

Forschungszentrum Karlsruhe

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte FZKA 6865

Differentielle Immunisierungstechniken als eine Methode um neue Antigene zu entdecken, die mit Tumorprogression und Metastasierung assoziiert sind

Jörg Mengwasser

Institut für Toxikologie und Genetik

Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2003

Impressum der Print-Ausgabe:

**Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

**Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)**

ISSN 0947-8620

Differentielle Immunisierungstechniken als eine Methode um neue Antigene zu entdecken, die mit Tumorprogression und Metastasierung assoziiert sind.

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften
der
Universität Karlsruhe
genehmigte
DISSERTATION

von

Jörg Mengwasser

aus Erkelenz

2002

Tag der mündlichen Prüfung: 08.05.2002
Referent: PD Dr. Jonathan Sleeman
Korreferent: Prof. Dr. Doris Wedlich

Zusammenfassung

Das Verständnis der Prozesse der Tumorprogression und Metastasierung erfordert die Identifizierung von spezifischen Molekülen, die uns neues Wissen über diese Prozesse vermitteln können. Ich habe in der vorliegenden Doktorarbeit gezeigt, dass die subtraktive Immunisierung eine der Methoden der Wahl ist und bleibt, um solche spezifischen Moleküle zu entdecken und zu charakterisieren. Besonderes Augenmerk wird hierbei auf die Veränderungen auf der Zelloberfläche gelegt, die für die Tumorprogression und Metastasierung von entscheidender Wichtigkeit sind.

Ein schon identifiziertes Molekül aus einer früheren subtraktiven Immunisierung wurde von mir weiter charakterisiert, um eine Vorstellung von der Funktion dieses Antigens im normalen Gewebe, als auch auf der Tumorzelle zu erhalten. Das M-N#1 Antigen scheint eine wichtige Rolle in der Progression von Tumoren zu spielen und es hat eine Funktion im involutierenden Brustgewebe, wobei die weitere Aufklärung dieser Funktion sicherlich zum Verständnis im Tumor beiträgt.

Bei der von mir durchgeführten subtraktiven Immunisierung konnte ich spezifische Antikörper isolieren, die Antigene auf der hochmetastasierenden Zelllinie AT6.1 erkennen. Diese Antigene scheinen ebenfalls eine Funktion in der Tumorprogression zu spielen, da die Antikörper in Versuchen das Tumorzellwachstum deutlich reduzieren konnten. Die Identifizierung und Charakterisierung dieser Antigene wird uns weitere Hinweise für die erforderlichen Veränderungen von Tumorzellen auf ihrer Zelloberfläche geben.

Es besteht immer noch ein eklatanter Mangel an Molekülen, die im Serum nachgewiesen werden können und die Diagnose von Krebs in frühen Stadien ermöglichen, aber auch den Verlauf einer Therapie überwachen können. In der von uns entwickelten Serum Immunisierung wurde von mir versucht, dem Ansatz, solche Moleküle zu identifizieren, gerecht zu werden. Ich konnte acht Antikörper isolieren, die Moleküle im Serum erkennen, die vom Tumor sezerniert oder abgespalten werden. Einer dieser Antikörper erschien als besonders interessant, da das von ihm gebundene Antigen auf vielen humanen Tumorzelllinien exprimiert wird.

Es gelang mir, die Antigene zu identifizieren, die sich als Prohibitin und BAP37 herausstellten. Über die Funktionen beider Proteine ist noch nicht viel bekannt. Als Komplex wird ihnen eine Rolle in der Mitochondrienmembran als Chaperon zur Stabilisierung mitochondrialer Proteine zugesprochen. Prohibitin soll im Nukleus mit RB interagieren und somit die Funktion von E2F modulieren. BAP37 soll unter dem Namen REA (repressor of estrogen activity) das Binden von Koaktivatoren an den Östrogenrezeptor kompetitiv inhibieren. Bei der Seneszenz scheinen beide Proteine eine wichtige Rolle zu haben. Auch sind beide Proteine anscheinend in B-Zellen an den IGM Rezeptor gebunden, welche Funktion sie dort haben, ist nicht bekannt. Obwohl beide Proteine im Nukleus und im Zytoplasma vorkommen, bindet mein isolierter Antikörper in Immunfluoreszenzstudien nur im Zytoplasma, was vielleicht auf eine veränderte Konformation schließen lässt, die mit einer veränderten Funktion einhergehen könnte. Ich konnte als erster für diese Proteine eine Zelloberflächenexpression oder eine Sezernierung/Abspaltung zeigen.

Es konnte von mir gezeigt werden, dass die subtraktive Immunisierung eine funktionelle Methode darstellt, spezifische Moleküle zu entdecken, die mit Tumorprogression und Metastasierung assoziiert sind. Die von uns entwickelte Serum-Immunisierung konnte etabliert werden und erscheint als sehr nützlich, neue Marker zu identifizieren, die eine frühe Diagnose und das Überwachen eines Therapieverlaufs ermöglichen könnten.

Abstract

To understand the processes of tumour progression and metastasis one has to identify specific molecules which can impart to us new knowledge of these processes. In this doctoral thesis I have shown that the subtractive immunization is and remains one of the major methods for discovering and characterizing such specific molecules. Special attention is directed here to the changes on the cell surface, which is highly relevant for tumour progression and metastasis.

I have continued characterizing a molecule that has already been identified in a previous subtractive immunization in order to get an idea of how this antigen works in normal tissue as well as in tumour cells. The M-N#1 antigen seems to be very important for the progression of tumours and it plays a role in involuting breast tissue. The further elucidation of this function will certainly contribute to the comprehension of tumours.

In the subtractive immunization I performed, I was able to isolate specific antibodies which recognize antigens on the highly metastasizing cell line AT6.1. These antigens also seem to play a role in tumour growth since the antibodies could clearly reduce tumour growth in experiments. Identifying and characterizing these antigens will give us further indications of necessary changes of the cell surface of tumour cells.

There is still a blatant lack of molecules that can be identified in serum, which make possible a diagnosis of cancer at an early stage as well as to control the course of therapy. By the novel approach of serum immunization I tried to identify such molecules. I could isolate eight antibodies which in the serum discern molecules secreted or shedded by the tumour. One of these antibodies seemed to be particularly interesting since the antigen bound by it is expressed in many human tumour cell lines.

