich jedoch, dass die Stimulierbarkeit innerhalb einer Zelllinie nicht gleich hoch bzw. vorhanden ist. Es konnte sogar festgestellt werden, dass die Zelllinien über keine konstante Stimulierbarkeit verfügen. Obwohl für die Stimulationen und Färbungen immer die gleichen optimalen Bedingungen für die Zelllinien gewählt und nach demselben Protokoll durchgeführt wurden, variierten die Ergebnisse der Immunfluoreszenz zum Teil erheblich. Die Detektion von Cathepsin B blieb in einer Vielzahl von Versuchen erfolglos oder die Färbeergebnisse waren nicht reproduzierbar. Um auszuschließen, dass die Zelllinien Stimulationsresistenzen entwickeln, je länger

sie sich in Kultur befinden, wurden für die Stimulationen immer wieder Zelllininen neu in Kultur genommen. Dieser zunächst vermutete zeitliche Zusammenhang zwischen dem Auftauen der Zellen und der erfolgreichen Stimulation konnte jedoch nicht bestätigt werden. Wiederholungen der Färbungen führten bei den Zelllinien Mono-Mac-6 und U-937 zu sehr unterschiedlichen Resultaten (Abbildung 6). Es zeigte sich, dass bei der Zelllinie Mono-Mac-6 die durch Stimulation induzierte Cathepsin B-Expression bei einer Wiederholung des Versuchs drei Tage später höher ausfiel. Der ΔMFI erhöhte sich von 2,19 auf 4,28. Dagegen konnte bei der Zelllinie U-937 innerhalb von 11 Tagen eine Abnahme der Cathepsin B-Oberflächenexpression verzeichnet werden. Nach 24-stündiger Stimulation der Zellen am Tag 6 nach dem Auftauen lag der ΔMFI bei 2,69, während eine Stimulation 11 Tage später keine Cathepsin B-Oberflächenexpression mehr induzieren konnte.

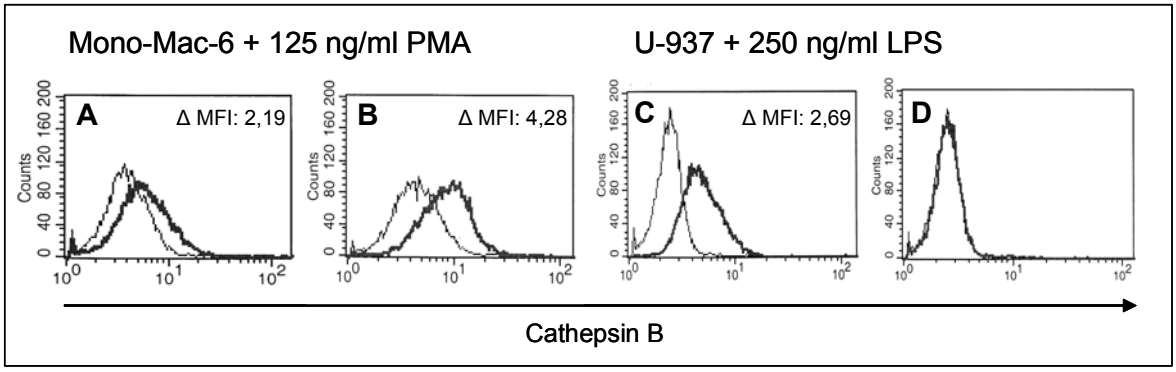


Abbildung 6: Variierende Cathepsin B-Oberflächenexpression auf den stimulierten Zelllinen Mono-Mac-6 und U-937

Vergleich der Immunfluoreszenz bei stimulierten Zellen der Zelllinie Mono-Mac-6 (A-B) und U-937(C-D). Bei einer Wiederholung der Antikörperfärbung nach drei Tagen erhöhte sich die induzierte Expression von Cathepsin B auf der Oberfläche der Zelllinie Mono-Mac-6 von einem ΔMFI-Wert von 2,19 (A) auf einen ΔMFI-Wert von 4,28 (B). Erfolgreiche Stimulation der Zelllinie U-937 am Tag 6 nach dem Auftauen (ΔMFI: 2,69) (C). Nach einer wiederholten Stimulation von Zellen nach 11 Tagen konnte kein Cathepsin B auf der Zelloberfläche detektiert werden (D). Die Immunfluoreszenz erfolgte mit monoklonalem Cathepsin B-Antikörper, dessen Bindung mit dem Sekundärantikörper anti-Maus Cy3 detektiert wurde.

Anhand der Resultate aller 40 FACS-Färbungen auf den stimulierten myeloiden Leukämie-Zelllinien HL-60, U-937 und Mono-Mac-6 konnte die unkonstante Stimulierbarkeit der Zellen bestätigt werden. Bei 80% (n=32) aller Färbungen

konnte keine Cathepsin B-Oberflächenexpression gemessen werden, obwohl bei jedem Versuch die Stimulation der Zellen anhand einer Titrationsreihe verschiedener Konzentrationen mit PMA oder LPS erfolgte. Bei lediglich sechs Versuchen (15%) zeigten wenige Zellen eine zur Negativkontrolle leicht erhöhte Expression von Cathepsin B. Letztlich führte nur die Stimulation der Zelllinie U-937 bei zwei Versuchen zu einer hohen Expression von Cathepsin B auf der Zelloberfläche. Damit konnte nur bei 5% aller Färbungen eine Expression induziert werden, so dass auf allen Zellen Cathepsin B detektiert werden konnte (Tabelle 5).

Tabelle 5: Zusammenfassung aller Färbeergebnisse auf stimulierten Leukämie-Zelllinien

Zelllinie	**Anzahl der Färbeergebnisse**			
	negativ*	**leichte Färbung[+]**	**Färbung[#]**	**gesamt**
Mono-Mac-6	11	3	-	14
U-937	9	2	2	13
HL-60	12	1	-	13
gesamt	**32 (80%)**	**6 (15%)**	**2 (5%)**	**40**

* negativ: die gemessene Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle unterschied sich nicht von der Färbung

[+] leichte Färbung: nur wenige Zellen zeigten eine höhere Fluoreszenz im Vergleich zur Negativkontrolle

[#] Färbung: alle Zellen wiesen im Vergleich zur Negativkontrolle eine messbar höhere Fluoreszenz auf

Unter den gesamten Stimulationsversuchen hatte somit eine Stimulation der Zelllinien U-937 mit 250 ng/ml LPS die höchste Cathepsin B-Expression zu Folge. Der durchschnittliche ΔMFI–Wert lag bei 7,16. Dennoch war dieser Fluoreszenzwert noch zu gering, so dass diese Zellfärbung mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie nicht detektierbar war.

Da die Stimulation der myeloiden Tumorzelllinien häufig erfolglos blieb oder die Intensität der gemessenen Immunfluoreszenz sehr gering ausfiel, wurde im Folgenden der spezifische Cathepsin B-Inhibitor NS-196 verwendet. Damit sollte eine weitere Möglichkeit zur Detektion von Cathepsin B getestet werden. Zudem wurde hier auch ein anderer Stimulationsmechanismus zum Einsatz gebracht, der möglicherweise eine höhere Fluoreszenzintensität zur Folge hat. Der Inhibitor, der auf einem biotinylierten Epoxysuccinyl-Peptid basiert, kann die Zellmembran nicht passieren und ist daher zur Dektektion von Cathepsin B auf der Zelloberfläche besonders geeignet [60].

Als Positivkontrolle wurde die T-Zell-Leukämiezelllinie Jurkat verwendet. Die Stimulation des T-Zell-Rezeptors durch Bindung eines CD3-Antikörpers sollte neben der Ausschüttung von Perforinen und Granzymen auch die Sezernierung von Cathepsin B zur Folge haben. Um sicher zu stellen, dass eine Stimulation der Zelllinie Jurkat mit Hilfe des CD3-Antikörpers möglich ist, wurde zunächst die Bindung des Antikörpers an das CD3-Antigen auf der Zelloberfläche durch Immunfluoreszenz anhand einer FACS-Analyse nachgewiesen (Abbildung 7 B). Durch die Antikörperbindung sollten sich die so stimulierten Zellen in ihrer immunologischen Aktivität als Effektorzellen befinden und somit auch eine Oberflächenexpression von Cathepsin B aufweisen.

Für die Färbung wurden die Zellen der Zelllinie Jurkat jeweils einem Stimulus von 2 h, 5 h, und 12 h ausgesetzt, um zeitabhängige Veränderungen in der Oberflächenexpression von Cathepsin B detektieren zu können. Die Oberfläche der Zellen wies jedoch nach keiner der Stimulationen Cathepsin B auf. (Abbildung 7 C-F).

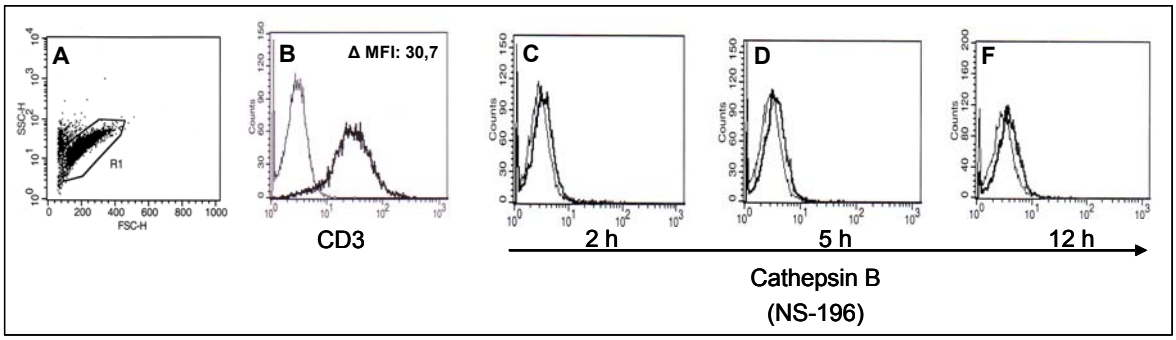


Abbildung 7: CD3-Stimulation führt nicht zur Oberflächenexpression von Cathepsin B auf Jurkat Zellen

Zellen der Zelllinie Jurkat wurden mit Maus anti-human CD3/anti-Maus Cy3 gefärbt. Die im Histogramm punktförmig dargestellten und durch R1 eingegrenzten Zellen definieren die Zellpopulation, welche für die FACS-Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen verwendet wurde (A). Die Histogramme B-F zeigen die Intensität der Färbung durch die Bindung des CD3-Antikörpers auf der Oberfläche von Jurkat-Zellen, was in einer Δ MFI von 30,7 resultiert (B) sowie die Cathepsin B-Färbungen auf den Zellen nach einer Stimulationszeit von 2 h (C), 5 h (D) und 12 h (E) mit NS-196-Biotin/Streptavidin Cy3.

Da mit Hilfe des spezifischen Inhibitors bei der T-Zelllinie Jurkat keine Detektion von membranständigem Cathepsin B erreicht werden konnte, wurden keine weiteren Versuche zur Optimierung des Färbeprotokolls unternommen. Stattdessen wurden für die nachfolgenden Immunfluoreszenz-Färbungen zur

Detektion von membranständigem Cathepsin B ausschließlich der monoklonale Antikörper verwendet.

4.2.2.3 Immunfluoreszenz epithelialer Tumorzelllinien

Immunfluoreszenz-Färbungen wurden an den epithelialen Tumorzelllinien A549, BT-20, CAMA, HTB 177, MCF-7 und SkBr3 durchgeführt. Von den jeweiligen Zellen der Zelllinien wurden 24 Stunden vor der Färbung Sphäroide generiert. Obwohl damit eine EDTA-Behandlung unmittelbar vor der Antikörper-Färbung vermieden worden war, konnte bei keiner der verwendeten Zelllinien das Vorhandensein von Cathepsin B auf der Zelloberfläche detektiert werden (Abbildung 8). Zudem konnte auch keine membranständige Cathepsin B-Expression bei Tumorzellen aus malignen Pleuraergüssen von Mammakarzinompatienten gefunden werden.

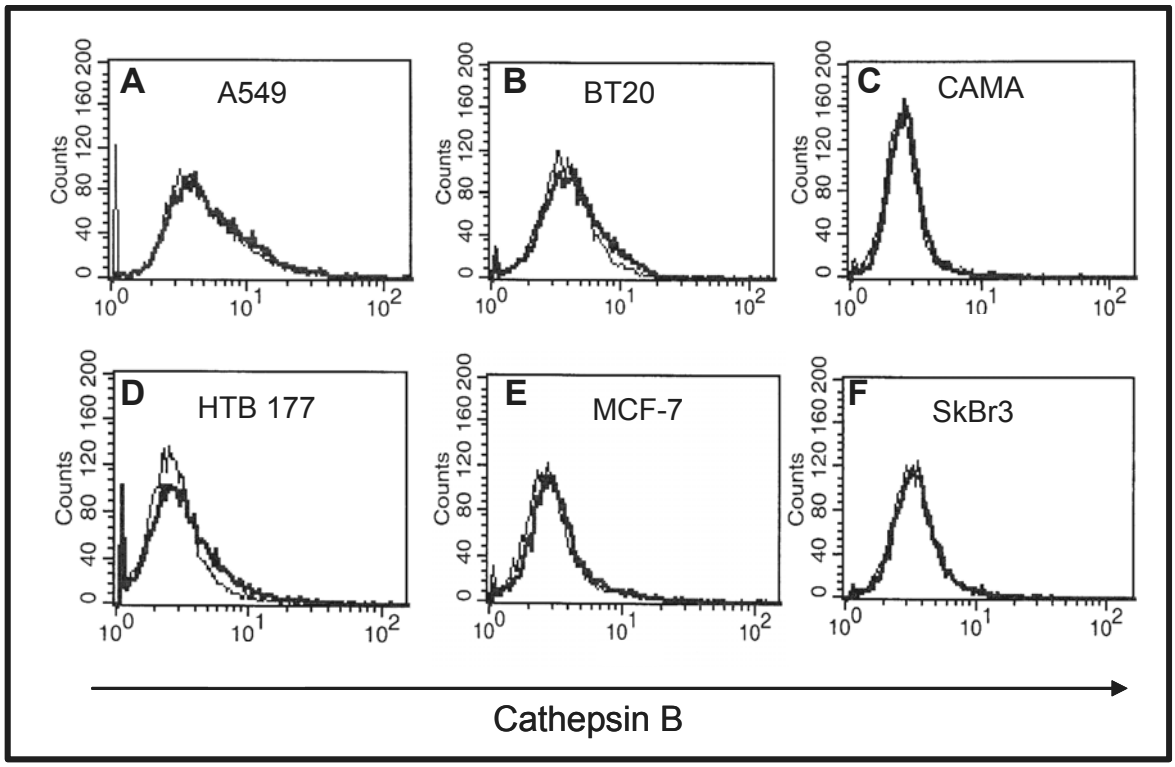


Abbildung 8: Cathepsin B ist nicht auf epithelialen Zellen im FACS nachweisbar

Ausgehend von Sphäroiden konnte in durchflusszytometrischen Analysen auf den Zellen der Bronchialkarzinomzelllinien A549 (A) und HTB 177 (D) sowie der Mammakarzinomzelllinien BT-20 (B), CAMA (C), MCF-7 (E) und SkBr3 (F) kein membranständiges Cathepsin B mit dem monoklonalen Antikörper nachgewiesen werden.

4.3 Allelverlust-Analyse von Zytokeratin-positiven Zellen aus dem Knochenmark von Mammakarzinompatienten

Genomische Aberrationen wie Deletion oder Amplifikation können zuverlässig mit der komparativen Genomhybridisierung (CGH) aufgezeigt werden, wenn die genetischen Veränderungen eine Mindestgröße von etwa 10 Mb aufweisen. Eine Detektion von Verlusten kleinerer DNA-Fragmente ist mit dieser Methode nicht möglich. Die Allelverlust-Analyse (engl.: Loss of Heterocygosity, LOH) bietet den Vorteil, dass anhand von polymorphen Markern wie Mikrosatelliten- oder Single Nukleotid-Polymorphismen die verschiedenen Allele einer Zelle dargestellt und somit bei Verlust als subchromosomale Deletionen detektiert werden können, die in der CGH nicht mehr nachweisbar sind.

4.3.1 Technisches Vorgehen

Um einen Allelverlust mit dieser Methode nachzuweisen, muss eine einmalig vorkommende, polymorphe DNA-Sequenz im diploiden Genom amplifiziert werden. Die Schwierigkeit bei der Allelverlust-Analyse bestand in diesem Falle darin, dass nur die DNA einer einzelnen Zelle als Ausgangsmaterial zur Verfügung stand und diese jeweils anhand einer Vielzahl von Markern analysiert werden sollte. Dies machte eine globale Amplifizierung des Einzelzellgenoms notwendig. Mit dieser vervielfältigten Zell-DNA als Matrize konnte dann die Multimarker-Analyse erfolgen.