I succeeded in identifying the antigens which turned out to be Prohibitin and BAP37. We do not yet know much about the functions of these two proteins. As a whole they are assigned a role in the mitochondria membrane as a chaperon to stabilize mitochondrial proteins. Prohibitin is supposed to interact with RB in the nucleus and thus to modulate the function of E2F. BAP37 under the name of REA (repressor of estrogen activity) is supposed to competitively inhibit the ligation of co-activators to the estrogen receptor. Both proteins seem to play an important role in senescence. Also both proteins are apparently ligated to the IgM receptor in B-cells. Their function is unknown. Even though both proteins are found in the nucleus and in the cytoplasm, the antibody I isolated binds in immunofluorescent studies to prohibitin/BAP37 only in the cytoplasm. This may indicate a modified conformation possibly associated with a modified function. I am the first who could show a cell surface expression or a secretion for these proteins.

I was able to show that subtractive immunization is a functional method for discovering specific molecules associated with tumour progression and metastasis. I successfully developed and established the novel technique of serum immunization. It seems to be very useful for identifying new tumour markers in the blood which could make possible early diagnosis and control of the course of therapy.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Vorwort	VII
Motivation für die Erstellung dieser Dissertation	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Krebs.....	1
1.1.1 Heutiges Verständnis der Tumorigenese.....	4
1.2 Metastasierung von Krebs	5
1.2.1 Zellabkopplung und Metastasierung.....	6
1.2.2 Zellmembranaufbau und Metastasierung	9
1.3 Die morphologische Dokumentation von Tumorprogression, Invasion und Metastasen: „Staging“	13
1.4 Heutige Krebserkennung	15
1.4.1 Makroskopische Methoden.....	15
1.4.2 Minimalinvasive Methoden	17
1.4.3 Mikroskopische Methoden	17
1.4.4 Molekularbiologische Methoden	18
1.5 Tumormarker	19
1.5.1 Was versteht man unter Tumormarkern ?	19
1.5.2 Welche Serum-Tumormarker sind bekannt und werden in der Klinik benutzt ?.....	20
1.5.3 Tumormarker auf Gen- oder RNS-Ebene	22
1.5.4 Histologische Marker	23
1.5.5 Marker für die Metastasierung von Krebs	24
1.6 Differenzielle Methoden	26
1.6.1 SSH	27
1.6.2 „Differential Display“	28
1.6.3 „Microarray“ – Analyse.....	28
1.6.4 Oberflächen-Epitop Maskierung	30
1.6.5 Subtraktive Immunisierung	30
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit.....	32
2 Material	33
2.1 Bezugsquellen der Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	33
2.2 Geräte	36
2.3 Radiochemikalien.....	36
2.4 Antikörper.....	36
2.5 Plasmide	38
2.6 Oligonukleotide	38
2.7 Pro- und eukaryotische Zelllinien	39
3 Methoden	41
3.1 Zellkulturmethoden	41
3.1.1 Passagieren von Zellen	41
3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	42
3.1.3 Transfektion von COS7 Zellen durch Elektroporation.....	42
3.2 DNA-Methoden	43
3.2.1 Analyse von Nukleinsäuren	43

3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	44
3.2.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	44
3.2.4	Plasmid DNA Mini-Präparation	45
3.2.5	Plasmid-DNA Maxi-Präparation	45
3.2.6	PCR – Ansätze	46
3.3	Klonierungstechniken.....	47
3.3.1	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	47
3.3.2	Dephosphorylierung von DNA	47
3.3.3	Ligation von DNA-Fragmenten	48
3.3.4	TOPO-Klonierung.....	48
3.3.5	Transformation durch Elektroporation:.....	48
3.4	RNA Methoden	49
3.4.1	Präparation von gesamt-RNA aus Zellen und Gewebe	49
3.4.2	Präparation von PolyA+ -RNA aus Zellen.....	49
3.4.3	RNA – Agarose – Gelelektrophorese.....	50
3.4.4	Northern Blot: Transfer von RNA auf Nylonmembran.....	50
3.4.5	Northern-Hybridisierung.....	51
3.4.6	Herstellung von cDNA aus PolyA+ -RNA	51
3.4.7	Herstellung einer AT6.1 cDNA-Bibliothek.....	52
3.5	Proteinmethoden.....	53
3.5.1	Präparation von Zellen und Gewebe für Proteingele	53
3.5.2	Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)	53
3.5.3	Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE.....	54
3.5.4	Silberfärbung von Proteingelen	54
3.5.5	Herstellung von F(ab') ₂ -Fragmenten.....	55
3.5.6	Analyse von Proteinen durch Transfer auf Membranen und Detektion durch spezifische Antikörper (<i>Western blot</i>)	56
3.5.7	Radioaktive Immunpräzipitation von Proteinen (hot-IP).....	57
3.5.8	„Kalte“ Immunpräzipitation von Proteinen (IP)	57
3.5.9	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	58
3.5.10	Zell-ELISA	58
3.5.11	„Sandwich“-ELISA	59
3.5.12	Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen	59
3.5.13	Immunfluoreszenzfärbung für die FACS – Analyse	60
3.5.14	Immunhistochemie.....	60
3.5.15	Apoptosefärbung von Gewebeschnitten	61
3.5.16	Organfärbung von ganzen Brustgeweben mit Karmin	62
3.5.17	Magnetische Zellsortierung (MACS)	62
3.6	Tiermethoden.....	63
3.6.1	Hormoninjektionen in Rattenbrustgewebe	63
3.6.2	Tumorstadium und Metastasierungsversuche in Ratten	63
3.6.3	Tumorzell- und Antikörperinjektion in Ratten	64
3.6.4	Tumorzellinjektion in Mäusen	64
3.6.5	Immunisierung von Mäusen zur Herstellung monoklonaler Antikörper ...	65
3.6.6	Subtraktive Immunisierung in Mäusen.....	65
3.7	Hybridoma-Bildung zur Herstellung monoklonaler Antikörper.....	66
3.7.1	Vorbereitung	66
3.7.2	Hybridoma-Bildung.....	66
3.7.3	Testen der Klone	67
3.8	Lipidextraktion.....	67
4	Ergebnisse.....	68