4.3.1.1 Isolation der Einzelzelle und globale Amplifizierung des Genoms

Nach der Isolierung der Einzelzelle mit Hilfe einer Kapillare erfolgte der Zellaufschluss mit Detergentien, während sämtliche Proteine mit einer Proteinase verdaut wurden. Damit wurde die Zugänglichkeit der DNA für den anschließenden Restriktionsverdau gewährleistet. An die somit generierten DNA-Fragmente wurde ein Adapter ligiert, der aus zwei Oligonukleotiden bestand. An den 5'-Überhang des verdauten DNA-Fragments wurde das Oligonukleotid LIB1 ligiert. Dazu komplementär bindet das Oligonukleotid ddMSE11 an das 3'-Ende des

Fragments, was nur zur Stabilisierung der Ligation von LIB1 an das DNA-Fragment beitragen sollte. Bei der anschließenden Hitze-Denaturierung wurde dieses Oligonukleotid wieder abgetrennt. Eine Auffüllreaktion vervollständigte die 3'-rezessiven Enden der DNA-Stränge wieder. Damit wurden die Primerbindungsstellen für die folgende primäre PCR geschaffen, durch welche die gesamte DNA der Zelle schließlich exponentiell amplifiziert werden kann. Um letztlich sicher zu stellen, dass die globale Amplifizierung erfolgreich abgelaufen war, wurden bei jeder Zelle Kontrollen durchgeführt. Repräsentativ für die gesamte Zell-DNA wurden mit Hilfe der PCR die Gene *KRT19* und *TP53* amplifiziert. Konnte mindestens eine der beiden Sequenzen in der PCR nachgewiesen werden, wurde von einer erfolgreichen globalen Amplifizierung des Zellgenoms ausgegangen (Abbildung 9). Mit der Amplifikation polymorpher Sequenzen für die Allelverlust-Analysen bei Einzelzellen konnte somit fortgefahren werden.

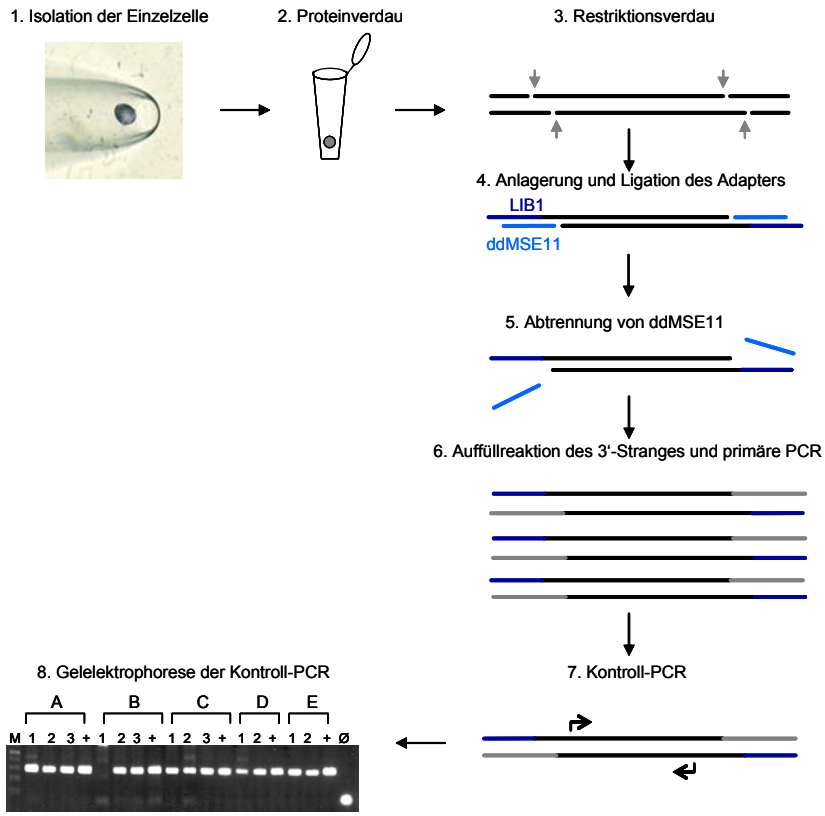


Abbildung 9: Arbeitsschritte zur globalen Genomamplifikation einer Einzelzelle

Nach dem ersten Schritt, der Isolierung der immunzytochemisch detektierten Zelle in ein Reaktionsgefäß, folgte der Proteinase K-Verdau der Zellproteine. Ein Restriktionsverdau der DNA führte zu den Fragmenten, an welche die Adapter angelagert und ligiert wurden. Nach der Abtrennung des Oligonukleotids ddMSE11 erfolgte die Auffüllreaktion des 3'-rezessiven Strangendes, so dass dadurch die Primerbindungsstellen für LIB1 geschaffen wurden. Die nachfolgende primäre PCR führte zur globalen Genomamplifikation der Einzelzelle. Durch eine Kontroll-PCR wurde die globale Amplifikation überprüft. Das Bild des Agarosegels zeigt die PCR-Produkte der DNA isolierter Einzelzellen von fünf Personen (A-E). Die nummerierten Einzelzellen sind mit den jeweiligen DNA Pools als Positivkontrolle (+) nebeneinander aufgetragen. Mit Ausnahme von Einzelzelle 1 der Testperson B konnte bei allen Einzelzellen die DNA erfolgreich amplifiziert werden (Detaillierte Methodenbeschreibung unter Punkt 3.2.1.4 ff.).

4.3.1.2 Primerauswahl zur Amplifikation polymorpher DNA-Sequenzen und Auswertung

Wie bereits bei der primären, globalen Amplifizierung des Einzelzellgenoms musste auch die sequenzspezifische PCR der polymorphen Regionen hoch sensitiv sein. Ein Kriterium zur Auswahl dieser Marker war eine hohe Wahrscheinlichkeit der Heterozygosität, das heißt paternales und maternales Allel sollten möglichst häufig unterscheidbar sein. Bei Mikrosatelliten-Polymorphismen

bedeutete dies eine sich unterscheidende Anzahl der CA-Basenpaarwiederholungen. Bei Single Nukleotid-Polymorphismen (SNP) trägt nur eine polymorphe Base zur Unterscheidung der beiden Allele bei. Die Mikrosatelliten bergen hingegen aufgrund der polymorphen Sequenzwiederholungen eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein unterschiedlicher Allele.

Die Zell-DNA bestand im Zuge der globalen Amplifizierung aus Fragmenten, die durch das Enzym Mse I generiert worden waren. Die Auswahl geeigneter Marker musste unter Berücksichtigung der Größe des Fragments erfolgen, auf dem sich die polymorphe Sequenz befand. Generell wurde versucht, nur Marker auf Fragmenten mit einer Größe von 200 – 600 bp zu wählen. Eine Amplifizierung der Fragmente dieser Länge durch die Polymerase ist während der Elongationszeit sowohl in der primären als auch in der spezifischen PCR am besten möglich. Schließlich mussten für die erfolgreiche Amplifikation der Marker geeignete Primer gefunden werden, welche die polymorphe(n) Sequenz(en) flankierten (Abbildung 10).

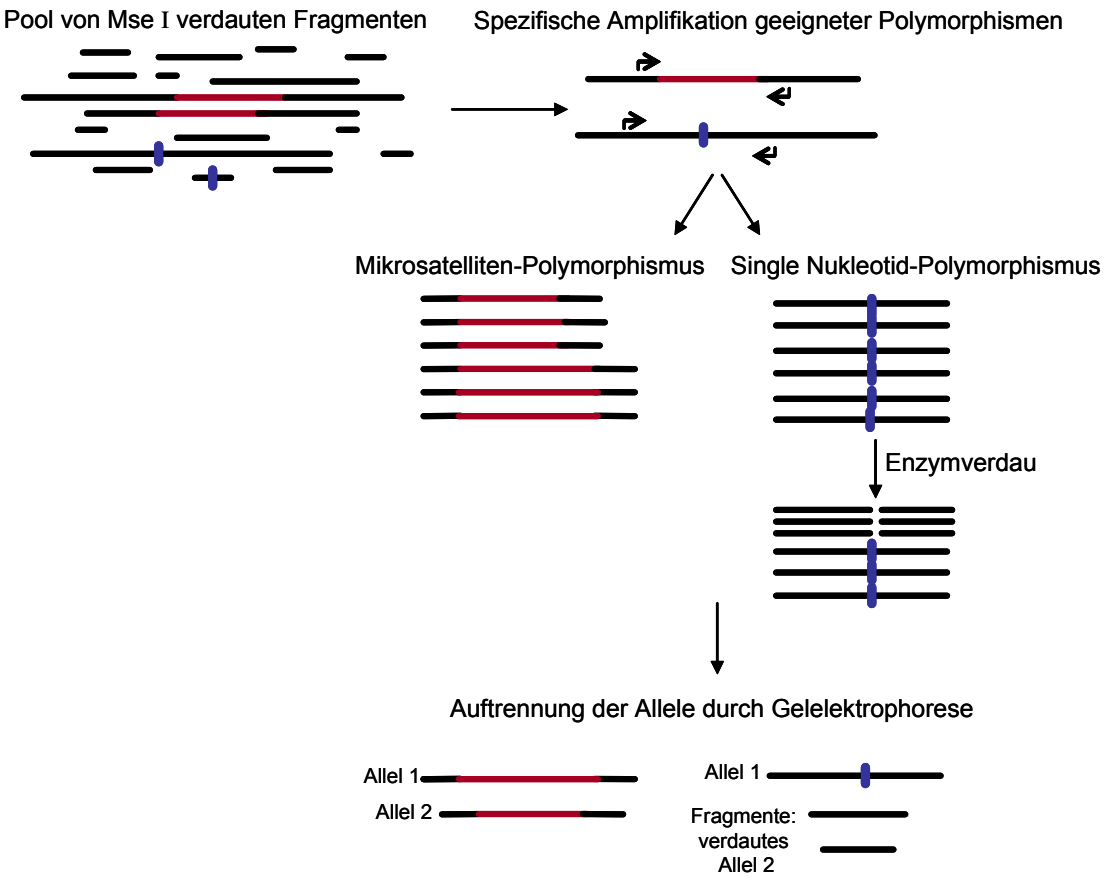


Abbildung 10: Schema über die Methode der Allelverlust-Analyse

Nach der globalen Amplifizierung des Zellgenoms wurden ausgehend von den Mse I-verdauten Fragmenten geeignete Polymorphismen in einer spezifischen PCR amplifiziert. Bei den Mikrosatelliten-Polymorphismen (rote Linien) werden die PCR-Produkte als Allel 1 und Allel 2 elektrophoretisch aufgetrennt. Bei Single Nukleotid-Polymorphismen (blaue Markierung) wird das PCR-Produkt spezifischen verdaut. Bei heterozygoten Zellen kann nur eines der beiden Allele geschnitten werden. Das Allel und die beiden Allelfragmente werden ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach erfolgreicher Amplifikation gestaltete sich allerdings die Detektion der polymorphen Allele bei vielen Mikrosatelliten-Markern schwer. Zum einen wurden bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese der PCR-Produkte sogenannte Schattenbanden sichtbar. Sie werden verursacht durch Lesefehler der Polymerase bei den Sequenzwiederholungen während der Elongation. Zum anderen wurde die Allelanalyse dadurch erschwert, dass der Unterschied zwischen den Basenpaarwiederholungen beider Allele oftmals sehr gering ist. Homo- und Heterozygosität konnte daher häufig nicht unterschieden werden. Aufgrund dessen fanden viele gewählte Mikrosatelliten-Marker in der Allelverlust-Analyse keine Verwendung, da die Identifikation der beiden Allele nicht möglich war

(Abbildung 11). Im Gegensatz dazu konnte die Heterozygotie anhand von geeigneten Single Nukleotid-Marker durch Enzymverdau eindeutig bestimmt werden (Tabelle 6). Mit Hilfe der geeigneten polymorphen Marker konnte die Informativität der Zellen bestimmt werden. Zellpools der Patienten dienten als Positivkontrollen. Ihr Ergebnis in der Allel-Analyse wurde mit den dazugehörigen Einzelzellen verglichen. Somit konnten Allelverluste in den Einzelzellen informativer Patienten detektiert werden.

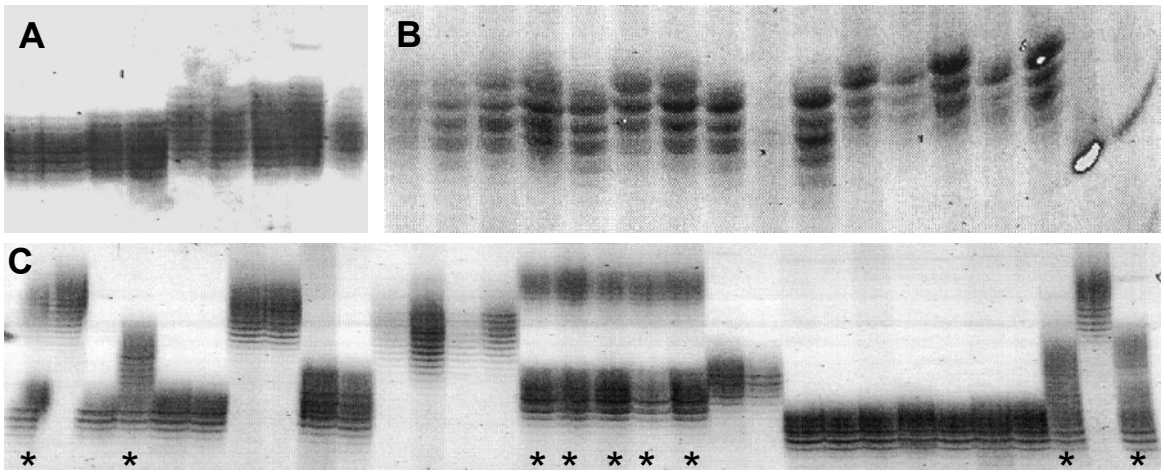


Abbildung 11: Schattenbanden verhindern die Beurteilung von Allelverlusten bei manchen Markern

*Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von drei Markern, die polymorphe Mikrosatelliten in Form von CA-Wiederholungen beinhalten (Bild A, B, C). Die Allele zeigten keine oder zu geringe Längenunterschiede, so dass durch das Auftreten von Schattenbanden keine Identifikation der einzelnen Allele möglich war. Diese Marker fanden keine Verwendung bei den Allelverlust-Analysen (Bild A, B). Mit Marker D6S311 (Bild C) hingegen konnten bei heterozygoten Zellen (gekennzeichnet durch *) die Allele eindeutig identifiziert werden.*

Tabelle 6: Übersicht über die Anzahl der getesteten und verwendeten Marker

Anzahl der					
Dinukleotid-Marker		**Single Nukleotid-Marker**		**Tetranukleotid-Marker**	
getestet	verwendet	getestet	verwendet	getestet	verwendet
17	**5**	15	**10**	1	**1**

4.3.1.3 Analyse von Kontrollzellen

Von 100 isolierten Kontroll-Einzelzellen konnten nach der globalen Amplifizierung des Genoms bei 86 Zellen mindestens eine der beiden Kontrollsequenzen erfolgreich amplifiziert werden. In das Kontrollkollektiv wurden 74 Einzelzellen aufgenommen. Damit konnte jedoch noch nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne, durch Mse I generierte Fragmente des Genoms während der molekularen Aufarbeitung der Zell-DNA verloren gegangen waren. Zur Überprüfung des Allelverlusts wurde daher ein Kontrollkollektiv bestehend aus normalen, Zytokeratin-negativen Einzelzellen einer Allelverlust-Analyse unterzogen (Tabelle 3, 3.2.1.1). Das Kontrollkollektiv bestand aus zwei verschiedenen Gruppen. Kontrollgruppe 1 umfasste 21 Einzelzellen von vier jungen Probanden (Durchschnittsalter 29 Jahre). Diese Zellen wurden vor der Isolierung gegen das mesenchymale Protein Vimentin gefärbt. Damit sollte untersucht werden, ob eine immunzytochemische Färbung der Einzelzellen zu einem vermehrten Allelverlust führt. Kontrollgruppe 2 bestand aus 53 Zytokeratin-negativen Einzelzellen von Patienten mit malignen, epithelialen Tumoren.

Nach der Allelverlust-Analyse mit 16 polymorphen Markern lagen die Allelverluste bei Kontrollgruppe 1 zwischen 0% und 25%, wobei der durchschnittliche Wert 5,6% betrug. Bei Kontrollgruppe 2 konnte mit einem durchschnittlichen Wert von 8,4% ein etwas erhöhter Allelverlust nachgewiesen werden (Abbildung 12 A-B). In Kontrollgruppe 2 fanden sich bei drei Marker Allelverluste in über 20% der Zellen, während dies bei Kontrollgruppe 1 nur bei einem Marker der Fall war. Auffällig war dabei, dass in Kontrollgruppe 2 generell höhere Verlustwerte zu verzeichnen waren. In Kontrollgruppe 1 hingegen wurde bei acht Markern kein Allelverlust nachgewiesen (Abbildung 12 C).