4.1	M-N#1 und Galectin-3: Analyse eines schon früher identifizierten Antigens	68
4.1.1	Galectin-3 Expression im involutierenden Brustgewebe	70
4.1.2	Galectin-3 Expression und apoptotische Zellen im involutierenden Brustgewebe	72
4.1.3	Koexpression von Galectin-3 und M-N#1 und apoptotischen Zellen im Rattenbrustgewebe	74
4.1.4	Statistische Auswertung der Expression von Galectin-3, M-N#1 und apoptotischer Zellen im involutierenden Brustgewebe	75
4.1.5	Regulation der Galectin-3 Expression durch systemische Hormone	76
4.1.6	Analyse der Galectin-3 Expression in hormonbehandelten Brustgeweben durch „Northern-Blot“ Hybridisierung	78
4.1.7	Analyse der Galectin-3 Proteinmengen in involutierenden Brustgeweben mittels „Western Blot“	79
4.1.8	Analyse der Brustgewebe von Galectin-3 „Knockout“-Mäusen im Vergleich zu normalen Mäusen	80
4.1.9	Galectin-3 Bindung an MT450-Zellen: Kann der M-N#1 Antikörper diese Bindung blockieren ?	82
4.2	Diskussion der Galectin-3 Ergebnisse	85
4.3	Subtraktive Immunisierung	89
4.3.1	Subtraktive Immunisierung mit Zelllinien des BSP73 Rattenpankreas-Zellsystems	90
4.3.2	Subtraktive Immunisierung mit Zelllinien des Dunning Rattenprostatakarzinom-Systems	91
4.3.3	Tumorzellinjektion und Antikörperbehandlung in Copenhagen-Ratten	93
4.3.4	Expression der Antigene auf anderen Tumorzellen	96
4.3.5	Expression der Antigene im normalen Rattengewebe	97
4.3.6	Identifikation der Antigene: Immunpräzipitation (IP)	99
4.3.7	Identifikation der Antigene über eine AT6.1 cDNS-Bibliothek	100
4.3.8	Untersuchung zur Kohlenhydrat- oder Lipidnatur des Antigens	102
4.4	Diskussion der subtraktiven Immunisierungen	103
4.4.1	Die subtraktive Immunisierung mit dem BSP73 Rattenpankreaskarzinom-System	103
4.4.2	Die subtraktive Immunisierung mit dem Dunning Rattenprostatakarzinom-System	104
4.5	Serum-Immunisierung um neue Serum-Tumormarker zu entdecken	109
4.5.1	Erläuterung der Methode	109
4.5.2	Etablierung der Immunisierungsmethode	110
4.5.3	Testen der Antikörper	110
4.5.4	Identifizierung des Antigens, dass vom 1C1-Antikörper gebunden wird, mittels IP und Proteinanalyse	112
4.5.5	Prohibitin und BAP37 – eine Einleitung	114
4.5.6	Überprüfung des Immunisierungsprinzips: Expression des Antigens im Serum tumortragender Nacktmäuse	116
4.5.7	Analyse der Expression von Prohibitin in Kolonkarzinom-Zelllinien mittels RT-PCR	118
4.5.8	Analyse der Expression von BAP37 in Kolonkarzinom-Zelllinien mittels RT-PCR	119
4.5.9	Analyse der Expression von Prohibitin in menschlichem Normal- und Tumorgewebe des Kolons mittels RT-PCR	120
4.5.10	Antigenexpression auf verschiedenen humanen Tumorzelllinien	121

4.5.11	Analyse der Proteinmenge auf der Zelloberfläche der Kolonkarzinomzellen durch IP	123
4.5.12	Analyse der Lokalisierung des Antigens in Zellen mit dem 1C1-Antikörper und einem kommerziell erworbenen Prohibitin-Antikörper.....	124
4.5.13	Analyse der Lokalisierung des Antigens durch Fraktionierung von Zytoplasma und Nukleus	126
4.5.14	Immunhistochemische Analyse der Expression von Prohibitin/Bap37 in verschiedenen humanen Tumorgeweben.....	127
4.6	Diskussion der Ergebnisse der Serum-Immunisierung	130
5	Referenzliste.....	136

1 Einleitung

1.1 Krebs

Krebs: (engl.) cancer; allg. Bezeichnung für eine bösartige Neubildung (Tumor); i.e.S. das Karzinom (maligner epithelialer Tumor), i.w.S. das Sarkom (maligner mesenchymaler Tumor)

Karz-: auch Karzino-, Carz-, Carzino-; Wortteil mit der Bedeutung Krebs; von griechisch *καρκινοζ*

(beides aus: Pschyrembel, klinisches Wörterbuch, 257. Auflage, Berlin 1994)

Die Begriffe *karkinos* und *karkinoma* wurden zum ersten Male im fünften Jahrhundert vor Christus in der Schule von Hippokrates benutzt. *Karkinos* wurde als Begriff für nicht heilende Schwellungen und eitrige Gebilde und ebenso für Hämorrhoiden benutzt. *Karkinoma* hingegen, war für nicht heilenden Krebs reserviert (die aufgrund der historischen Beschreibungen zumeist wirklich Krebserkrankungen waren) (Leonard Weiss, 2000). Heutzutage wird der Begriff „Karzinom“ für Krebswucherungen von Epithelzellen benutzt.

Krebs ist gerade heute in unserer modernen Welt eine der häufigsten Todesursachen. In Deutschland starben 1997 etwa 210.000 Menschen an den verschiedenen Krebsarten, davon etwa 50% der Männer an Lungen- (26,4%), Dickdarm- / Mastdarm- (12,7%) und Prostatakrebs (10,6%) und etwa 40% der Frauen an Brustdrüsen- (17,9), Dickdarm- / Mastdarm- (15,7%) und Lungenkrebs (8,6%). Die Zahl der Neuerkrankungen im Jahr 1997 wird auf insgesamt über 338.000 geschätzt.

(alles aus: Krebs in Deutschland, 1999)

Prozentuale Anteile der häufigsten Krebsformen an der Gesamtzahl 1997 in Deutschland

Neuerkrankungsfälle (geschätzt)

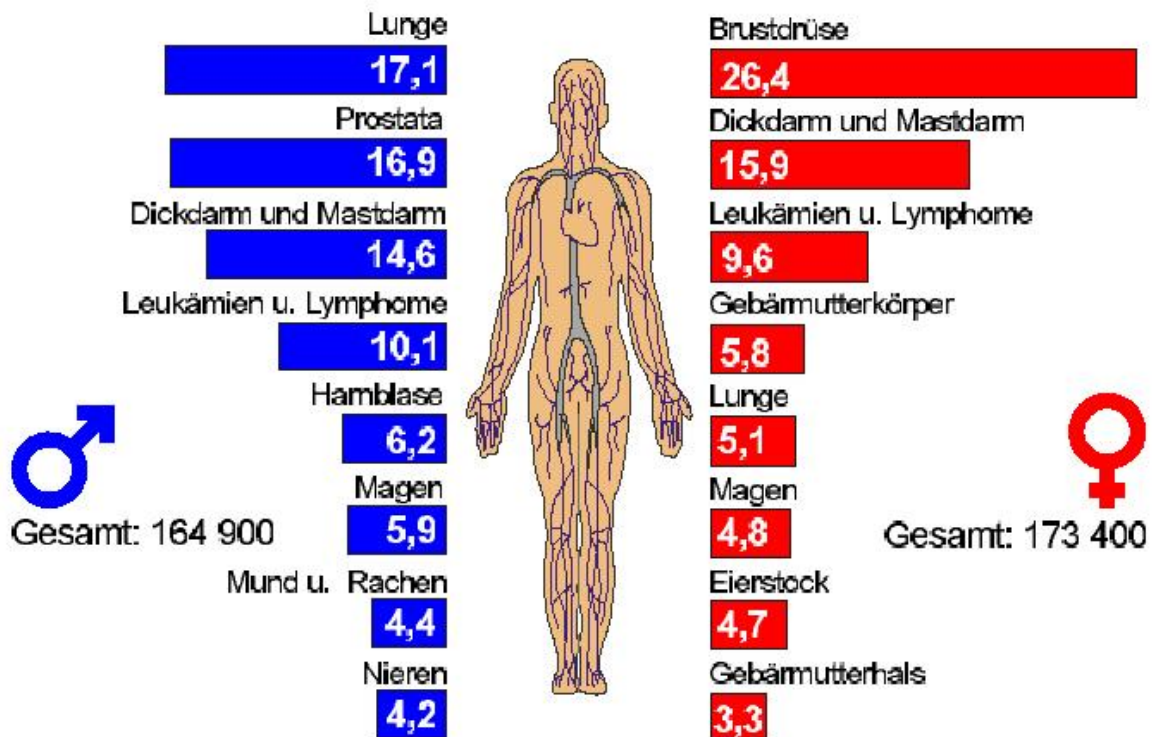


Abb.1: Krebs-Neuerkrankungen im Jahr 1997, aus: Krebs in Deutschland, 1999

Seit Jahrhunderten wird über die Entstehung und die Progression von Krebserkrankungen geforscht. Doch erst mit Hilfe der modernen Molekularbiologie konnten einige entscheidende Fragen auf zellulärer und genetischer Ebene geklärt werden.

Erst nach der Entschlüsselung des genetischen Codes durch Watson und Crick im Jahr 1953 wurde der medizinischen Forschung ein Werkzeug gegeben, das durch Anwendung entsprechender Methoden erkennen lies, dass Krebsentstehung abhängig ist von genetischen Veränderungen in der Zelle (Überblick von Lengauer et al., 1998, Kinzler et al., 1998).

Diese Veränderungen, die entweder vererbt sind oder durch verschiedene Mutagene, wie z.B. UV-Strahlung, radioaktive Strahlung oder Chemikalien ausgelöst werden, kann man in zwei Gruppen unterteilen: dominante Veränderungen, wobei die Zielgene als Proto-Onkogene bezeichnet werden, die sich in einem Funktionszugewinn manifestieren, und rezessive Mutationen, deren Zielgene Tumor-Supressor-Gene genannt werden, die normalerweise zu einem Verlust an Funktion führen. Die Überexpression von Onkogenen und die eingeschränkte oder komplett unterbundene Funktion von Tumor-Supressor-Genen führen in ihrer Summe zumeist zu einer unkontrollierten Zellproliferation, einem Entrinnen vor apoptotischen Signalen in der Zelle und schliesslich zu einer Expansion der transformierten Zellpopulation (Überblick von Hunter, 1991, Yokota, 2000).

In den letzten 20 Jahren ist die Zahl der entdeckten Onkogene und Tumor-Supressor-Gene stark angestiegen, wodurch man auch zu dem Schluss kam, dass eine einzelne Veränderung in einem Gen nicht hinreichend ist um Krebs auszulösen. Es müssen sich also immer mehrere Mutationen in verschiedenen Genen einer Zelle akkumulieren, damit eine Zelle zur Tumorzelle transformiert wird. Eins der bestuntersuchten Systeme findet man in der Entwicklung vom normalen Kolongewebe über den Kolontumor bis hin zur Metastasenbildung beim Kolonkrebs (Überblick: Fearon & Vogelstein, 1990).

1.1.1 Heutiges Verständnis der Tumorigenese

Aus heutiger Sicht werden geschehende, neoplastische Transformationen als progressive Akkumulation von Mutationen in der genomischen DNS von einzelnen Zellen betrachtet. Als Hintergrund wird die Theorie über somatische Mutationen der Tumorigenese zu Grunde gelegt. Den ersten Hinweis zur Unterstützung dieser Theorie gaben die Versuche murine NIH3T3 Fibroblasten mit genomischer DNS von normalen oder Tumorzellen zu transfizieren. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Tumor-DNS im Gegensatz zur DNS von normalen Zellen die 3T3-Fibroblasten transformieren konnte (Cooper, 1982).

Die Anzahl von Veränderungen, die hinreichend ist, um aus einer Zelle eine Tumorzelle zu machen ist bis heute nicht genau festgelegt und schwankt von Krebsart zu Krebsart. Durch die Anwendung neuester Techniken und einer speziellen Form der PCR konnten in Kolon-Karzinomen von verschiedenen Patienten bis zu 11.000 Veränderungen in der genomischen DNS pro Zelle festgestellt werden. Obwohl viele dieser Mutationen nicht in den kodierenden Sequenzen manifestiert waren, sind dennoch sicherlich mehr Gene betroffen, als bisher für nötig gehalten wurden um eine normale Zelle zu transformieren (Stoler et al., 1999). Gerade beim Kolon-Karzinom schien es so, dass man die einzelnen Schritte von der normalen Zelle über benigne Stadien, den malignen Tumor bishin zur Metastase genetisch determiniert hatte. So schlugen Fearon und Vogelstein (1990) ein genetisches Modell für die kolorektale Tumorigenese vor, in dem die Akkumulation von 4-5 Mutationen oder anderen genetischen Veränderungen für den Fortschritt der Tumorigenese bis hin zur Metastase verantwortlich sind. Weiterhin sind auch noch andere Gegebenheiten für den Tumor wichtig. Die Tumorzellen müssen apoptotischen Signalen entkommen, der Tumor muss Proteine produzieren, die die Angiogenese in Gang setzen um mit Nährstoffen versorgt zu werden und die Tumor-Wirt-Interaktionen müssen derart gesteuert werden, dass es zu keiner Immunantwort des Körpers gegen den Tumor kommt. All diese Eigenschaften werden in den folgenden Kapiteln ausführlicher erklärt.

1.2 Metastasierung von Krebs

Metastase (gr. μετασταςιζ Veränderung) f: (engl.) metastasis; (allg.) als Folge der Verschleppung best. Faktoren aus einem lokalen (primären) Krankheitsprozess an anderer Stelle im Organismus entstandener sekundärer Krankheitsherd.

(aus: Pschyrembel, klinisches Wörterbuch, 257. Auflage, Berlin 1994)

Der kritischste Schritt der Tumorprogression ist das Erlangen vom metastatischem Potential. Erst die Metastasierung führt bei den meisten Tumorarten vom benignen, gutartigem Stadium zum malignen, bösartigem Stadium.