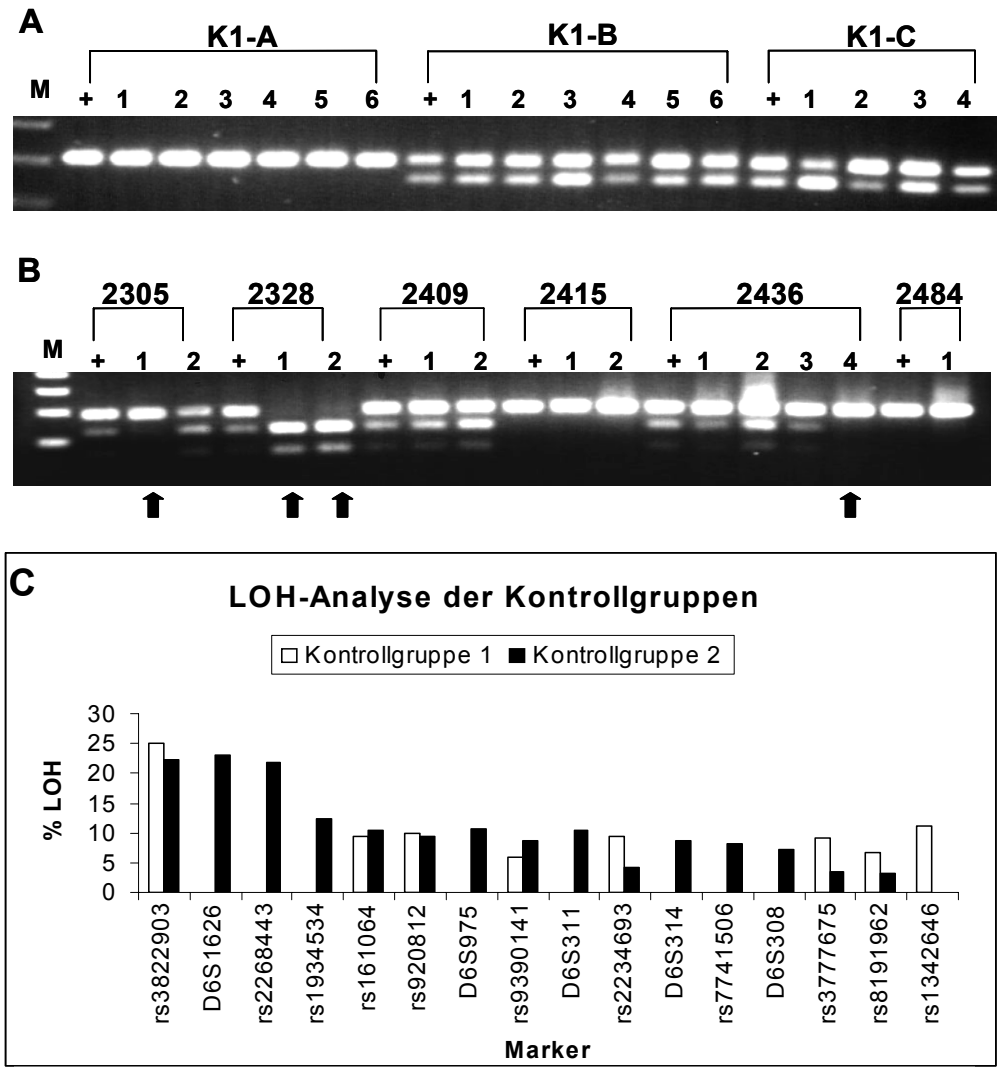


Abbildung 12: Vergleich der Allelverlust-Analysen von Kontrollgruppe 1 und 2

Agarosegele mit den verdauten PCR-Produkten der Kontrollgruppe 1, bestehend aus jungen Probanden (A), und der Kontrollgruppe 2, bestehend aus Patientenzellen (B). Testperson K1-B und K1-C, die heterozygot für den Marker rs7741506 sind, wiesen keinen Allelverlust auf (A). Bei den Patientenkontrollzellen konnten bei drei Personen Allelverluste mit Marker rs2268443 detektiert werden. Ein Allelverlust wird mit einem schwarzen Pfeil angezeigt. (C) Prozentuale Allelverluste der Kontrollgruppe 1 (Probanden) (weiße Balken) und Kontrollgruppe 2 (Patienten) (schwarze Balken) für alle verwendeten Marker.

Der Vergleich zwischen den beiden Kontrollgruppen 1 und 2 wurde jeweils mit der Anzahl der informativen Zellen und der Anzahl der Zellen mit Allelverlust durchgeführt. Die errechneten p-Werte für die einzelnen Marker sind tabellarisch kurz aufgelistet (Tabelle 7). Anhand der korrigierten p-Werte zeigte sich, dass beide Kontrollgruppen sich nicht signifikant in der Häufigkeit von Allelverlusten spezifischer Marker unterscheiden.

Tabelle 7: Statistischer Vergleich aller LOH-Marker mittels Fisher's Exact Test zwischen der Kontrollgruppe 1 (Probanden) und Kontrollgruppe 2 (Patientennormalzellen)

Marker	rs1342646	D6S975	D6S1626	rs3777675	rs3822903	D6S314	D6S308	rs161064	rs7741506	rs9390141	rs2268443	D6S311	rs1934534	rs2234693	rs920812	rs8191962
p*-Wert	1	1	1	1	0,77	0,87	0,78	0,80	0,98	0,82	0,97	0,86	0,89	1	0,75	0,80

*p-Werte korrigiert nach Benjamini-Hochberg

Überdies wurde mit Hilfe eines χ^2-Tests die Anzahl der rechnerisch vorhandenen Allele aller informativen Zellen mit der tatsächlichen Anzahl der detektierten Banden beider Kontrollgruppen miteinander verglichen. In Kontrollgruppe 1 konnten dabei 97,3% der erwarteten Allele detektiert werden, wobei in Kontrollgruppe 2 nur 95% aller Allele nachgewiesen werden konnten. Der Unterschied zwischen beiden Kontrollgruppen resultierte in einem p-Wert von 0,063 (Tabelle 8).

Tabelle 8: Amplifikationseffizienz einzelner Allele in Kontroll-Einzelzellen

Kontrollgruppe	Anzahl der informativen Zellen	Anzahl der erwarteten Allele	Anzahl der detektierten Allele	Prozentualer Wert der detektierten Allele	p-Wert (χ^2)
1 (Probanden)	186	372	362	97,3%	0,063
2 (Patienten)	406	812	771	95%	

Augrund dieser Ergebnisse ließ sich feststellen, dass der Allelverlust nach der globalen Amplifikation der DNA einer Einzelzelle bei 2,7% für Kontrollgruppe 1 und 5% für Kontrollgruppe 2 lag. Zwar wurden die Zellen beider Kontrollgruppen einer immunzytochemischen Behandlung unterzogen, doch im Gegensatz zur Kontrollgruppe 2 beinhaltete Kontrollgruppe 1 immunzytochemisch gefärbte Zellen. Bei ihnen wurde eine intrazelluläre Antikörperfärbung gegen das mesenchymale Protein Vimentin vorgenommen. In diesem Kontrollkollektiv konnte um 2,3 % weniger Allelverluste detektiert werden als bei den ungefärbten Zellen der Kontrollgruppe 2. Im Vergleich der beiden Kontrollgruppen zeigte der p-Wert von 0,63, dass die gefärbten Zellen tendenziell weniger häufig von Allelverlusten

betroffen sind als die ungefärbten Zellen. Damit konnte ein Einfluss des Färbepräzipitats in den Zellen auf die Häufigkeit des beobachteten Allelverlustes ausgeschlossen werden. Die geringfügig erhöhten Allelverluste der Kontrollgruppe 2 könnten altersbedingt oder auch auf den Krankheitsstatus der Patienten zurückzuführen sein.

Um für die statistischen Analysen eine dem Mammakarzinom-Patientenkollektiv möglichst adäquate Kontrollgruppe zu besitzen, wurde dafür ausschließlich Kontrollgruppe 2 verwendet. In dieser Kontrollgruppe befanden sich Zytokeratin-negative Zellen von Patienten mit Mamma-, Prostata- oder Gastrointestinaltumoren. Das Patientenalter war entsprechend dem der Mammakarzinompatienten vergleichbar. Aus diesem Grunde stellten die Zytokeratin-negativen Zellen der Patienten die geeignetere Kontrollgruppe dar als die Vimentin gefärbten Einzelzellen von jungen Probanden (Tabelle 10).

4.3.2 Charakterisierung der Region 6q24-26

4.3.2.1 Allelverlust in der Region des *IGF2*-Rezeptors

Polymorphe Marker, die eine Unterscheidung der Allele zuließen, wurden so gewählt, dass sie in unmittelbarer Nähe oder innerhalb des Gens des IGF2-Rezeptors lagen. Die Lokalisation der Marker richtete sich nach den Angaben der in *Unified Database (UDB)* des *Weizmann Institute of Science* verfügbaren Daten des Jahres 2002.

Den Angaben zufolge war die etwa 240000 bp lange Gensequenz des Rezeptors bei 172,7 Mb auf Chromosom 6q lokalisiert. Die Entfernungen der drei Mikrosatelliten-Marker (D6S314, D6SS308, D6S1633) zum Gen betrugen zwischen 0,3 und 2 Mb. Als intragenetische Marker wurden der Single Nukleotid-Polymorphismus (rs920812) sowie ein Tetranukleotid-Polymorphismus in der 3'UTR-Region (rs8191962) verwendet.

Marker mit diesem relativ geringen Abstand zum Gen sollten somit eine zuverlässige Aussage über den Verlust des *IGF2*-Rezeptors bzw. der Allele gewährleisten (Abbildung 13 A).

Während nur 31,6% (rs920812) bzw. 11,4% (rs8191962) der Patientenzellen einen Allelverlust des *IGF2*-Rezeptorgens aufwiesen, konnte mit Hilfe der

Mikrosatelliten-Marker D6S314 und D6S308 bei 47,4% bzw. 58,8% der Zellen ein Allelverlust detektiert werden. Als Kontrolle wurde im Vergleich dazu auch das Kontrollzellkollektiv der Patienten anhand der fünf Marker analysiert. Bei diesen Kontrollzellen lagen die LOH-Ereignisse mit Ausnahme von Marker D6S1633 jeweils unter 10%, wobei sich bei Marker D6S314 und D6S308 die Allelverluste zwischen Patienten- und Kontrollzellen jeweils signifikant unterschieden (p=0,015). Bezüglich Marker D6S1633 konnte bei den Patienten nur ein prozentualer Allelverlust von 22,2% aufgezeigt werden, während 12,5% der Kontrollzellen einen Verlust des Allels aufwiesen. Dabei konnte wie auch bei den SNP-Markern innerhalb des *IGF2*-Rezeptors kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollzellen festgestellt werden (Abbildung 13).

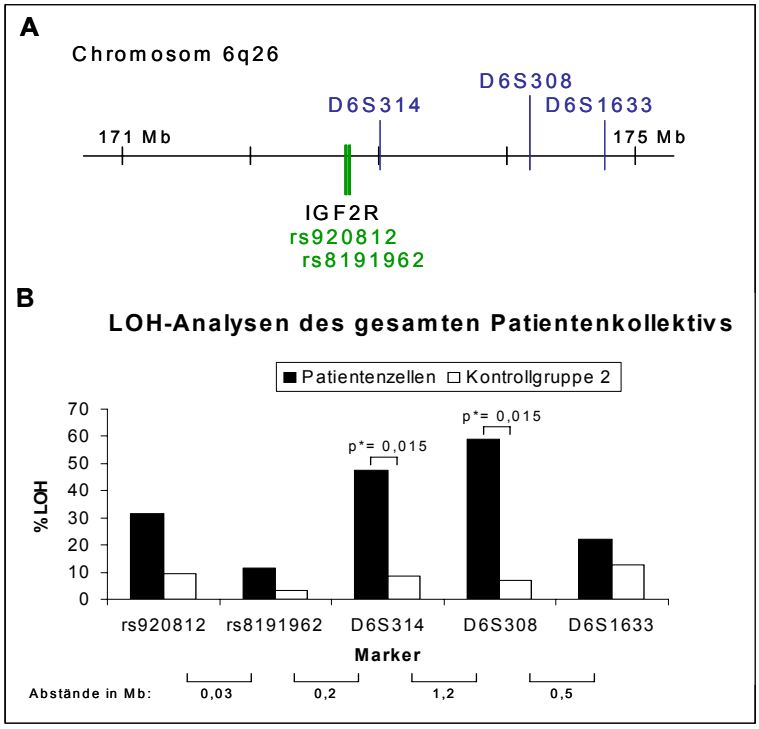


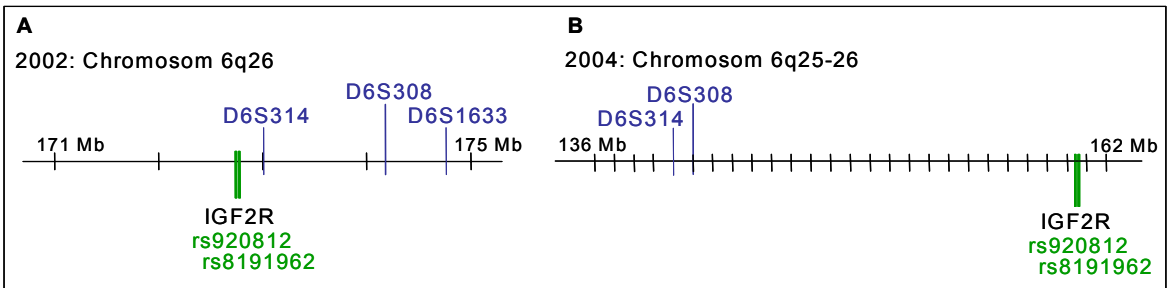
Abbildung 13: Lokalisation und Allelverlust-Analysen

Die Lokalisation der Marker, die Single Nukleotid- und Mikrosatelliten-Polymorphismen beinhalten, richtete sich nach den Angaben der Unified Database des Weizmann Institutes aus dem Jahre 2002. Der Genort des IGF2-Rezeptors (IGF2R) und die verwendeten LOH-Marker befinden sich auf Chromosom 6q26 zwischen 172 - 175 Mb (A). Die mit diesen Markern erhobenen Daten der Allelverlust-Analysen werden im Histogramm dargestellt. Nur Marker D6S314 und D6S308 wiesen im Vergleich zu den Kontrollzellen einen signifikanten Unterschied bezüglich des Allelverlustes auf. Die p-Werte wurden nach Benjamini-Hochberg korrigiert (B).*

Anhand der damit erhobenen Daten zeigte sich, dass das Gen des IGF2-Rezeptors weniger häufig von Allelverlusten betroffen war als ein Bereich, der in unmittelbarer Nähe zum Gen lokalisiert ist. Dieser Allelverlust beschränkte sich allerdings ausschließlich auf eine Region, die durch die Marker rs8191962 und D6S1633 begrenzt war und damit eine maximale Länge von 1,9 Mb einnahm.

4.3.2.2 Neudefinition der „region of interest“

Durch die vollständige Sequenzierung des humanen Genoms änderte sich jedoch die Lokalisation der polymorphen Mikrosatelliten-Marker in Bezug auf das Gen des IGF2-Rezeptors sowie der Gen-Lokus selbst. Im Vergleich zum Jahre 2002 verschob sich 2004 die Lokalisation der Marker D6S314 und D6S308 um 33 Mb bzw. 34 Mb, während sich der Genlokus um etwa 12 Mb verändert hat. Die relative Entfernung zum Gen beträgt damit nicht mehr 0,3 Mb (D6S314) bzw. 1,5 Mb (D6S308), sondern 20,5 Mb (D6S314) bzw. 19,5 Mb (D6S308). Die Lokalisation des Mikrosatelliten-Markers D6S1633 hingegen war im Jahre 2006 in der Datenbank von *Ensembl* nicht mehr verfügbar, so dass er in die späteren Analysen nicht miteinbezogen werden konnte (Abbildung 14).



Gen bzw. Marker	Lokalisation 2002	Lokalisation 2004
IGF2R	172,7 Mb	160,4 Mb
rs920812	172,8 Mb	160,5 Mb
rs8191962	172,8 Mb	160,5 Mb
D6S314	173,0 Mb	140,0 Mb
D6S308	174,2 Mb	141,0 Mb
D6S1633	174,7 Mb	nicht mehr verfügbar

Abbildung 14: Gen- und Markerpositionen im Jahre 2002 und 2004

Die Lokalisation des IGF2-Rezeptorgens (IGF2R) und der LOH-Marker richtete sich nach den Angaben der Unified Database des Weizmann Instituts aus dem Jahre 2002 (A). Im Vergleich dazu sind die veränderten Positionen der Marker und des Gens nach den Angaben der Datenbank Ensembl ab dem Jahre 2004 nach der vollständigen Sequenzierung des humanen Genoms gezeigt. Daten für den Marker D6S1633 sind nicht mehr verfügbar (Datenbank Ensembl) (B).

Der bis dahin gefundene Bereich zwischen den Markern D6S314 und D6S308 umfasst etwa 1,2 Mb auf Chromosom 6q24. Um die Allelverluste in dieser Region näher zu bestimmen, wurden zusätzliche Marker auf Chromosom 6q22-25 im Bereich von 128,3 - 160,5 Mb für eine Analyse herangezogen. Die Marker umfassten fünf Mikrosatelliten-, zehn Single Nukleotid-Polymorphismen und einen Tetranukleotid-Polymorphismus. Durch polymorphe Marker, die innerhalb von Genen lokalisiert waren, konnten neben dem *IGF2*-Rezeptor noch acht weitere Gene bezüglich einer Deletion untersucht werden. (Abbildung 15).