Dies geschieht, wenn Zellen des Primärtumors die Fähigkeit erlangen sich aus dem Tumor zu lösen, in das umliegende Gewebe invasieren, nachfolgend Kapillaren und Lymphbahnen penetrieren, um dann in andere, entfernte Gewebe transportiert zu werden. Dort müssen die metastasierenden Zellen extravasieren und an der neuen Stelle proliferieren, um metastatische Läsionen zu bilden (Fidler et al., 1978; Nicolson, 1982; Liotta & Stetler-Stevenson, 1993). Dieser Prozess ist bis heute nur unzureichend aufgeklärt und verstanden. Man weiss, dass die Tumorzellen viele verschiedene Veränderungen in ihrem genetischen Programm hervorbringen müssen, um den potentiell gefährlichen Weg aus dem Tumor und dem umliegenden Gewebe heraus über das Blut- und Lymphsystem in das Zielgewebe bestehen zu können.

Für diese Prozesse müssen die Tumorzellen neue Proteine exprimieren und die Expression anderer Proteine einstellen. Unter anderem muss die Zusammensetzung der Eigenschaften an der Zelloberfläche der Tumorzellen (Proteine, Lipide, Zuckerreste) für die verschiedenen Schritte des metastatischen Prozesses verändert werden.

1.2.1 Zellabkopplung und Metastasierung

Die Krebszellabkopplung ist in zwei verschiedenen, aber höchst entscheidenden Bereichen der Metastasierung involviert: Zuerst in der Abkopplung der Krebszellen von ihrem Primärtumor, welcher durch Definition den essentiellen, einleitenden Schritt der Metastasierung darstellt. Zweitens ist die Ablösung des zurückhängenden Endes der Krebszelle von dem Substrat (ECM, etc.), über oder durch das sich die Krebszellen bewegen, eine zwingend notwendige Voraussetzung für die Fortbewegung der Krebszellen während der Invasion (Weiss & Ward, 1983).

Desweiteren sind bei der Zellabkopplung auch chemotaktische Faktoren wichtig, die die Bewegung der Krebszellen steuern. Dazu gehören neben nekrotischen Tumorextrakten (Tuner & Weiss, 1982) auch die Produkte der Matrixdegradierung, wie Kollagenasen, Heparanasen und andere matrixdegradierende Enzyme (Terranova et al., 1989) und viele Komponenten der ECM wie z.B. Hyaluran (Turley, 1992). Von Varani (1982) wurde vorgeschlagen, dass Krebszellen, auf dem Weg zu metastatischen Läsionen, in einer ähnlichen Art auf chemotaktische Signale reagieren, wie Leukozyten auf ihrem Weg zu Entzündungsstellen.

Pionierarbeit auf diesem Gebiet leistete die Gruppe um Liotta (1986), die eine Klasse von Zytokinen fand, die von Krebszellen produziert werden, welche sie Autokrine-Bewegungs-Faktoren (AMF, „autocrine motility factors“) nannten. In Versuchen mit Melanomzellen konnten sie zeigen, dass ein Molekül mit dem Proteingewicht von 60kD sowohl zufällige (chemokinetisch) als auch nicht-zufällige, gerichtete, Bewegung der Krebszellen stimulieren konnte.

Um im Gewebe weiter voran zu kommen, muss von den Krebszellen noch eine weitere Klasse von Proteinen produziert werden. Damit das umliegende Gewebe und die ECM durchbrochen werden kann, braucht es Proteasen, die in vier unterschiedliche Klassen eingeteilt sind. Konzentriert wurde sich in der Forschung hauptsächlich auf zwei Klassen: Das Plasmin/Plasminogen-Aktivator System der Serinproteasen und die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Die Aktivität beider Gruppen wird auf mehrfacher Ebene kontrolliert. Dies beinhaltet die normale Genaktivitätskontrolle, auf Transkriptionsebene, über die Stabilität der RNS. Desweiteren werden sie über die Translation oder die Sezernierung von Proenzymen, spezifische Inhibition und Degradierung und/oder Entfernung der aktiven Enzyme kontrolliert. Viele dieser Enzyme interagieren miteinander um verschiene „Aktivierungskaskaden“ zu formen, wie z.B. die Plasmin/Plasminogen-Aktivatoren, die sich nicht nur gegenseitig aktivieren, sondern auch andere MMPs aktivieren (Stettler-Stevenson et al., 1993).

Die Matrix-Metalloproteinasen sind in drei Untergruppen eingeteilt: interstitielle Kollagenase (die fibrilläre Kollagene des Typs I, II, III und V degradiert), Typ IV Kollagenase (Gelatinase, welche dreifachhelix Kollagene des Typs IV, V, VII, XI, Fibronectin und Elastin degradiert) und Stromelysine (degradieren Proteoglycan-Proteine, Laminin, Fibronectin, Gelatin und nichthelikale Anteile der Basalmembran-Kollagene) (Aznavoorian et al., 1993).

Wichtig in diesem Zusammenhang sind auch die „TIMP“s (tissue inhibitor of metalloproteinases), die Inhibitoren der MMPs. Die Herabregulierung einer TIMP durch ein Antisense-Konstrukt in NIH 3T3 Zellen führte zu einer erhöhten Tumorgenizität und zu erhöhter Metastasierung (Khokha & Denhardt, 1987; 1989). Somit sind die TIMPs als Tumor- und möglicherweise auch als Metastasen-Suppressoren anzusehen.

All die oben beschriebenen Komponenten sind genauso entscheidend für die Extravasierung der Krebszellen aus den Kreislaufsystemen, um in die Zielgewebe einzudringen.

In den beiden Kreislaufsystemen müssen die Krebszellen verschiedene Angriffe überstehen. Sowohl die Loslösung vom primären Tumor, als auch das Immunsystem erzeugt apoptotische Signale in den Zellen. Um zu überleben, ist es für die Krebszellen wichtig, die Fähigkeit zu entwickeln diesen Apoptosesignalen zu entkommen (Symonds et al., 1994; Naik et al., 1996; Takaoka et al., 1997). In vielen Tumorzellen sind deswegen Proteine aktiv, die das Entkommen von der Apoptose ermöglichen, wie z.B. bcl-2, von dem erstmals 1990 beschrieben wurde die Apoptose zu unterdrücken (McDonnell et al., 1990).

Ein entscheidender Schritt zur Entwicklung einer Metastase ist, im Zielgewebe wieder zu proliferieren. Die Krebszellen müssen dazu unter anderem Rezeptoren für Wachstumsfaktoren exprimieren, die dann entweder auf lokale Wachstumsfaktoren oder in einer autokrinen Weise auf selbstproduzierte Faktoren reagieren. Weiterhin ist die Versorgung der Metastasen mit Nährstoffen wichtig. Folkman und Kollegen haben gezeigt, dass schon Tumore mit einer Größe von wenigen Millimetern Durchmesser ohne neugebildete Blutgefäße nicht mehr genügend mit Nährstoffen versorgt werden (Hanahan & Folkman, 1996). Der Tumor muss daher Wachstumsfaktoren produzieren, um die Angiogenese zu starten. Einer dieser Wachstumsfaktoren ist z.B. VEGF (**v**ascular **e**ndothelial **g**rowth **f**actor) (Überblick: Folkman, 1995)

Zytokine, die von den Krebszellen selbst sezerniert werden oder von den Tumor umgebenden Zellen produziert und sezerniert werden, scheinen eine gewichtige Rolle im Prozess der Metastasierung zu spielen. Es wird beschrieben, dass Interleukin-8 sowohl eine Rolle bei der Neovaskularisierung von Tumoren als auch bei der Invasion und Metastasierung spielt (Überblick durch Bar-Eli, 1999; Rofstad & Halsor, 2000; Akiba et al., 2001). Interleukin-2 hingegen wird als Inhibitor des Invasions- und Metastasierungsprozesses (Guarini et al., 1997) beschrieben, indem es die Immunantwort des Patienten gegen den Tumor aktiviert, und es wird in Kombination mit anderen Zytokinen in klinischen Tests angewandt (Überblick: Bukowski, 2000)

Diese Prozesse unterliegen in den Zellen feinsten Regulationen. Oft findet man in den Krebszellen nur minimale Unterschiede in den Regulationsmechanismen, die dann in ihrer Summe dafür verantwortlich sind, dass aus normalen Zellen Krebszellen werden, die durch weitere Veränderungen die Fähigkeit zur Loslösung und Invasion ausbilden. Man ist aufgrund der Ergebnisse der letzten zwanzig Jahre zu dem Schluss gekommen, dass es DAS „Metastagen“ nicht gibt und das diese Theorie genauso unfertig wie irreführend war.

Es ist wichtig, dass diese Unterschiede entdeckt und erforscht werden um sie in der Diagnose und Therapie von Krebserkrankungen einzusetzen. Es ist ungemein wichtig die Krebserkrankung so früh wie möglich festzustellen. Je größer der Tumor wird bevor er entdeckt wird, desto größer ist die Warscheinlichkeit von bereits ausgebildeten Metastasen, die den Krankheitsverlauf und die Therapiechancen äußerst negativ beeinflussen können.

1.2.2 Zellmembranaufbau und Metastasierung

Metastasenbezogene Interaktionen von Tumorzellen mit ihrer Mikroumgebung werden durch ihre Peripherie vermittelt. Unter anderen stellte Schmitt (1959) fest, dass Zellmembranen nicht nur die Zelle umschliessen und den molekularen Verkehr in die Zelle und aus der Zelle heraus dirigieren, sondern auch die biochemischen Mechanismen einrichten, durch die z.B. auch Ionen gegen einen Gradienten transportiert werden können.

Es ist seit langem bekannt, dass die Zellmembran nicht nur aus einer Lipiddoppelschicht besteht, sondern aus verschiedensten Komponenten zusammengesetzt ist. In der folgenden Abbildung sind die Hauptbestandteile der Zellmembran schematisch dargestellt. Neben den Phospholipiden mit ihren beweglichen Lipid-schwänzen sind auch noch Cholesterine, integrale Proteine, sowie Transmembranproteine und Glycolipide vorhanden. Außerdem finden sich oftmals an den Proteinen auf der Außenseite der Zellmembran noch Oligosaccharid-Ketten.

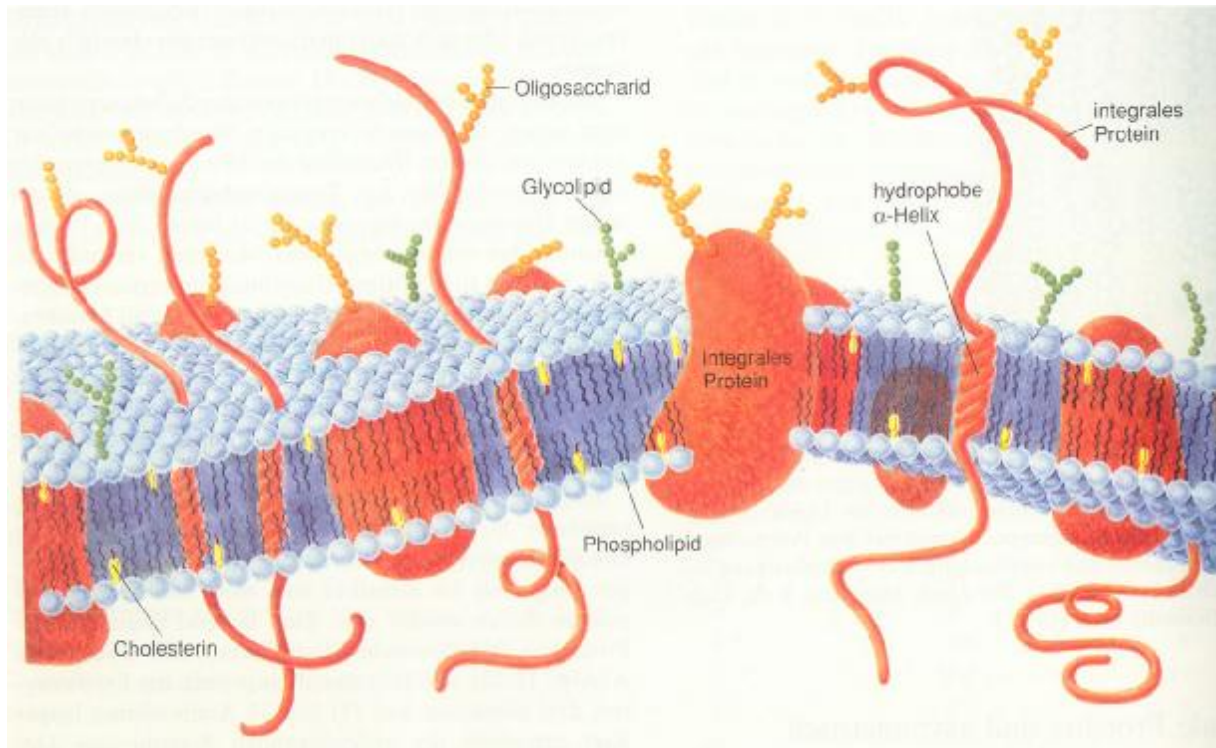


Abb.2: Aufbau und Bestandteile einer üblichen tierischen Zellmembran (aus: Voet, Voet; Biochemie, 1994, 2te Auflage)

Viele dieser Bestandteile sind auch auf Tumorzellen verändert, oder haben eine andere Funktion durch zusätzlich exprimierte Proteine oder nicht mehr exprimierte Proteine. Auch kann diese Funktionsänderung indirekt erfolgen, indem die Transportproteine der nichtproteinären Bestandteile der Zellmembran hoch- oder herabreguliert werden.