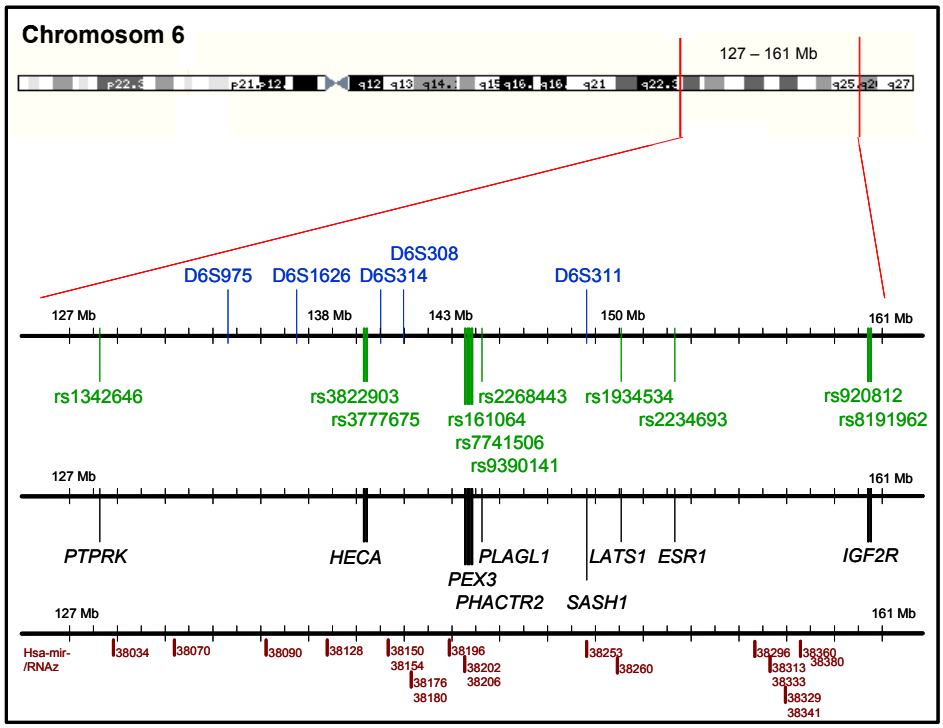


Abbildung 15: Lokalisation der verwendeten LOH-Marker und der damit untersuchten Gene sowie die MikroRNAs auf Chromosom 6q

Auf Chromosom 6 ist die durch Allelverlust-Analysen untersuchte Region 6q22-25 hervorgehoben. Die verwendeten LOH-Marker liegen zwischen 128,3 - 160,5 Mb und bestehen aus fünf Mikrosatelliten-(blau), zehn Single Nukleotid-Polymorphismen und einem Tetranukleotid-Polymorphismus (grün). Im mittleren Teil der Graphik ist die Position derjenigen Gene (schwarz) dargestellt, die anhand der Single Nukleotid-Polymorphismen und des Mikrosatelliten-Polymorphismus D6S311 untersucht wurden. Im unteren Teil ist die Lokalisation der MikroRNAs (blau) in der Region gezeigt (Datenbank: miRNAmap, Universität Hsinchu, Taiwan).

4.3.3 Allelverlust-Analysen des Patientenkollektivs in der Region

Ebenso wie die Kontrollzellen wurden sämtliche Zytokeratin-positive Patientenzellen mit Hilfe der 16 Marker auf einen Verlust ihrer Heterozygosität hin untersucht. Abhängig von der Informativität der Patientenzellen für die einzelnen Marker konnte das gesamte Kollektiv zusätzlich in zwei Gruppen eingeteilt werden. In einer Patientengruppe wurden die Zytokeratin-positiven Zellen zusammengefasst, die in der CGH keinerlei Aberrationen zeigten und von Patienten im Stadium M0 stammten (*M0/CGH-normal*). Die zweite Gruppe beinhaltete alle Zytokeratin-positiven Zellen, die von Patienten aus dem Stadium M0 stammten. Die Einteilung in die Gruppe *M0* erfolgte ohne Berücksichtigung der genomischen Veränderungen anhand ihres CGH-Profils, wobei aber das gesamte Zellkollektiv frei von Aberrationen auf Chromosom 6q war. Ein Teil dieser Gruppe bestand somit aus allen Patientenzellen der Gruppe *M0/CGH-normal*. Weitere Unterteilungen der Patientenzellen waren aufgrund der geringen Zellzahlen nicht möglich (Tabelle 9, Vergleiche 3.2.1.6, Tabelle 2).

Tabelle 9: Einteilung des Patientenkollektivs*

Gruppen Zytokeratin-positiver Zellen	**Bezeichnung der analysierten Gruppen (Zellzahl)**		
M0/CGH-normal	**M0/CGH-normal (38)**	**M0 (46)**	**Patientenzellen gesamt (57)**
M0/CGH-aberrant			
M1/CGH-aberrant			

**Die Einteilung des Patientenkollektivs in einzelne Gruppen erfolgte nach dem Krankheitsstadium des Patienten und dem CGH-Profil der entsprechenden Zytokeratin-positiven Zelle. Alle Zellen besaßen ein normales CGH-Profil in Bezug auf Chromosom 6q. Aus dem gesamten Patientenzellkollektiv konnten die Zellen M0/CGH-normal oder M0 jeweils als Gruppe zusammengefasst analysiert werden. Die Gruppe M0 beinhaltete Zellen, die ein aberrantes CGH-Profil aufwiesen sowie alle Zellen mit normalem CGH-Profil aus der Gruppe M0/CGH-normal. Die Zellen der Patienten im Stadium M1 mit aberrantem CGH-Profil finden sich ausschließlich in der Gruppe des gesamten Patientenzellkollektivs wieder.*

In allen Patientengruppen wies die analysierte Region zwei Bereiche auf, die von einem erhöhten Allelverlust betroffen waren. Zum einen konnte mit den Mikrosatelliten-Markern D6S314 und D6S308 Allelverluste von 47,4% - 70% (D6S314) bzw. 58,8% - 66,7% (D6S308) jeweils für das *gesamte Patientenzellkollektiv* bzw. für die Gruppe *M0/CGH-normal* detektiert werden. Zum

anderen konnten häufige Deletionen in den Genen *PLAGL1* (60%, - 66,7% für Patientengruppe *M0/CGH-normal* bzw. das *gesamte Patientenkollektiv*) und *SASH1* (44,4% - 45,5% für Gruppe *M0/CGH-normal* bzw. Gruppe *M0*) nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu beliefen sich die Allelverluste der Kontrollzellen unter 10 %, eine Ausnahme bildete der Marker rs2268443 innerhalb des Gens *PLAGL1* mit 21,7%.

Alle anderen polymorphen Marker zeigten bei den analysierten Zytokeratin-positiven Zellen geringere Allelverlust-Werte (Abbildung 16, Abbildung 17, Tabelle 10)

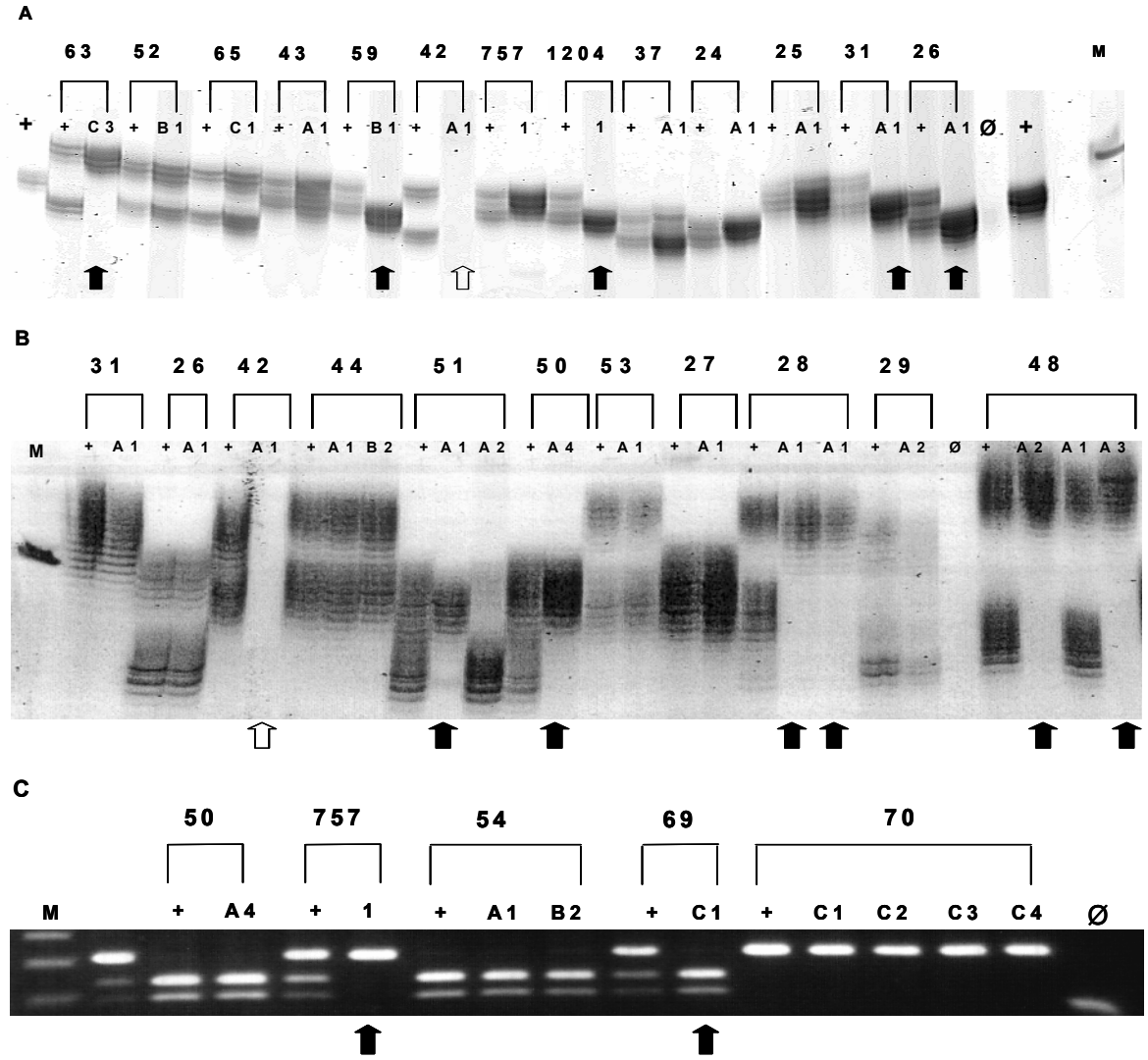


Abbildung 16: Allelverluste bei Patientenzellen

Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der polymorphen Mikrosatelliten-Marker D6S314 (A) und D6S311 (B) sowie des Single Nukleotid-Markers rs920812 (B). Positivkontrollen der Patienten (+), bestehend aus der DNA von Zellpools, sind jeweils neben der dazugehörigen Zytokeratin-positiven Einzelzelle aufgetragen. Der Verlust eines Allels ist mit schwarzen Pfeilen, der komplette Allelverlust mit weißen Pfeilen angezeigt. Polyacrylamidgele mit den PCR-Produkten bestehend aus polymorphen CA-Wiederholungen von 13 Patienten (A) bzw. 11 Patienten (B). Informative Patientenzellen weisen aufgrund ihrer Heterozygotie zwei unterschiedlich lange PCR-Produkte auf. Bei fünf heterozygoten Patienten konnte mit Marker D6S314 ein Allelverlust, bei einem Patient ein kompletter Verlust beider Allele gefunden werden (A). Mit Marker D6S311 konnten bei den heterozygoten Patienten sechs Allelverluste sowie ein Verlust beider Allele festgestellt werden (B).

Die verdauten PCR-Produkte des Markers rs920812 auf einem Agarosegel (C). Bei zwei heterozygoten Patienten (757 und 69) zeigte die Positivkontrolle jeweils das unverdaute Allel und die kleineren Fragmente des verdauten Allels. In der dazugehörigen Zytokeratin-positiven Zelle kann jeweils der Verlust eines Allels detektiert werden.

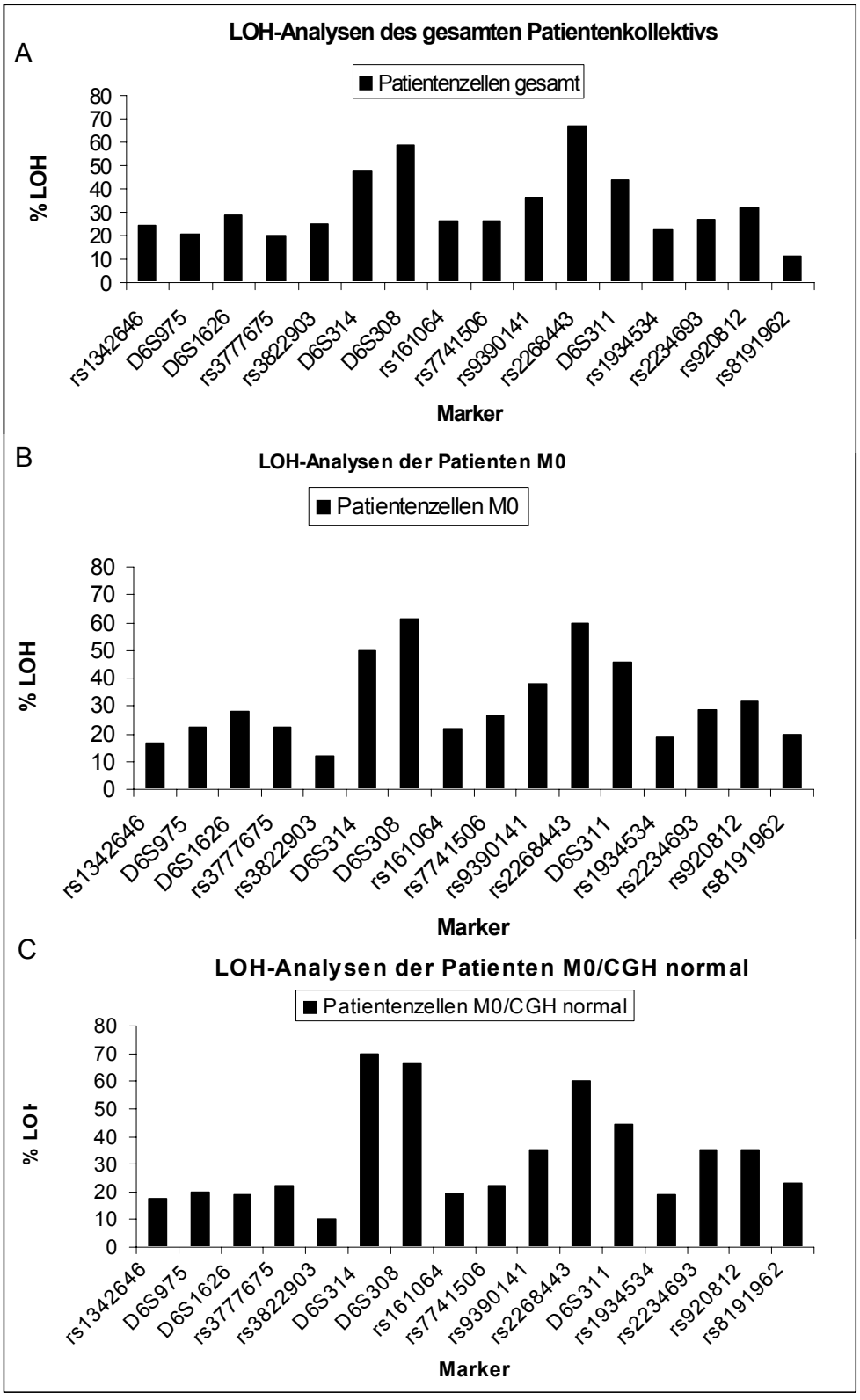


Abbildung 17: Histogramme der Allelverlust-Analysen aller Patientengruppen

Die prozentualen Werte der detektierten Allelverluste aller Patientenzellen (A), der Patientengruppe M0 (B) sowie M0/CGH-normal (C). Die Reihenfolge der polymorphen Marker entspricht ihrer Lokalisation auf dem Chromosom 6q von Zentromer (rs1342646) zu Telomer (rs8191962).

Tabelle 10: Übersicht aller absoluten und prozentualen Werte der Allelverlust-Analysen für alle verwendeten Marker

Gen:	*PTPRK*			*HECA*	*HECA*			*PEX3*	*PHACTR2*	*PHACTR2*	*PLAGL1*	*SASH1*	*LATS1*	*ESR1*	*IGF2R*	*IGF2R*
Lokalisation in Mb	128,3	133,5	136,3	139,5	139,5	140	141	143,8	143,9	144,2	144,3	148,7	150,1	152,3	160,5	160,5
Marker:	rs1342646	D6S975	D6S1626	rs3777675	rs3822903	D6S314	D6S308	rs161064	rs7741506	rs9390141	rs2268443	D6S311	rs1934534	rs2234693	rs920812	rs 8191962
Patientenzellen:																
M0/CGH normal:																
he	19	16	13	7	18	3	3	21	14	11	6	15	17	11	11	10
LOH	4	4	3	2	2	7	6	5	4	6	9	12	4	6	6	3
%LOH	17,4	20	18,8	22,2	10	70	66,7	19,2	22,2	35,3	60	44,4	19	35,3	35,3	23,1
M0/CGH aberrant:																
he	6	5	0	0	4	5	2	4	0	2	2	3	5	4	2	6
LOH	1	2	2	0	1	1	2	2	1	2	3	3	1	0	0	1
%LOH	14,3	28,6	100	0	20	16,7	50	33,3	100	50	60	50	16,7	20	0	14,3
M0*:																
he	25	21	13	7	22	8	5	25	14	13	8	18	22	15	13	16
LOH	5	6	5	2	3	8	8	7	5	8	12	15	5	6	6	4
%LOH	16,7	22,2	27,8	22,2	12	50	61,5	21,9	26,3	38,1	60	45,5	18,5	28,6	31,6	20
M1/CGH aberrant:																
he	6	6	2	5	2	2	2	6	3	3	1	5	2	4	0	9
LOH	5	1	1	1	5	1	2	4	1	1	6	3	2	1	0	0
%LOH	45,5	14,3	33,3	16,7	71,4	33,3	50	40	25	25	85,7	37,5	50	20	0	0
gesamtes Patientenkollektiv:																
he	31	27	15	12	24	10	7	31	17	16	9	23	24	19	13	31
LOH	10	7	6	3	8	9	10	7	6	9	18	18	7	7	6	4
%LOH	24,4	20,6	28,6	20	25	47,4	58,8	26,2	26,1	36	66,7	44	22,6	27	31,6	11,4
Kontrollzellen:																
Kontrollgruppe 1 (Probanden):																
he	8	8	10	10	3	8	4	19	10	16	11	21	6	19	9	14
LOH	1	0	0	1	1	0	0	2	0	1	0	0	0	2	1	1
% LOH	11,1	0	0	9,1	25	0	0	9,5	0	5,9	0	0	0	9,5	10	6,7
Kontrollgruppe 2 (Patienten):																
he	22	25	20	28	14	21	13	35	22	21	18	34	21	22	19	30
LOH	0	3	6	1	4	2	1	4	2	2	5	4	3	1	2	1
% LOH	0	10,7	23,1	3,4	22,2	8,7	7,1	10,3	8,3	8,7	21,7	10,5	12,5	4,3	9,5	3,2
gesamtes Kontrollkollektiv:																
he	30	33	30	38	17	29	17	54	32	37	29	55	27	41	28	44
LOH	1	3	6	2	5	2	1	6	2	3	5	4	3	3	3	2
% LOH	3,2	8,3	16,7	5	22,7	6,5	5,6	10	5,9	7,5	14,7	6,8	10	6,8	9,7	4,3

* Gruppe M0 beinhaltet alle Zellen der Gruppe M0/CGH normal sowie M0/CGH aberrant

4.3.4 Identifizierung deletierter Markersequenzen

Nachdem die absoluten Werte der Allelverlust-Analysen, die jeweils die Anzahl der informativen Zellen und die detektierten Allelverluste für die einzelnen Marker umfassten, ermittelt worden waren, wurden die Ergebnisse der Zytokeratin-positiven Zellen und der Zellen des Kontrollkollektivs 2 im Fisher's Exact Test miteinander verglichen. Bei den p-Werten wurde eine Benjamini-Hochberg-Korrektur vorgenommen. Im Vergleich zu den Kontrollzellen wiesen dabei die Patientengruppen *M0/CGH-normal* und *M0* sowie auch das *gesamte Patientenkollektiv* signifikante p-Werte bezüglich der Marker D6S314 und D6S308 auf. Ein signifikant erhöhter Allelverlust konnte ebenso mit Hilfe von Marker D6S311 innerhalb des Gens *SASH1* nachgewiesen werden. Mit SNP-Marker rs2268443 innerhalb des Gens *PLAGL1* konnte sowohl bei *allen Patienten* ($p^* = 0{,}048$) als auch in der Patientengruppe *M0* ($p^* = 0{,}008$) ein vermehrter Allelverlust detektiert werden. Überdies konnte bei den gesamten Patientenzellen im Gen *PTPRK* ein signifikanter Unterschied zu den normalen Zellen nachgewiesen werden. Somit traten auch anhand der statistischen Analysen zwei Bereiche hervor, deren Allelverluste sich von denen der Kontrollgruppe signifikant unterschieden. Die identifizierten Bereiche mit häufigen Deletionen konnten soweit eingegrenzt werden, dass sie eine maximal mögliche Ausdehnung von 139,5 - 143,8 Mb und 144,2 - 150,1 Mb besaßen. (Tabelle 11).