Die richtige Beschaffenheit, Funktion und Organisation von Gewebe hängt in einem beträchtlichen Maße von den Interaktionen der Zellen mit ihrer Mikroumgebung ab, die durch Zelladhäsionsmoleküle (CAM: cell adhesion molecules) vermittelt werden. Viele CAMs sind Glycoproteine. Diese durchziehen die Zellmembran, die sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre Domänen besitzen. Das Anbinden der Liganden an die extrazelluläre Domäne initiiert intrazelluläre Reaktionen durch die zytosolmatische Domäne. Die Ligandenbindung verursacht Phosphorylationen von Kinasen und Veränderungen des Zytoskeletts, welche im Gegenzug die Zellerkennung, das Migrationsverhalten, die Motilität, die Differenzierungsregulation der Signaltransduktion und die Kontrolle der Transkription modifizieren können.

Sechs verschiedene CAM-Familien sind bisher bekannt: Die Immunglobulin-Superfamilie, die Cadherine, Selectine, Rezeptor-Protein-Phosphorylasen und Integrine, von denen alle in die Zell/Zell-Adhesion involviert sind. In die Interaktion von Zellen und Matrix sind die Integrine und Hyaluronat-Rezeptoren involviert (Freemont & Hoyland, 1996).

Die Kontaktreaktionen zwischen Krebszellen und der extrazellulären Matrix (ECM) sind von größter Wichtigkeit in der Kontrolle von Ereignissen, die zur Extravasation von Krebszellen führen. So scheint E-Selectin ein Bindungspartner für Krebszellen auf Endothelzellen zu sein, der die Krebszellen im Blutkreislaufsystem an die Gefäßwände anhaften lässt und somit die Extravasierung der Karzinomzellen aus dem Kreislaufsystem erlaubt (Daneker et al., 1996; Laferriere et al., 2001).

Das erste identifizierte „CAM“ war Fibronectin, das auf der Oberfläche von Fibroblasten im sich entwickelnden Hühnerembryo exprimiert ist (Linder et al., 1975). Inzwischen weiß man, dass Fibronectin kein Zelloberflächen-Molekül, sondern in der umgebenden ECM einiger Tumore vorhanden ist und als Komponente der ECM im Prozess der Invasion enzymatisch degradiert wird (Alitalo et al., 1980).

Endothel- und Krebszellen haften an die subendotheliale Matrix und orientieren ihr Zytoskelett mit Hilfe verschiedenster Matrixmoleküle, einschließlich Fibronectine, Laminin und Kollagen (Ingber & Folkman, 1989). Diese ECM-Komponenten werden durch Zelloberflächenrezeptoren auf den Endothel- und Krebszellen detektiert, die dann diese Signale aus ihrer Umgebung an das Zytoskelett weitergeben. Krebszell-Oberflächenrezeptoren für die meisten CAMs sind Integrine, Cadherine, einige Immunglobuline und CD44. Die Integrine, die zum heutigen Zeitpunkt die wohl bestcharakterisierte Gruppe von Glykoproteinen darstellen, dienen als Verbindung zwischen ECM-Proteinen, wie Laminin und Fibronectin, zu Zytoskelett-Elementen, vorallem zu Aktinfilamenten. In direkter Relation zur Metastasierung generiert der Signalweg über $\alpha v \beta 3$ -Integrin Kollagenase, die die Invasion fördert. Dieser Integrinrezeptor ist zusätzlich in Angiogenese und Adhäsion involviert und scheint eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung der Zellhomeostase zu spielen, indem er vor Apoptose schützt (Frisch & Francis, 1994).

Gerade in den letzten Jahren ergaben sich mehrere Hinweise darauf, dass invasierende Tumorzellen auf chemotaktische Signale reagieren. Die Tumorzellen exprimieren dafür die entsprechenden Chemokin-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche (Muller et al., 2001, Robledo et al., 2001, Überblick: Murphy, 2001).

Auch andere Rezeptoren sind im Prozess der Metastasierung von Wichtigkeit. So sind Protease-Rezeptoren und ihre Liganden wichtig für Invasion und Metastasierung verschiedener Tumorarten. Von verschiedenen Autoren wird z.B. das Urokinase-Plasminogen-Aktivator-System als wichtiger Faktor beschrieben (Yang et al., 2000; Gutierrez et al., 2000; Wang et al., 2001). Aber auch andere Protease-Rezeptoren sind als invasionsfördernd beschrieben (Überblick: Ruf et al., 2000).

in der Literatur sind viele Rezeptoren für Wachstumsfaktoren beschrieben die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen zu fördern. Dazu zählen z.B. IGF-IR (insulin-like growth factor-1 Receptor) (Dunn et al., 1998) oder EGF-R (epidermal growth factor receptor (Yu et al., 1994), die verschiedene Prozesse, wie z.B. eine verminderte Adhäsion oder die Expression von matrixdegradierenden Proteinen in den Tumorzellen fördern.

Außerdem ist in den letzten Jahren das Wissen über die Involvierung der anderen Membrankomponenten in den Prozess der Invasion und Metastasierung exponentiell gewachsen. Einige Ergebnisse unterstützen die Meinung, dass die metastatischen Ressourcen von Brustkrebszellen durch rezeptorgetriebene Prozesse erweitert werden, die durch Phospholipid-Botenstoffe initiiert werden (Sliva et al. 2000).

Ebenso scheinen Glycosphingolipide (GSLs) auf Tumorzellen überexprimiert zu sein, die hier als Adhäsionsmoleküle fungieren, welche die Signaltransduktion modulieren und somit das Tumorzellwachstum und die Motilität von Tumorzellen kontrollieren. Diese GSLs können somit für eine verbesserte Metastasierung der Tumorzellen sorgen (Hakomori, 1997).

Die Rolle der Oligosaccharidketten auf den Proteinen auf der Aussenseite der Zellmembran ist durch ihre enorme Komplexität am wenigsten verstanden. Man kann bis heute nicht genau sagen, welche Auswirkungen selbst kleinste Veränderungen der Kohlenhydrat-Struktur auf den Prozess der Metastasierung haben. Frühere Ergebnisse aus unserem Labor konnten jedoch einwandfrei zeigen, dass die Blockierung bestimmter Kohlenstoffreste durch Antikörper zu einem absoluten Stopp des Tumorwachstums von Brustkrebszellen in Ratten führt (Sleeman et al., 1999).