Tabelle 11: Statistische Auswertung der Allelverlust-Analysen von Zytokeratin-positiven Zellen im Vergleich zu Zellen der Kontrollgruppe 2 unter Angabe der verwendeten Marker bzw. der betroffenen Gene. Signifikante p-Werte sind fett gedruckt.

Marker	Gen	Zellen der Kontrollgruppe 2 gegen Zellen (n=38) der Patientengruppe *M0/CGH-normal* p*	Zellen der Kontrollgruppe 2 gegen Zellen (n=46) der Patientengruppe *M0* p*	Zellen der Kontrollgruppe 2 gegen Zellen (n=57) der *gesamten Patienten* p*
rs1342646	***PTPRK***	0,135	0,126	**0,029**
D6S975		0,355	0,266	0,299
D6S1626		0,529	0,496	0,492
rs3777675	*HECA*	0,214	0,795	0,190
rs3822903	*HECA*	0,343	0,359	0,556
D6S314		**0,013**	**0,032**	**0,024**
D6S308		**0,027**	**0,032**	**0,016**
rs161064	*PEX3*	0,336	0,207	0,324
rs7741506	*PHACTR2*	0,297	0,194	0,174
rs9390141	*PHACTR2*	0,125	0,077	0,069
rs2268443	***PLAGL1***	0,064	**0,048**	**0,008**
D6S311	***SASH1***	**0,016**	**0,016**	**0,014**
rs1934534	*LATS1*	0,450	0,450	0,313
rs2234693	*ESR1*	0,064	0,096	0,085
rs920812	*IGF2R*	0,124	0,158	0,178
rs8191962	*IGF2R*	0,126	0,158	0,317

p* Benjamini-Hochberg korrigiert

Um zu testen, ob in dieser analysierten Region auch innerhalb der Folge der verwendeten Marker ein Bereich mit erhöhten Allelverlusten hervortritt, wurde ausschließlich ein Vergleich der Daten der Patientenzellen angestellt. Signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Markern bildeten dabei die Grenzen von Regionen, die sich in der Häufigkeit von Allelverlusten unterscheiden. Die Ergebnisse der Allelverlust-Analyse jedes Markers wurden daher mit dem jeweils benachbart lokalisierten Marker verglichen (Tabelle 12).

In der Patientengruppe *M0/CGH-normal* lieferten die Ergebnisse der Marker rs3822903 und D6S314 mit einem p-Wert von 0,002 einen signifikanten Unterschied. Ebenso unterschieden sich die Allelverluste zwischen Marker D6S308 und rs161064 (*PEX3*), was in einem signifikanten p-Wert von 0,015 resultierte. Statistisch gesehen unterschieden sich die Verlusthäufigkeiten zwischen den Genen *SASH1* und *LATS1* nicht. Mit 0,060 lag der p-Wert dabei

knapp über der Signifikanzgrenze, wobei allerdings die Tendenz zu einem Unterschied erkennbar ist.

Ein ähnliches Bild ergab der Vergleich der Marker innerhalb der Gruppe der Patienten *M0*. Die Gruppe wies im direkten Vergleich der Marker an gleicher Stelle signifikante Unterschiede auf wie die Patientengruppe *M0/CGH-normal*. Wiederum bildeten die jeweils benachbarten Markerpaare rs3822903 (*HECA*) und D6S314 sowie D6S308 und rs161064 (*PEX3*) signifikante p-Werte. Zusätzlich bestand zwischen den Allelverlusten, die mit Hilfe der Marker D6S311 und rs1934534 detektiert wurden, ein signifikanter Unterschied (p=0,026). Bei allen anderen benachbart liegenden Markern war kein Unterschied in der Häufigkeit eines Allelverlustes feststellbar.

Schließlich waren auch im gesamten Patientenzellkollektiv drei signifikante Unterschiede aufgrund der p-Werte erkennbar. Signifikante Unterschiede bezüglich der Allelverluste konnten zwischen Marker D6S308 und rs161064 ermittelt werden (p=0,004). Zudem hob sich durch signifikante p-Werte ein Bereich hervor, der die Gene *PLAGL1* und *SASH1* beinhaltet. Die Analysen mit den SNP-Markern, die innerhalb dieser Gene liegen, brachten Ergebnisse hervor, die sich signifikant von den jeweils benachbart lokalisierten Markern innerhalb der Gene *PHACTR2* (rs7741506) und *LATS1* (rs1934534) unterschieden (p=0,026 und p=0,050).

Somit konnten in allen drei analysierten Patientengruppen indirekt Regionen nachgewiesen werden, die sich bezüglich der Ergebnisse der Allelverlust-Analysen voneinander unterschieden. Allen drei Gruppen ist ein signifikanter Unterschied zwischen Marker D6S308 und rs161064 (*PEX3*) gemeinsam.

Tabelle 12: Identifizierung der Bereiche, die innerhalb der analysierten Region durch erhöhte Allelverluste hervortreten. Signifikante p-Werte sind fett gedruckt.

Marker	Gen	Markervergleich: Zellen der Patientengruppe M0/CGH-normal	Markervergleich: Zellen der Patientengruppe M0	Markervergleich: Zellen der gesamten Patienten
rs1342646	*PTPRK*	0,566	O,422	0,456
D6S975		0,631	0,399	0,359
D6S1626		0,609	0,571	0,427
rs3777675	*HECA*	0,364	0,400	0,507
rs3822903	*HECA*	**0,002**	**0,012**	0,092
D6S314		0,630	0,404	0,363
D6S308		**0,015**	**0,015**	**0,004**
rs161064	*PEX3*	0,549	0,486	0,345
rs7741506	*PHACTR2*	0,315	0,325	0,335
rs9390141	*PHACTR2*	0,149	0,138	**0,026**
rs2268443	***PLAGL1***	0,260	0,229	0,055
D6S311	***SASH1***	0,060	**0,026**	**0,050**
rs1934534	*LATS1*	0,223	0,316	0,470
rs2234693	*ESR1*	0,640	0,554	0,490
rs920812	*IGF2R*	0,377	0,323	0,075
rs8191962	*IGF2R*			

5 Diskussion

Den Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit bildete die Hypothese, dass ein Verlust des IGF2-Rezeptors zu einer aberranten Expression von Cathepsinen auf der Oberfläche von Tumorzellen führt. Zum einen wird diese Annahme dadurch gestützt, dass in IGF2-Rezeptor-defizienten Fibroblasten der Maus das Fehlen des IGF2-Rezeptors zu einer Sezernierung von lysosomalen Enzymen führt [46]. Zum anderen weisen eine Vielzahl von Tumoren einen Verlust von Chromosom 6q, dem Genort des IGF2-Rezeptors auf [65]. Zudem konnte die Expression von Cathepsin B auf der Oberfläche von humanen Mammakarzinomzelllinien durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen werden [32]. Daher sollten in Tumorzellen der Verlust des *IGF2*-Rezeptors sowie die Folgen dieses genetischen Defekts, nämlich die membranständige Expression von Cathepsinen, und damit ihr funktioneller Zusammenhang, nachgewiesen werden.

5.1 Cathepsine auf der Oberfläche von Tumorzellen

Das vermehrte Vorkommen von lysosomalen Proteasen, zu denen auch die Cathepsine zählen, in den Geweben verschiedener Tumoren ist seit längerem bekannt. Da sie an der Degradierung der extrazellulären Matrix, dem Tumorwachstum, der Invasion, Migration und Angiogenese beteiligt sind [39] und damit eine Rolle bei der malignen Progression von Tumoren besitzen, wurden hier Tumorzelllinien der Brust, Lunge und Niere auf die membranständige Expression von Cathepsinen hin untersucht.

Dabei konnten durch Immunfluoreszenz-Färbungen mit Hilfe polyklonaler Antikörper die Cathepsine B, D, H, L und S auf der Oberfläche adhärent wachsender Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Durch die Verwendung polyklonaler Antikörper konnte aufgrund der erhöhten Anzahl der bindenden Antikörperepitope von einer größeren Bindungswahrscheinlichkeit ausgegangen werden. Im Verlauf der Experimente traten jedoch Zweifel an der Spezifität der polyklonalen Antikörper auf, so dass auf einen kommerziell erworbenen, monoklonalen Antikörper gegen Cathepsin B zurückgegriffen wurde. Da Cathepsin B auf der Oberfläche aller verwendeten Tumorzelllinien zunächst

nachgewiesen worden war, konzentrierten sich die nachfolgenden Versuche auf diese Protease. Um eine möglichst sensitive und quantitative Detektionsmethode zur Anwendung zu bringen, wurden die Cathepsin-Färbungen im Durchflusszytometer analysiert. Für die Etablierung einer Positivkontrolle wurde versucht, durch Stimulation von myeloiden und lymphoiden Tumorzelllinien eine membranständige Cathepsin B-Expression zu induzieren. Es ist bekannt, dass sich durch eine Stimulation von Monozyten, die eine Differenzierung der Zellen zu Makrophagen zur Folge hat, die intrazelluläre Cathepsin B-Expression erhöht [57]. Eine erfolgreiche Stimulation mit anschließender Oberflächenexpression konnte bei den monozytären Zelllinien durch eine Antikörperfärbung mit anschließender FACS-Analyse nachgewiesen werden. Dabei wurden aber bei diversen Wiederholungen trotz identischer Stimulationsbedingungen teilweise sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Da anfangs vermutet wurde, dass die Stimulierbarkeit der Zellen oder die Cathepsin B-Expression auf der Zelloberfläche abnimmt, je länger sich die Zellen in Kultur befinden, wurden für die Stimulationen immer wieder Zellen neu in Kultur genommen. Die Monozytenstimulationen verliefen daraufhin dennoch sehr inkonsistent, so dass die Stimulierbarkeit der Zellen nicht vom Zeitpunkt abhängig schien, wann die Zellen in Kultur genommen werden. Dies legt den Schluss nahe, dass die erfolgreiche Monozytenstimulation offenkundig von nicht bekannten Faktoren maßgeblich beeinflusst wird. Da auch das beste erzielte Färbeergebnis bei stimulierten Monozyten nur einen ΔMFI-Wert von 7,16 aufwies, konnte das membranständige Cathepsin B aufgrund der niedrigen Intensität in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grunde wurde zusätzlich versucht, Cathepsin B mit Hilfe eines spezifischen Inhibitors auf der Zelloberfläche nachzuweisen. Mit dem Cathepsin B-Inhibitor NS-196 sollte eine sensitivere Detektion durch die hohe Bindungsaffinität der Inhibitor-Moleküle erreicht werden, um Zellen mit membranständigen Cathepsinen auch in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie identifizieren zu können. Mit dem biotinylierten Inhibitor konnte bereits membranständiges Cathepsin B auf anti-CD3-stimulierten T-Zellen in der FACS-Analyse nachgewiesen werden [60]. Für die Etablierung dieser Immunfluoreszenz-Färbung wurde eine T-Zelllinie mit einem Antikörper gegen CD3 stimuliert. Zwar konnte mit einer Immunfluoreszenz-Färbung die Bindung des Antikörpers an die Zelloberfläche kontrolliert werden, allerdings war es auch nach unterschiedlichen

Stimulationszeiten nicht möglich, eine Oberflächenexpression von Cathepsin B nachzuweisen. Der Inhibitor NS-196 brachte somit keine Verbesserung der Cathepsin B-Detektion mit sich, so dass für nachfolgende Analysen die Antikörperfärbung verwendet wurde.

Da die Tumorzelllinien im Gegensatz zu den monozytären Zelllinien nicht in Suspension, sondern adhärent wachsen, mussten die Färbeprotokolle entsprechend abgeändert werden. Die Ablösung der adhärenten Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen mit Trypsin/EDTA musste jedoch umgangen werden, da EDTA als Chelatbildner die Ca^{2+}-abhängige Bindung von Cathepsin B und dem Annexin-II-Tetramer auf der Oberfläche der Zellen löst [43]. Aus diesem Grund wurden aus den abgelösten Zellen zunächst Sphäroide generiert, deren Zellen nach etwa 24 h wieder durch Resuspension vereinzelt werden konnten, ohne dass die Zelloberfläche beeinflusst wurde. Die FACS-Analysen der Antikörperfärbungen zeigten jedoch bei allen getesteten Tumorzelllinien keine Cathepsin B-Expression auf der Oberfläche, obwohl alle Zelllinien mit Ausnahme von SkBr3 einen in der CGH detektierten Verlust von Chromosom 6q und damit eine Deletion zumindest eines Allels des *IGF2*-Rezeptors besitzen. Auch bei Tumorzellen aus Pleuraergüssen von Mammakarzinompatienten blieb eine Detektion von membranständigem Cathepsin B erfolglos. Eine Fixierung der Zellen mit 3-8% PFA vor der Oberflächenfärbung, wie sie bei membranständigen Cathepsin-Färbungen üblicherweise eingesetzt wird [32, 66], konnte dabei nicht vorgenommen werden, da dies zur Permeabilisierung und damit zu intrazellulären Färbung der Zellen führte.

In der vorliegenden Arbeit konnten zwar durch Stimulation von Monozyten membranständige Cathepsine im Zuge der Zelldifferenzierung nachgewiesen werden, doch konnte das in der Literatur diskutierte Vorkommen von Cathepsinen auf der Tumorzelloberfläche, wo sie an der malignen Progression beteiligt sind, nicht gezeigt werden [43, 67]. So konnten Sameni und Mai membranständiges Cathepsin B auf der Zelloberfläche der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT20, die auf Glasobjektträger kultiviert waren, nach einer Fixierung der Zellen mit Formaldehyd anhand einer Antikörperfärbung im Mikroskop detektieren [32, 43]. Der Nachweis von membranständigem Cathepsin B auf der Tumorzelloberfläche konnte bisher allerdings mit Hilfe der sensitiveren FACS-Analyse noch nicht erbracht werden. Eine Ausnahme bildet dabei nur die FACS-Detektion von

Cathepsin B auf der Zelloberfläche stimulierter T-Zellen durch den spezifischen Inhibitor NS-196 [60].

Zusammenhang zwischen Verlust des IGF2-Rezeptors und der Oberflächenexpression von Cathepsin

Parallel zu den Versuchen, membranständiges Cathepsin B auf Tumorzellen zu detektieren, wurde der Lokus des IGF2-Rezeptors, der bereits als Tumorsuppressor diskutiert wird, nach genetischen Aberrationen untersucht. Der IGF2-Rezeptor hat in seiner Funktion als Mannose-6-Phosphat-Rezeptor die Aufgabe, neu synthetisierte Enzyme vom Golgi-Apparat in die Lysosomen zu sortieren [68]. Neben dem auf Chromosom 6q lokalisierten IGF2-Rezeptor konnte zusätzlich ein Rezeptor, nämlich MPR 46, mit gleicher Funktion identifiziert werden, dessen Gen sich auf Chromosom 12p befindet [45]. Der Funktionsverlust eines der beiden Rezeptoren führt bereits zur Sezernierung lysosomaler Proteine, wobei aber keiner der beiden Rezeptoren über eine spezielle Bindungsaffinität zu lysosomalen Proteinen verfügt, so dass eine teilweise Übernahme der gegenseitigen Rezeptorfunktion beobachtet werden konnte [46]. Somit könnte MPR 46 auch bei einem Verlust von Chromosom 6q die Aufgabe des IGF2-Rezeptors, die Sortierung der Enzyme in die Lysosomen, zum Teil übernehmen, so dass nur eine geringe, in Färbungen nicht detektierbare Menge an Cathepsin B zur Zelloberfläche gelangt. Da angenommen wurde, dass die fehlerhafte Expression lysosomaler Proteasen die Folge einer genetischen Aberration darstellt, wurde auf Chromosom 6q der Genlokus des IGF2-Rezeptors untersucht.

5.2 Chromosomale Aberrationen auf Chromosom 6q

CGH- und Allelverlust-Analysen zufolge treten chromosomale Verluste auf Chromosom 6q in bis zu 77% der malignen Tumoren der Brust auf [65, 69]. Auch in disseminierten, Zytokeratin-positiven Tumorzellen aus dem Knochenmark von Mammakarzinompatienten im Stadium M1 ist der lange Arm von Chromosom 6q in 44% von Deletionen betroffen [61]. In dieser Region liegende Gene könnten daher Einfluss auf die Malignität disseminierter Tumorzellen haben. Da das

Tumorsuppressorgen des IGF2-Rezeptors auf Chromosom 6q25 lokalisiert ist, sind sowohl Tumoren als auch disseminierte Tumorzellen von Mammakarzinompatienten im Stadium M1 von einem Allelverlust des *IGF2*-Rezeptorgens betroffen.

Für die Detektion subchromosomaler Veränderungen, die bereits zu einem frühen Zeitpunkt der malignen Progression vorhanden sind, wurde die Methode der Allelverlust-Analyse gewählt. Mit Hilfe von polymorphen Mikrosatelliten- und Single Nukleotid-Polymorphismen auf Chromosom 6q22-25 wurden die Allele des Einzelzellgenoms analysiert. Bei Patienten, die über ein unterscheidbares maternales und paternales Allel verfügten, war es möglich, Allelverluste aufzuzeigen. Die Methode der CGH hingegen besitzt nur ein Auflösungsvermögen von höchstens 10 Mb, so dass Deletionen kurzer DNA-Sequenzen hier im Gegensatz zur Allelverlust-Analyse unentdeckt bleiben. Da hier die Allelverlust-Analysen am Einzelzellgenom mit mehreren polymorphen Markern durchgeführt werden sollten, musste die Zell-DNA mehrfach molekularbiologisch modifiziert werden, um schließlich global amplifiziert werden zu können.

5.2.1 Kontrollzellen

Um die Daten der Allelverlust-Analysen auswerten zu können, wurde neben den Zytokeratin-positiven Zellen auch ein Kontrollkollektiv bestehend aus Zytokeratin-negativen Einzelzellen bearbeitet. Damit konnte die Häufigkeit eines Allelverlustes ermittelt werden, die bedingt durch die einzelnen Arbeitsschritte oder als spontanes Ereignis in der Zelle auftritt. Um auszuschließen, dass bei der Immunzytochemie alleine das Färbepräzipitat zu artifiziellen Allelverlusten führt, wurden sowohl gegen Vimentin gefärbte Einzelzellen junger Probanden als auch ungefärbte, Zytokeratin-negative Einzelzellen von Tumorpatienten miteinander verglichen. Dabei konnten innerhalb der gesamten Analyse im Kollektiv der Zytokeratin-negativen Patientenzellen 95%, in der Kontrollgruppe der jungen Probanden sogar 97,3% der Allele detektiert werden (χ^2–Test, p=0,063). Dieses Ergebnis zeigte zum einen, dass das Färbepräzipitat in den Zellen keinerlei Einfluss auf die Häufigkeit eines Allelverlusts hat. Zum anderen wiesen die normalen, Zytokeratin-negativen Patientenzellen im Vergleich zu den Zellen junger Probanden eventuell altersbedingt oder aufgrund der Tumorerkrankung mehr

Allelverluste auf. Somit stellte die Kontrollgruppe der Patientennormalzellen das geeignetere Kontrollkollektiv dar, um damit das Auftreten eines Allelverlusts in Zytokeratin-negativen und -positiven Zellen statistisch zu vergleichen. Der Allelverlust in den Kontrollzellen lag bei durchschnittlich 10,3%, schwankte aber für die einzelnen LOH-Marker zwischen 0% und 23,1%. Mit dem Mikrosatelliten-Marker D6S1626 und dem Single Nukleotid-Marker rs3822903 wurden bei den Kontrollzellen mit 23,1 % und 22,2 % die häufigsten Allelverluste detektiert. Marker D6S1626 befindet sich auf einem durch den Mse I-Verdau des Zellgenoms generierten 584 bp langen Fragment. Unter den Fragmenten, welche die Markersequenzen beinhalten, ist dies eines der längsten. Das kürzeste Fragment hingegen, auf dem der Marker rs3822903 lokalisiert ist, besitzt nur eine Länge von 151 bp. Die meisten Marker, die bei den Zytokeratin-negativen Zellen Allelverluste von etwa 10% detektierten, befinden sich dagegen auf DNA-Fragmenten zwischen 200 und 400 bp Länge. Da die Qualität der Amplifikation von der Länge der DNA-Fragmente abhängen kann, könnte diese somit auch die Häufigkeit der Allelverluste beeinflussen.

5.2.2 Allelverlust-Analyse in der Region 6q25

Da karyotypisch normale, Zytokeratin-positive Zellen aus dem Knochenmark vermutlich frühe genetische Veränderungen der Brustkrebserkrankung bergen [28], wurden größtenteils disseminierte Tumorzellen von Patienten des Stadiums M0 analysiert, die keinerlei CGH-Veränderungen aufwiesen. Andere Patientenzellen mit aberranten CGH-Profilen aus den Stadien M0 oder M1, die in die Allelverlust-Analysen einbezogen waren, wiesen auf Chromosom 6q, dem Genort des IGF2-Rezeptors, keine Aberrationen auf. Damit sollten die genetischen Aberrationen von Zellen detektiert werden, die am Anfang der malignen Progression stehen.

Für die Allelverlust-Analyse des *IGF2*-Rezeptorgens wurden drei Mikrosatelliten-Polymorphismen, ein Tetranukleotid- und ein Single Nukleotid-Polymorphismus verwendet. Den Angaben der *Unified Database* des *Weizmann Institutes* aus dem Jahre 2002 zufolge befanden sich die gewählten Single Nukleotid-Polymorphismen innerhalb des Rezeptorgens, während die Mikrosatelliten-Polymorphismen in einem Abstand bis zu 1,9 Mb vom Gen entfernt

lagen. Anhand dieser fünf LOH-Marker konnten Allelverluste in den disseminierten Tumorzellen detektiert werden. Das Ergebnis der Allelverlust-Analysen zeigte jedoch ein Deletionsmuster, wonach nicht die LOH-Marker innerhalb des Rezeptors, sondern die entfernter lokalisierten Mikrosatelliten-Marker häufig Allelverluste aufwiesen. Während die Marker rs920812 und rs8191962 innerhalb des *IGF2*-Rezeptorgens bei den Patientenzellen einen Allelverlust von 31,6% bzw. 11,4% aufzeigten, konnte mit den vom Gen entfernter liegenden Mikrosatelliten-Markern D6S314, D6S308 und D6S1633 ein Allelverlust von 22,2% (D6S1633), 47,4% (D6S308) und 58,8% (D6S314) nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Marker D6S308 und D6S314 einen signifikanten Unterschied ($p^*=0,015$) zu den Kontrollzellen. Der Unterschied in der Anzahl der Allelverluste von etwa 20% innerhalb des *IGF2*-Rezeptorgens, der mit Hilfe der benachbart liegenden Marker rs920812 (31,6%) und rs8191962 (11,4%) detektiert worden war, ist wahrscheinlich in der Anzahl der informativen Patientenzellen zu sehen. Bezüglich Marker rs920812 standen nur 13 informative Patienten zur Verfügung, während sich die Zahl der heterozygoten Zellen bei Marker rs8191962 auf 31 belief, so dass dieser Wert den tatsächlichen Alleverlust eher widerspiegelt. Zudem konnte weder ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollzellen, noch ein signifikanter Unterschied zwischen den detektieren Allelverlusten beider Marker festgestellt werden ($p=0,075$), womit ein vermehrter Allelverlust des *IGF2*-Rezeptors in disseminierten Tumorzellen nicht bestätigt werden konnte. Der mögliche Verlust des IGF2-Rezeptors, den die chromosomalen Aberrationen auf Chromosom 6q mit sich bringen, konnte bei den disseminierten Tumorzellen im Gegensatz zu den Zellen des Primärtumors nicht beobachtet werden. Den Allelverlust-Analysen zufolge kann ausgeschlossen werden, dass ein Verlust des IGF2-Rezeptors eine in der malignen Progression früh auftretende Aberration in disseminierten Tumorzellen darstellt.

Durch die vollständige Sequenzierung des humanen Genoms veränderten sich allerdings im Jahre 2004 die Lokalisationen der bis dahin verwendeten LOH-Marker grundlegend (siehe Abbildung 14), so dass die signifikanten Allelverluste, die mit den LOH-Marker D6S308 und D6S314 gefunden wurden, eine vom ursprünglichen Ort um mehr als 30 Mb entfernt liegende Position einnahmen. Marker D6S314 und D6S308 detektierten somit eine auf Chromosom

6q24 lokalisierte Region mit häufigen Allelverlusten, die im Zuge dieser Arbeit näher charakterisiert wurde.

5.2.3 Allelverlust-Analyse der Region auf Chromosom 6q22-25

Diese mit den Markern D6S314 und D6S308 gefundene Region, die etwa 20 Mb vom Genort des IGF2-Rezeptors entfernt liegt, sollte daher auf Aberrationen untersucht werden. Durch die Hinzunahme von weiteren LOH-Markern, die Single Nukleotid- und Mikrosatelliten-Polymorphismen umfassten, wurde versucht, diese Region genauer zu analysieren und zu charakterisieren. Mit Hilfe von 16 LOH-Markern, die auf Chromosom 6q zwischen 128,3 − 160,5 Mb liegen, konnte die Region weitgehend eingegrenzt werden. Diese Grenzen wurden durch Marker identifiziert, die mit Ausnahme des Markers rs1342646 im Gen *PTPRK* keine signifikant erhöhten Allelverluste im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten. Dabei wies keine Patientengruppe einen Allelverlust auf, der über 35% lag. Im Gegensatz dazu wurde eine definierte Region von 140 − 152 Mb mit signifikanten Allelverlusten im Vergleich zu der Patientenkontrollgruppe gefunden. Mit Hilfe der Marker D6S314 (140 Mb) und D6S308 (141 Mb) konnten in allen Patientengruppen signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen gefunden werden ($p^* \leq 0{,}032$). Diese von häufigen Allelverlusten betroffene Region wird flankiert von den SNP-Markern rs3822903 und rs161064, die weder einen erhöhten Allelverlust noch einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollzellen aufwiesen.

Im weiteren Verlauf der analysierten Region wurden fast ausschließlich intragenetische LOH-Marker verwendet, um die von Allelverlusten betroffenen Gene zu detektieren. Marker rs2268443 im Gen *PLAGL1* und D6S311 im Gen *SASH1* zeigten in allen Patientengruppen meistens signifikant erhöhte Allelverluste ($p^* \leq 0{,}048$), eine Ausnahme bildete dabei nur der Marker rs2268443 im Gen *PLAGL1* in der Patientengruppe *M0/CGH-normal* ($p^* = 0{,}064$). Die zu beiden Seiten der Gene benachbart liegenden SNP-Marker rs2268443 (144,2 Mb) und rs1934534 (150,1 Mb) begrenzen diese Region, da sie keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollzellen aufwiesen. Anhand der Allelverlust-Analysen können letztlich zwei Regionen definiert werden, die in der CGH nicht detektierte Deletionen beinhalten. Zum einen definieren die Marker D6S314 (140 Mb) und

D6S308 (141 Mb) einen häufig deletierten Bereich, der aufgrund der Lage benachbarter Marker, die keinen signifikanten Unterschied zu den Allelverlusten in den Kontrollzellen aufdeckten, eine maximale Ausdehnung von 139,5 − 143,8 Mb besitzen kann. Zum anderen wird die zweite Region mit erhöhten Allelverlusten von den intragenetischen Markern der Gene *PLAGL1* und *SASH1* definiert, die sich bei 144,3 Mb bzw. 148,7 Mb befinden. Abhängig von der Lokalisation benachbarter Marker, anhand derer kein vermehrter Allelverlust detektiert werden konnte, kann sich diese Region maximal von 144,2 − 150,1 Mb erstrecken. Die zwei Regionen mit erhöhtem Allelverlust werden getrennt von einem Bereich, der mit Hilfe von drei, zwischen 143,8 - 144,2 Mb lokalisierten SNP-Markern untersucht wurde, die in keiner der Patientengruppen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe aufwiesen. Die Ausdehnung dieses Bereichs, der nur selten von Allelverlusten betroffen ist, kann dabei maximal eine Länge von 4,3 Mb betragen. Damit wurde klar aufgezeigt, dass die Region auf Chromosom 6q, die in der Literatur als häufig deletierte Region bei Tumoren diskutiert wird, in zwei Bereiche mit erhöhtem Allelverlust unterteilt ist (Abbildung 18).

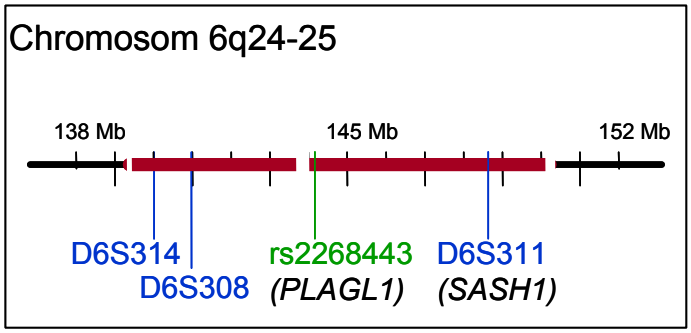


Abbildung 18: Chromosom 6q24-25 mit der maximal möglichen Ausdehnung der zwei häufig deletierten Regionen

Regionen auf Chromosom 6q24-25, die häufig von Allelverlusten betroffen sind (rote Balken) sowie die Mikrosatelliten-Marker (blau) und der Single Nukleotid-Marker (grün), die zur Identifizierung der Regionen und der Gene PLAGL1 und SASH1 beitrugen. Zwischen den zwei häufig deletierten Regionen wurde auf einer Länge von 0,4 Mb mit drei Markern ein Bereich ohne signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen detektiert. Dieser Bereich kann sich auf eine Länge von bis zu 4,3 Mb erstrecken.

Dieses Ergebnis konnte nochmals untermauert werden, indem die LOH-Ereignisse der jeweils benachbarten Marker miteinander verglichen wurden. In den Patientengruppen grenzten sich die Marker, durch welche die zwei detektierten

Regionen bereits identifiziert wurden, meist durch signifikante oder tendenziell signifikante p-Werte im Vergleich zu den jeweils benachbart liegenden Markern ab. (vergleiche Tabelle 12). Der Vergleich der Allelverlust-Analysen der Marker zueinander bestätigte somit die schon durch die Vergleiche mit der Kontrollgruppe gefundenen zwei Regionen, die häufig von Allelverlusten betroffen sind.

Schon 1996 brachten Allelverlust-Analysen auf dem oft deletierten Chromosom 6q beim Mammakarzinom Hinweise, dass es sich dabei möglicherweise um vier einzelne Regionen handelt, die Allelverluste bergen. Eine der potentiell identifizierten Regionen umfasste dabei mit den Markern D6S292-D6S310-D6S314-D6S311 den jetzigen Locus 6q24-25 [69]. Die Lokalisation des Markers D6S292 ist mittlerweile in der *Ensembl* Datenbank nicht mehr verfügbar, was vermutlich auf die komplette Sequenzierung des humanen Genoms und die damit verbundene veränderte Lokalisierung der Markersequenzen zurückzuführen ist, denn auch die Lokalisation der Marker D6S310, D6S311 und D6S314 hat sich mittlerweile etwas verändert. Anhand der Marker D6S314 und D6S311, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, konnte eine hohe Anzahl von Allelverlusten auf 6q24 detektiert werden. Der über 8 Mb große Abstand zwischen D6S314 und D6S311 wurde hier allerdings noch mit fünf weiteren Markern auf Allelverluste hin untersucht. Diese Allelverlust-Analysen zeigten, dass zwischen den beiden Markern eine Region existiert, die nur selten von Allelverlusten betroffen ist. Diese Region, die mit drei LOH-Markern analysierte wurde, trennt damit die von Noviello [69] vorgeschlagene deletierte Region in zwei Bereiche auf, die sich durch hohe Allelverluste auszeichnen.

5.2.4 Gene in den häufig deletierten Regionen

Die durch die LOH-Marker D6S308 und D6S314 detektierte Region mit häufigem Allelverlust besitzt eine maximale Ausdehnung von 4,3 Mb. Die Region zwischen 139,5 − 143,8 Mb beinhaltet 9 Gene, die somit von einer frühen Deletion betroffen sein könnten (Tabelle 13).

Tabelle 13: Lokalisation und Name der Gene innerhalb der Region 139,5 – 143,6 Mb auf Chromosom 6q nach Angaben der Datenbanken *Ensembl* und *UniProt* (Stand: Juli 2006)

Lokalisation	Gen	Name
139,6 Mb	*TXLNB*	Beta-taxilin (Muscle-derived protein 77)
139,7 Mb	*CITED2*	Cbp/p300-interacting transactivator 2
142,0 Mb	*LIN1 HUMAN*	LINE-1 reverse transcriptase homolog
142,4 Mb	*NMBR*	Neuromedin-B receptor
142,5 Mb	*CF055 HUMAN*	Protein C6orf (Dopamine-responsive protein DRG-1)
142,7 Mb	*GPR126*	Probable G-protein coupled receptor 126 precursor
143,1 Mb	*HIVEP2*	Human immunodeficiency virus type 1 enhancer-binding protein 2
143,4 Mb	*AIG1*	Androgen-inducer protein 1
143,8 Mb	*DEADC1*	Deaminase domain containing 1

Die in Tabelle 13 aufgeführten Gene, die in dem identifizierten Bereich lokalisiert sind, beinhalten kein derzeit bekanntes Tumorsuppressorgen. Demnach ist bezüglich der Tumorprogression die Auswirkung einer Deletion in diesem Bereich nicht direkt offensichtlich. Die Auswertung des komplett sequenzierten humanen Genoms in Bezug auf die Protein-kodierenden Sequenzen dauert derzeit noch an, so dass dies noch weitere Informationen in Bezug auf das Transkriptom liefern wird. Damit könnten zum einen noch weitere (Tumorsuppressor-)Gene, zum anderen die exakte Protein-Funktion identifiziert werden, so dass ein kausaler Zusammenhang zwischen einer Deletion in diesem Bereich und der Tumorprogression gesehen werden könnte.

Zudem wurden die nicht-Protein-kodierenden Gene in Betracht gezogen. Dazu zählen die Gene, die als sogenannte MikroRNAs nicht translatiert werden, aber regulatorischen Einfluss auf Transkription und Translation besitzen. Auf diese Weise können sie als Onko- oder Tumorsuppressorgene fungieren [70]. Eine Deregulation der MikroRNA-Expression konnte bereits auch bei der Brustkrebserkrankung nachgewiesen werden [71]. Bei den in der Region von 139,5 − 143,8 Mb lokalisierten MikroRNAs handelt es sich um 7 Gene, die

allerdings derzeit keine bekannte regulatorische Funktion auf andere Gene besitzen.

Die zweite durch die Marker rs22684433 und D6S311 detektierte Region erstreckt sich über eine maximal mögliche Ausdehnung von 5,9 Mb zwischen 144,2 − 150,1 Mb und beinhaltet derzeit 21 Gene (Tabelle 14).

Tabelle 14: Lokalisation und Name der Gene innerhalb der Region 144,2 – 150,1 Mb auf Chromosom 6q nach Angaben der Datenbanken *Ensembl* und *UniProt* (Stand: Juli 2006)

Lokalisation	Gen	Name
144,2 Mb	*LTV1*	No description
144,3 Mb	*PLAGL1**	Pleiomorphic adenoma-like protein 1
144,5 Mb	*SF3B5*	Splicingfactor 3B subunit 5
144,5	*STX11*	Syntaxin 11
144,7	*UTRN*	Utrophin (Dystrophin related protein 1)
146,0	*EPM2A*	Laforin
146,2	*FBXO30*	F-box only protein 30
146,2	*SHPRH*	SNF2 histone linker PHD RING helicase
146,4	*GRM1*	Metabotropic glutamate receptor 1 precursor
146,9	*RAB32*	Ras-related protein
147,0	*Q5T904 HUMAN*	
147,6	*STXBP5*	Syntaxin-binding protein 5
147,9	*NP001025231.1*	
148,7	*SASH1**	SAM and SH3 domain-containing protein 1
149,1	*UST*	Uronyl2-sulfotransferase
149,7	*MAP3K7IP2*	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7-interacting protein
149,8	*SUMO4*	Small ubiquitin-related modifier 4 precursor
149,8	*Q6ZRW2*	No description
149,9	*PPIL4*	Peptidylprolyl isomerase-like 4
149,9	*CFO72 HUMAN*	Protein C6orf72 precursor
150,0	*KATNA1*	Katanin p60 ATPase-containing subunit A1

* Gene, die anhand eines Single Nukleotid-Polymorphismus-Markers in den Allelverlust-Analysen untersucht wurden

Von den in der Region lokalisierten Genen werden derzeit in der Literatur nur der Transkriptionsfaktor PLAGL1 sowie das Adaptorprotein SASH1 als (mögliche) Tumorsuppressoren diskutiert [72, 73], so dass eine Deletion der Gene mit der Tumorigenese einhergehen könnte. Die in dieser Region lokalisierte MikroRNA scheint keinen bisher bekannten regulatorischen Einfluss auf ein Zielgen zu besitzen (Stand Juni 2006, Lokalisation der MikroRNAs vergl. Abbildung 15).

5.2.5 Relevanz der durch Allelverlust-Analysen identifizierten Gene

Das Gen *PLAGL1* (Pleiomorphic adenoma-like protein 1), auch bekannt als *ZAC1* oder *LOT1*, kodiert für ein Zinkfingerprotein und konnte in Ovarial- und Mammakarzinomzelllinien und Zellen aus dem Primärtumor als Transkriptionsfaktor mit anti-proliferativer Wirkung identifiziert werden [72]. Die Expression des Transkriptionsfaktors induziert in Ovarialkarzinomzelllinien eine P53-abhängige Apoptose [74], denn das Protein PLAGL1 scheint sowohl ein transkriptioneller Coaktivator des Tumorsuppressorgens *TP53* zu sein als auch selbst von P53 aktiviert zu werden. P53 kann wiederum das Gen *APAF1* (Apoptose Protease-aktivierender Faktor 1) aktivieren und so Apoptose induzieren. Somit steht der apoptotische Prozess, der durch APAF1 ausgelöst wird, auch unter dem Einfluss von PLAGL1 [75, 76]. Da aber bislang sehr selten disseminierte Tumorzellen aus dem Knochenmark von Mammakarzinompatienten im Stadium M0 gefunden werden konnten, die eine Mutation im Gen *TP53* aufwiesen [77], scheint der Verlust von PLAGL1 die Apoptose der Zellen zu verhindern. Ebenso wird diskutiert, dass durch einen konstitutiv aktiven Signalweg des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (Epidermal Growth Factor Receptor, EGF-Rezeptor) die Expression des Gens herunterreguliert wird [78]. Das Vorhandensein der Liganden des EGF-Rezeptors bringt eine niedrigere mRNA-Expression von *PLAGL1* mit sich, bei Blockierung des EGF-Rezeptors hingegen befindet sich der mRNA-Level wieder auf normalem Niveau. PLAGL1 scheint damit ein Zielprotein des EGF-Rezeptor-Signalwegs zu sein, dessen übermäßige Aktivierung, wie es häufig in Ovarial- und Mammakarzinomen der Fall ist, vermutlich auch mit einer schlechteren Prognose für die Patienten einhergeht [72, 78-81]. Scheinbar können auch epigenetische Veränderungen, wie Methylierung und Histondeacetylierung, die Expression von PLAGL1 in Ovarial- und Brusttumoren verhindern [72]. So konnten zwar bei Ovarialkarzinomen keine somatischen Mutationen im Gen aufgezeigt werden, allerdings wurden Veränderungen im allelspezifischen Methylierungsmuster entdeckt. Schon in frühen Stadien des Ovarialkarzinoms geht oftmals eine Hypermethylierung des Gens mit einer verringerten Expression von *PLAGL1* einher. Dagegen zeigten Ovarialkarzinomzelllinien mit reduzierter *PLAGL1*-Expression sowie Hypermethylierung mit Hilfe von demethylierenden Agentien wieder erhöhte *PLAGL1*-Expression. Ebenso konnte durch die Expression von

PLAGL1-transfizierten Zelllinien ein auf die Proliferation negativer Effekt gesehen werden. Anhand dieser Beobachtungen wird die fehlerhafte Funktion von PLAGL1 als wichtiger Faktor in der Progression des Ovarialkarzinoms vermutet [74].

Ausgehend von Knudson's „two hit hypothesis" [82] müssen aufgrund des humanen diploiden Chromosomensatzes immer zwei Ereignisse in Form von Mutationen in einem Gen erfolgen, um einen Funktionsverlust eines Gens bzw. Tumorsuppressorgens zu erhalten. Allerdings könnten auch epigenetische Veränderungen, wie ein verändertes Methylierungsmuster des verbleibenden Allels, den Funktionsausfall verursachen [83]. Ebenso wäre der Verlust des paternalen Allels für das Fehlen des Proteins bzw. des Transkriptes denkbar, da bei dem elterlich geprägten Gen nur das väterliche Allel des Gens *PLAGL1* exprimiert wird [79].

Neben dem Gen *PLAGL1* konnte in Brusttumoren auch ein vermehrter Verlust und eine verminderte Expression des Gens *SASH1* (SAM und SH3 domain containing 1) festgestellt werden [73]. Ein Verlust des Markers D6S311, der innerhalb des Gens *SASH1* liegt, soll prognostische Aussagekraft besitzen. Brustkrebspatienten, die einen Verlust eines Allels aufweisen, besitzen eine signifikant kürzere Überlebenszeit im Vergleich zu Patienten ohne Allelverlust. Wie schon beim Gen *PLAGL1* konnten auch bei *SASH1* keine somatischen Mutationen innerhalb des verbleibenden Allels ausfindig gemacht werden, die einen Funktionsverlust des Proteins zur Folge gehabt hätten [73].

Die aus der Literatur und der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten lassen daher darauf schließen, dass die Gene *PLAGL1* und *SASH1* sowohl in Tumoren als auch in disseminierten Tumorzellen häufig von Deletionen betroffen sind. Da diese Deletionen in Zytokeratin-positiven Tumorzellen, die in der CGH keinerlei Aberrationen aufwiesen, mit Hilfe der sensitiveren Allelverlust-Analyse detektiert werden konnten, sind die beiden Tumorsuppressorgene *SASH1* und *PLAGL1* eventuell zu einem frühen Zeitpunkt in der malignen Tumorprogression involviert. Diese in der Literatur schon diskutierten Tumorsuppressorgene können daher zu den potentiellen Genen gezählt werden, die am Prozess der Metastasierung beteiligt sind, so dass den Proteinen nicht nur eine Funktion als Tumor- sondern auch als Metastasen-Suppressor zufallen könnte.

Das transmembrane Glykoprotein HER2 zählt zur Familie der EGF-Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität. Diese interagieren mit Proteinen, die Src (Rous

Sarcoma Virus) Homologie 2 (SH2) und 3 (SH3) Domänen besitzen und in der Lage sind, maßgeblich Einfluss auf die Aktivierung einer Signalkaskade oder ihrer Weiterleitung zu nehmen [84]. Da SASH1 als Adaptorprotein der SLY-Familie (SH3-besitzende Domäne in Lymphozyten exprimiert) eine Src Homologie Domäne 3 besitzt, zählt es zu den Proteinen, die in einen Signalweg involviert sein könnten und damit als interessantes Ziel für neue therapeutische Ansätze gelten [84, 85]. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist das Gen *SASH1* bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Brustkrebserkrankung von Allelverlust betroffen.

Anscheinend liegt somit neben dem Adaptorprotein SASH1 auch der Transkriptionsfaktor PLAGL1, dessen mRNA-Expression mit der Aktivität des EGF-Rezeptor-Signalwegs in Zusammenhang zu stehen scheint [78], innerhalb von (Tyrosinkinase-) Signalwegen. Da Tyrosinkinase-Inhibitoren derzeit klinische Anwendung in der Krebstherapie finden, gewinnen die Proteine der hier identifizierten Gene *SASH1* und *PLAGL1* an Bedeutung. Diese Gene zeigen bereits subchromosomale Veränderungen in Form von Allelverlusten, ehe eine chromosomale Instabilität auftritt. Da die chromosomale Instabilität meist vor dem Stadium der morphologisch nachweisbaren Invasivität der Läsion vorhanden ist [86], scheinen die Allelverluste in den Genen *SASH1* und *PLAGL1* zu einem sehr frühen Zeitpunkt aufzutreten (Abbildung 19) [4]. Zunächst sollten daher in Mammazellen die Signalwege identifiziert werden, an denen die Proteine SASH1 und PLAGL1 beteiligt sind. Sind diese Signalwege dann bekannt, muss untersucht werden, welche Funktion sie im Prozess der Tumorprogression besitzen.

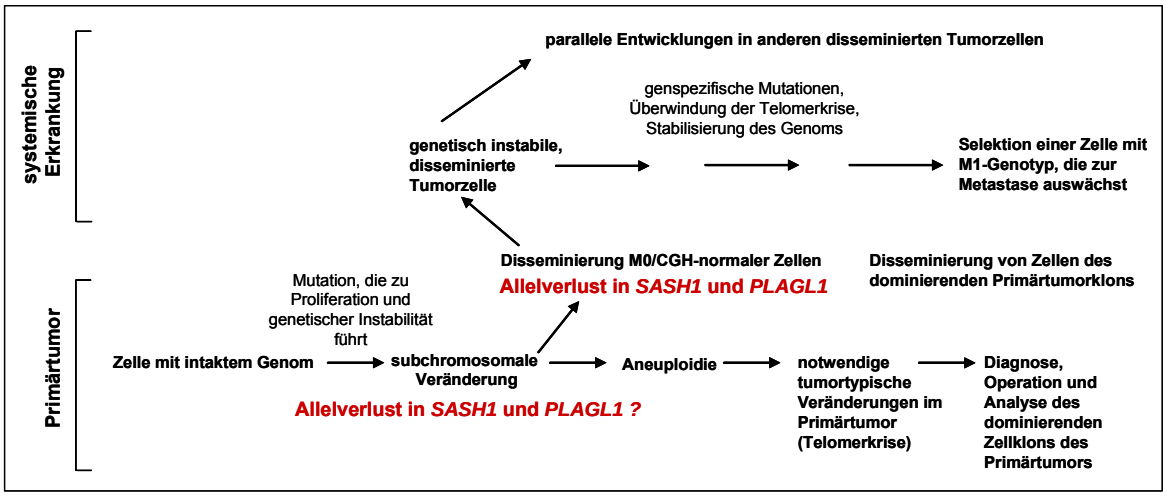


Abbildung 19: Modell der systemischen Krebsprogression (modifiziert nach Klein, 2003)

Das Modell zeigt die genetischen Veränderungen und die Prozesse der Progression maligner Tumorerkrankungen, die ausgehend von einer Zelle mit intaktem Genom zum Tumor und zur Metastase führen. Der Allelverlust in den Genen SASH1 und PLAGL1 wurde in disseminierten M0/CGH-normalen Tumorzellen als frühes Ereignisse in der malignen Progression detektiert, könnte aber bereits als subchromosomale Veränderung am Anfang der Tumorigenese stattfinden. Diese frühe genetische Aberration würden sich somit alle (disseminierenden) Tumorzellen teilen.

6 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom stellt in Deutschland die häufigste bösartige Tumorerkrankung der Frau dar. Trotz optimaler Therapie versterben dennoch etwa 40% der Patientinnen an den Folgen einer Metastasierung des primären Tumors. Dies zeigt die Notwendigkeit, neue Therapien zu entwickeln, welche die Bildung von Metastasen verhindern. Molekulare Zielstrukturen, die aufgrund genetischer Defekte spezifisch bei Vorläuferzellen der Metastasen fehlreguliert sind, sollten selektive therapeutische Interventionen erlauben.

Die Ausgangshypothese dieser Arbeit, dass in disseminierten Tumorzellen von Mammakarzinompatienten ein Verlust des *IGF2*-Rezeptors auf Chromosom 6q eine aberrante Oberflächenexpression von Cathepsinen zur Folge hat, konnte leider nicht bestätigt werden. Bei den Tumorzellen konnte weder eine membranständige Oberflächenexpression von Cathepsin B noch eine häufige Deletion des *IGF2*-Rezeptors gefunden werden. Zwar gelang es, ein Protokoll für eine Antikörperfärbung zur Detektion von membranständigem Cathepsin B erfolgreich zu etablieren, indem durch die Stimulation von Monozyten die induzierte Expression von Cathepsin B auf der Zelloberfläche in der FACS-Analyse gezeigt wurde. Doch eine Cathepsin B-Oberflächenexpression auf Zelllinien solider Tumore konnte damit nicht nachgewiesen werden. Auch der Versuch, bei Tumorzellen aus malignen Pleuraergüssen von Mammakarzinompatienten membranständiges Cathepsin B zu detektieren, blieb erfolglos, so dass auch der Nachweis in vivo nicht erbracht werden konnte.

Bei den Allelverlust-Analysen im Genlokus des IGF2-Rezeptors konnte ein vermehrt auftretender Verlust des *IGF2*-Rezeptorgens nicht gefunden werden. Im Gegensatz dazu wurden zwei Regionen auf Chromosom 6q22-25 identifiziert und charakterisiert, die bei Zytokeratin-positiven, disseminierten Tumorzellen von Mammakarzinompatienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe einen vermehrten Allelverlust aufwiesen. Interessanterweise zeigten diese Tumorzellen keine CGH-Veränderungen, so dass es sich bei den Deletionen um relativ kleine, subchromosomale Veränderungen handelt. Sie befinden sich in Regionen, die auf Chromosom 6q eine maximal mögliche Ausdehnung von 139,5 − 143,8 Mb sowie von 142,2 − 150,1 Mb haben können. Eine dieser Regionen umfasst die Gene

PLAGL1 und *SASH1*, die sich auf Chromosom 6q24 bei 144,3 Mb und 148,7 Mb befinden. Unter allen Genen, die in dieser Region von einem Allelverlust betroffen sein können, gelten bislang nur die Proteine der Gene *PLAGL1* und *SASH1* als mögliche Tumorsuppressoren. Ihr Verlust tritt offenkundig zu einem frühen Zeitpunkt während der malignen Progression auf, so dass er bereits in Tumorzellen gefunden werden kann, die noch keine Veränderung ihres Karyotyps zeigen. Die hier identifizierten Gene *PLAGL1* und *SASH1* sollten daher funktionell untersucht werden, um zu klären, an welchen (Tyrosinkinase-)Signalwegen sie beteiligt sind und ob diese eine Bedeutung bei der frühen systemischen Ausbreitung der Krebserkrankung besitzen.

7 Literaturverzeichnis

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer.* Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
2. Strausberg, R.L., et al., *Oncogenomics and the development of new cancer therapies.* Nature, 2004. **429**(6990): p. 469-74.
3. Braun, S., et al., *Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer.* N Engl J Med, 2000. **342**(8): p. 525-33.
4. Klein, C.A., *The systemic progression of human cancer: a focus on the individual disseminated cancer cell--the unit of selection.* Adv Cancer Res, 2003. **89**: p. 35-67.
5. Gerber, B., et al., *Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors.* J Clin Oncol, 2001. **19**(4): p. 960-71.
6. Gebauer, G., et al., *Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up.* J Clin Oncol, 2001. **19**(16): p. 3669-74.
7. Wiedswang, G., et al., *Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer.* J Clin Oncol, 2003. **21**(18): p. 3469-78.
8. Schmidt-Kittler, O., et al., *From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7737-42.
9. Klein, C.A., *The biology and analysis of single disseminated tumour cells.* Trends Cell Biol, 2000. **10**(11): p. 489-93.
10. Blume-Jensen, P. and T. Hunter, *Oncogenic kinase signalling.* Nature, 2001. **411**(6835): p. 355-65.
11. Arteaga, C.L. and J. Baselga, *Tyrosine kinase inhibitors: why does the current process of clinical development not apply to them?* Cancer Cell, 2004. **5**(6): p. 525-31.
12. Rowley, J.D., *Chromosome translocations: dangerous liaisons revisited.* Nat Rev Cancer, 2001. **1**(3): p. 245-50.
13. Rowley, J.D., *Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining.* Nature, 1973. **243**(5405): p. 290-3.
14. Baselga, J., *Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave.* Science, 2006. **312**(5777): p. 1175-8.
15. Buchdunger, E., et al., *Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors.* J Pharmacol Exp Ther, 2000. **295**(1): p. 139-45.
16. Shawver, L.K., D. Slamon, and A. Ullrich, *Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy.* Cancer Cell, 2002. **1**(2): p. 117-23.
17. Choudhury, A., et al., *Small interfering RNA (siRNA) inhibits the expression of the Her2/neu gene, upregulates HLA class I and induces apoptosis of Her2/neu positive tumor cell lines.* Int J Cancer, 2004. **108**(1): p. 71-7.

18. Slamon, D.J., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.* Science, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
19. Chazin, V.R., et al., *Transformation mediated by the human HER-2 gene independent of the epidermal growth factor receptor.* Oncogene, 1992. **7**(9): p. 1859-66.
20. Yarden, Y., *Biology of HER2 and its importance in breast cancer.* Oncology, 2001. **61 Suppl 2**: p. 1-13.
21. Baselga, J., et al., *Mechanism of action of trastuzumab and scientific update.* Semin Oncol, 2001. **28**(5 Suppl 16): p. 4-11.
22. Sliwkowski, M.X., et al., *Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin).* Semin Oncol, 1999. **26**(4 Suppl 12): p. 60-70.
23. Carter, P., et al., *Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(10): p. 4285-9.
24. Cooley, S., et al., *Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu.* Exp Hematol, 1999. **27**(10): p. 1533-41.
25. Lewis, G.D., et al., *Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies.* Cancer Immunol Immunother, 1993. **37**(4): p. 255-63.
26. Piccart-Gebhart, M.J., et al., *Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer.* N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1659-72.
27. Romond, E.H., et al., *Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer.* N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1673-84.
28. Schardt, J.A., et al., *Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer.* Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 227-39.
29. Srikantan, V., et al., *Allelic loss on chromosome 6Q in primary prostate cancer.* Int J Cancer, 1999. **84**(3): p. 331-5.
30. Goeze, A., et al., *Chromosomal imbalances of primary and metastatic lung adenocarcinomas.* J Pathol, 2002. **196**(1): p. 8-16.
31. Rodriguez, C., et al., *At least five regions of imbalance on 6q in breast tumors, combining losses and gains.* Genes Chromosomes Cancer, 2000. **27**(1): p. 76-84.
32. Sameni, M., et al., *Cathepsin B and D are Localized at the Surface of Human Breast Cancer Cells.* Pathol Oncol Res, 1995. **1**(1): p. 43-53.
33. Gutman, H.R., *On the proteolytic enzymes of aniamal tissuesVIII. An intracellular enzyme related to chymotrypsin*, in *J. Biol. Chem.* 1948. p. 851-858.
34. Turk, V., B. Turk, and D. Turk, *Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities.* Embo J, 2001. **20**(17): p. 4629-33.
35. Joyce, J.A., et al., *Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis.* Cancer Cell, 2004. **5**(5): p. 443-53.
36. Yasothornsrikul, S., et al., *Cathepsin L in secretory vesicles functions as a prohormone-processing enzyme for production of the enkephalin peptide neurotransmitter.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(16): p. 9590-5.

37. Inaoka, T., et al., *Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone.* Biochem Biophys Res Commun, 1995. **206**(1): p. 89-96.
38. Zavasnik-Bergant, T. and B. Turk, *Cysteine cathepsins in the immune response.* Tissue Antigens, 2006. **67**(5): p. 349-55.
39. Koblinski, J.E., M. Ahram, and B.F. Sloane, *Unraveling the role of proteases in cancer.* Clin Chim Acta, 2000. **291**(2): p. 113-35.
40. Podgorski, I. and B.F. Sloane, *Cathepsin B and its role(s) in cancer progression.* Biochem Soc Symp, 2003(70): p. 263-76.
41. Yan, S. and B.F. Sloane, *Molecular regulation of human cathepsin B: implication in pathologies.* Biol Chem, 2003. **384**(6): p. 845-54.
42. Roshy, S., B.F. Sloane, and K. Moin, *Pericellular cathepsin B and malignant progression.* Cancer Metastasis Rev, 2003. **22**(2-3): p. 271-86.
43. Mai, J., et al., *Human procathepsin B interacts with the annexin II tetramer on the surface of tumor cells.* J Biol Chem, 2000. **275**(17): p. 12806-12.
44. Lodish, H., *Molekulare Zellbiologie*. 2001, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
45. Diaz, E. and S.R. Pfeffer, *TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking.* Cell, 1998. **93**(3): p. 433-43.
46. Pohlmann, R., M.W. Boeker, and K. von Figura, *The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins.* J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 27311-8.
47. Kornfeld, S., *Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors.* Annu Rev Biochem, 1992. **61**: p. 307-30.
48. Oka, Y., L.M. Rozek, and M.P. Czech, *Direct demonstration of rapid insulin-like growth factor II Receptor internalization and recycling in rat adipocytes. Insulin stimulates 125I-insulin-like growth factor II degradation by modulating the IGF-II receptor recycling process.* J Biol Chem, 1985. **260**(16): p. 9435-42.
49. Dennis, P.A. and D.B. Rifkin, *Cellular activation of latent transforming growth factor beta requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(2): p. 580-4.
50. Killian, J.K. and R.L. Jirtle, *Genomic structure of the human M6P/IGF2 receptor.* Mamm Genome, 1999. **10**(1): p. 74-7.
51. Hankins, G.R., et al., *M6P/IGF2 receptor: a candidate breast tumor suppressor gene.* Oncogene, 1996. **12**(9): p. 2003-9.
52. De Souza, A.T., et al., *M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity.* Nat Genet, 1995. **11**(4): p. 447-9.
53. Kong, F.M., et al., *M6P/IGF2R is mutated in squamous cell carcinoma of the lung.* Oncogene, 2000. **19**(12): p. 1572-8.
54. Jamieson, T.A., et al., *M6P/IGF2R loss of heterozygosity in head and neck cancer associated with poor patient prognosis.* BMC Cancer, 2003. **3**: p. 4.
55. Souza, R.F., et al., *Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours.* Nat Genet, 1996. **14**(3): p. 255-7.
56. Jedeszko, C. and B.F. Sloane, *Cysteine cathepsins in human cancer.* Biol Chem, 2004. **385**(11): p. 1017-27.
57. Berquin, I.M., et al., *Differentiating agents regulate cathepsin B gene expression in HL-60 cells.* J Leukoc Biol, 1999. **66**(4): p. 609-16.

58. Reddy, V.Y., Q.Y. Zhang, and S.J. Weiss, *Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(9): p. 3849-53.
59. Sarin, A., et al., *Target cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases.* Immunity, 1997. **6**(2): p. 209-15.
60. Balaji, K.N., et al., *Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation.* J Exp Med, 2002. **196**(4): p. 493-503.
61. Schmidt-Kittler, O., *Von einzelnen Zellen zur Metastase: Genomische Analyse der minimalen Resterkrankung des Mammakarzinoms*, in *Fakultät für Biologie*. 2003, Ludwig-Maximilians-Universität: München.
62. Pradines-Figueres, A. and C.R. Raetz, *Processing and secretion of tumor necrosis factor alpha in endotoxin-treated Mono Mac 6 cells are dependent on phorbol myristate acetate.* J Biol Chem, 1992. **267**(32): p. 23261-8.
63. Schwende, H., et al., *Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3.* J Leukoc Biol, 1996. **59**(4): p. 555-61.
64. Werz, O., et al., *Phorbol ester up-regulates capacities for nuclear translocation and phosphorylation of 5-lipoxygenase in Mono Mac 6 cells and human polymorphonuclear leukocytes.* Blood, 2001. **97**(8): p. 2487-95.
65. Tibiletti, M.G., et al., *A large 6q deletion is a common cytogenetic alteration in fibroadenomas, pre-malignant lesions, and carcinomas of the breast.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(4): p. 1422-31.
66. Brix, K., P. Lemansky, and V. Herzog, *Evidence for extracellularly acting cathepsins mediating thyroid hormone liberation in thyroid epithelial cells.* Endocrinology, 1996. **137**(5): p. 1963-74.
67. Mignatti, P., E. Robbins, and D.B. Rifkin, *Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade.* Cell, 1986. **47**(4): p. 487-98.
68. Kang, J.X., et al., *Retinoic acid alters the intracellular trafficking of the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor and lysosomal enzymes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13687-91.
69. Noviello, C., F. Courjal, and C. Theillet, *Loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 6 in breast cancer: possibly four regions of deletion.* Clin Cancer Res, 1996. **2**(9): p. 1601-6.
70. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer.* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(4): p. 259-69.
71. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer.* Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7065-70.
72. Abdollahi, A., et al., *LOT1 (PLAGL1/ZAC1), the candidate tumor suppressor gene at chromosome 6q24-25, is epigenetically regulated in cancer.* J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 6041-9.
73. Zeller, C., et al., *SASH1: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer.* Oncogene, 2003. **22**(19): p. 2972-83.
74. Kamikihara, T., et al., *Epigenetic silencing of the imprinted gene ZAC by DNA methylation is an early event in the progression of human ovarian cancer.* Int J Cancer, 2005. **115**(5): p. 690-700.
75. Huang, S.M., A.H. Schonthal, and M.R. Stallcup, *Enhancement of p53-dependent gene activation by the transcriptional coactivator Zac1.* Oncogene, 2001. **20**(17): p. 2134-43.

76. Rozenfeld-Granot, G., et al., *A positive feedback mechanism in the transcriptional activation of Apaf-1 by p53 and the coactivator Zac-1.* Oncogene, 2002. **21**(10): p. 1469-76.
77. Klein, C.A., et al., *Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer.* Lancet, 2002. **360**(9334): p. 683-9.
78. Abdollahi, A., R. Bao, and T.C. Hamilton, *LOT1 is a growth suppressor gene down-regulated by the epidermal growth factor receptor ligands and encodes a nuclear zinc-finger protein.* Oncogene, 1999. **18**(47): p. 6477-87.
79. Abdollahi, A., et al., *Identification of a zinc-finger gene at 6q25: a chromosomal region implicated in development of many solid tumors.* Oncogene, 1997. **14**(16): p. 1973-9.
80. Abdollahi, A., et al., *Identification of a gene containing zinc-finger motifs based on lost expression in malignantly transformed rat ovarian surface epithelial cells.* Cancer Res, 1997. **57**(10): p. 2029-34.
81. Abdollahi, A., et al., *Identification of epidermal growth factor-responsive genes in normal rat ovarian surface epithelial cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **307**(1): p. 188-97.
82. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(4): p. 820-3.
83. Paige, A.J., *Redefining tumour suppressor genes: exceptions to the two-hit hypothesis.* Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(10): p. 2147-63.
84. Smithgall, T.E., *SH2 and SH3 domains: potential targets for anti-cancer drug design.* J Pharmacol Toxicol Methods, 1995. **34**(3): p. 125-32.
85. Beer, S., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel SH3 protein (SLY) preferentially expressed in lymphoid cells.* Biochim Biophys Acta, 2001. **1520**(1): p. 89-93.
86. Chin, K., et al., *In situ analyses of genome instability in breast cancer.* Nat Genet, 2004. **36**(9): p. 984-8.

8 Lebenslauf

Andrea Eberhardt

Römerstrasse 23, 80801 München

Tel: +49 89 / 38887463

Persönliche Daten

Geburtstag:	23.01.1974
Geburtsort:	Straubing
Familienstand:	ledig

Schulische Ausbildung

1980 – 1985	Volksschule Mitterfels
1985 – 1994	Gymnasium der Ursulinen, Straubing, Allgemeine Hochschulreife

Universitäre Ausbildung

1994 – 1995	Studium der Geographie (Diplom), Universität Regensburg
1995 – 2001	Studium der Biologie (Diplom), Universität Regensburg mit dem Hauptfach Zoologie und den Nebenfächern Genetik und Botanik Thema der Diplomarbeit: „Reproduktive Taktiken in der Gattung *Cardiocondyla* (Myrmicinae)“
2001	Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit unter Anleitung von PD. Dr. med Christoph A. Klein am Institut für Immunologie, LMU München

Zusätzliche Qualifikationen

2002	Zertifikat des TIZ-BIFO für die Leitung und Durchführung von Tierversuchen (FELASA Kategorie B und C)

Posterpräsentationen

Christoph A. Klein, Andrea Eberhardt, Claudia Hartmann, Susanne Steinhaus, Julie Waldispühl. (2002, 2003, 2004, 2005, 2006). Struktur und Funktion der Genome einzelner mikrometastatischer Tumorzellen: Ein neuer Zugang zur klonalen Evolution von Zellpopulationen in menschlichen Karzinomen. *Jahrestagung des BMBF-Wettbewerbs „BioFuture“*, **Berlin**

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Christoph A. Klein, dem Betreuer meiner Promotionsarbeit, ganz herzlich danken. Er hat es mir ermöglicht, am Institut für Immunologie ein hochinteressantes Projekt zu bearbeiten. Seine Unterstützung und das ihm eigene motivierende Interesse am Fortgang meines Projekts, aber auch die von ihm gewährten wissenschaftlichen Freiräume für eigenständiges Arbeiten trugen ganz wesentlich zum Gelingen dieser Doktorarbeit bei.

Großer Dank gebührt zudem Herrn Prof. Dr. med. Thomas Cremer, der sich bereit erklärte, die Promotion als Erstgutachter vor der biologischen Fakultät zu vertreten.

Ebenso möchte ich mich bei einer fantastischen Arbeitsgruppe für das außergewöhnlich gute Arbeitsklima bedanken, zu dem jedes Mitglied auf seine individuelle Weise beigetragen hat. Viele von ihnen wurden mir zu lieben Freunden, die ich nicht mehr missen möchte. Durch ihre Unterstützung und ihr Interesse an meinem Projekt ließen sich auch die erfolglosen Labortage leichter ertragen und Erfolge noch mehr genießen. Besonderer Dank gilt dabei dem TA-Team Isabell Blochberger, Barbara Lindner, Kerstin Möhr und Simone Pentz, die mich besonders zum Ende meiner Promotion hin mit ganz hervorragender Laborarbeit unterstützten. Für Laborprobleme jeglicher Art konnte ich dankenswerter Weise stets auf die Hilfe von Mani Meyer zurückgreifen. Sehr dankbar bin ich Bernhard Polzer, Claudia Hartmann und Christian Vay für die schnellen und hilfreichen Korrekturen der Dissertation und ihre aufmunternden Worte. Bei Melanie Kimm, Nicole Wendler und ganz besonders bei Julie Waldispühl möchte ich mich für die vielen, langen, interessanten, häufig auch wissenschaftlichen Gespräche bedanken. In meinen Dank einschließen möchte ich außerdem noch die ehemaligen Arbeitskollegen Thomas Blankenstein, Oleg Schmidt-Kittler und Nikolas Stoecklein, von deren Kompetenz ich im Zuge meiner Arbeit stets profitieren konnte. Sie trugen immer wieder zu Heiterkeit im Labor und auch außerhalb bei.

Ein großes Dankeschön geht an meine Freunde, insbesondere an die „Regensburger Mädels“, die meine Promotion teilweise trotz ihrer eigenen Doktorarbeit immer mit großem Interesse verfolgt haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein allergrößter Dank aber richtet sich an meine Eltern, die mir durch ihre uneingeschränkte Unterstützung die Möglichkeit gaben, meinen Interessen nachzugehen und meine Ziele zu erreichen. Von der Familie erfuhr ich den nötigen Rückhalt, konnte bei ihr aber auch Kraft schöpfen, indem sie für die gelegentlich notwendige Ablenkung sorgten. Dabei halfen mir meine Lieben zuhause, nie den Blick für das Wesentliche aus den Augen zu verlieren.