1.3 Die morphologische Dokumentation von Tumorprogression, Invasion und Metastasen: „Staging“

Bei Krebserkrankungen ist es für die Behandlung der Patienten wichtig, dass ihre Erkrankung richtig eingestuft wird. Dazu wurden schon früh Abstufungssysteme erdacht, die auf morphologische Merkmale der Tumore gestützt wurden.

Die heutigen Einteilungssysteme basieren im wesentlichen auf dem „TNM“-System, das von Denoix und seinen Kollegen zwischen 1943 und 1952 erarbeitet wurde (Denoix, 1944; Harmer, 1978). In diesem System werden die drei wichtigsten Aspekte, der Primärtumor – T, der Status der Lymphknoten – N und entfernte Metastasen – M, untersucht und zur Einteilung des Erkrankten herangezogen.

Für kolorektale Karzinome ist das System wie folgt aufgebaut:

Primärtumor – T

TX : Primärtumor kann nicht bewertet werden

T0 : kein Nachweis eines primären Karzinoms

Tis : Karzinom in situ

T1 : Tumor dringt in die Submukosa ein

T2 : Tumor dringt in die Muscularis propria ein

T3 : Tumor bricht durch die muscularis propria in die Subserosa oder in die perikolischen oder perirektalen Gewebe ein

T4 : Tumor perforiert das viscerale Peritoneum dringt direkt in andere Organe oder Strukturen ein

Regionale Lymphknoten – N

NX : regionale Lymphknoten können nicht bewertet werden

N0 : keine regionalen Lymphknotenmetastasen

N1 : Metastasen in 1-3 perikolischen oder perirektalen Lymphknoten

N2 : Metastasen in 4 oder mehr perikolischen oder perirektalen Lymphknoten

N3 : Metastasen in irgendeinem Lymphknoten entlang eines vaskulären Strangs

Entfernte Metastasen – M

MX : Das Vorhandensein entfernter Metastasen kann nicht bewertet werden

M0 : keine entfernten Metastasen

M1 : entfernte Metastasen

Für andere Krebsarten sind auch noch andere Systeme gebräuchlich, wie z.B. das Clark-System für die Invasion von Melanomen. Auch werden die Systeme immer wieder dem verbesserten Verständnis der Tumorgenese angepasst (Schluchter, 2001).

1.4 Heutige Krebserkennung

Wie schon oben beschrieben ist es für das Überleben der Patienten und für die Therapieaussichten äußerst wichtig, den Tumor so früh wie möglich zu entdecken. Denn für viele Tumorarten wächst die Wahrscheinlichkeit zu metastasieren mit der Größe des Tumors (Sugarbaker, 1979). Heutzutage werden etwaige Krebserkrankungen zumeist mit einer Kombination von Verfahren untersucht. Um Sicherheit zu erlangen werden makroskopische Methoden, wie das Ertasten, bildgebende Methoden, wie Röntgenbilder, Ultraschall und Computertomographie mit mikroskopische Methoden wie z.B. die Feinnadelaspirations-Zytologie kombiniert und von ausgebildeten Pathologen zur Auswertung benutzt. Auch kommen in den letzten Jahren immer mehr molekular-diagnostische Methoden zum Einsatz und ich möchte hier einleitend auf die verschiedenen Verfahren eingehen und ihre Vor- und Nachteile kurz herausstellen.

1.4.1 Makroskopische Methoden

Die wohl gebräuchlichste aller Eingangsuntersuchungen bei Krebs stellt das Ab- oder Ertasten des vermeintlich betroffenen Gewebes dar. Diese Form der Krebserkennung wird vor allem beim Brustkrebs und zur Erkennung von Prostatakrebs eingesetzt. Die Vorteile beruhen allein auf der Erfahrung des behandelnden Arztes. Die Nachteile liegen darin, dass der Tumor schon ziemlich groß ist, bevor er erkannt wird, so dass es schon zur Ausbildung von Metastasen gekommen sein kann.

In Bereichen, die nicht mit den Fingern ertastet werden können werden bildgebende Verfahren, wie Röntgenstrahlung, Ultraschall, Kernspintomographie oder Positronen-Emissions-Tomographie eingesetzt.

Die Röntgenuntersuchung ist die älteste der hier vorgestellten bildgebenden Verfahren und wird schon lange zur Diagnose von Krebserkrankungen eingesetzt (z.B. Wolf, 1965). Sie beruht darauf, dass die Röntgenstrahlen von dem durchstrahlten Gewebe geschwächt oder absorbiert werden. Der Anteil der Strahlung, der das Gewebe durchdrungen hat, wird zur Bilderzeugung genutzt.

Oft werden auch noch Kontrastmittel eingesetzt, die die unterschiedliche Dichte der Tumore zum umliegenden Gewebe ausnutzen. Die Vorteile liegen ebenfalls in der Erfahrung des Arztes, der die Charakteristika der Krebserkrankung aus den Röntgenbildern lesen muss. Die Nachteile sind die relativ schlechte Auflösung der Bilder, die zudem nur eine zweidimensionale Wiedergabe der Gewebe zulassen – die Ortung und die Grenzen des Tumors sind schlecht bestimmbar. Ein weiterer Nachteil ist die Strahlenbelastung der Patienten.

Ultraschalluntersuchungen bieten vorallem bei sehr dichtem Gewebe Vorteile gegenüber der Röntgenstrahlung. Durch Anwendung neuester Computertechnik ist es heute sogar möglich, dreidimensionale Bilder der zu untersuchenden Region zu erstellen (Sedelaar et al., 2001; Cohen et al., 2001). Die Nachteile liegen auch hier in der relativ schlechten Auflösung der Bilder, kleinste Tumore werden somit leichter übersehen.

Die modernsten bildgebenden Methoden sind die Kernspintomographie und die Positronen-Emissions-Tomographie (Überblick: Kubota, 2001), die neben höherer Auflösung und dreidimensionaler Bilder, vorallem auch Aufschluss über physiologische Faktoren, wie z.B. Durchblutung und Zellreichtum krebsverdächtiger Gewebe zulassen.

Zusammenfassend sind die Nachteile all dieser Methoden, dass ihre Auflösung zu schlecht ist, oder wenn diese ausreichend ist, der Bereich des Körpers der untersucht werden kann, zu klein ist. Das heisst, es können keine Aussagen gemacht werden, die mit Sicherheit ausschließen, dass die Patienten nicht doch einen Tumor in einem anderen Bereich des Körpers ausbilden. Wenn mit diesen Verfahren Tumore erkannt werden, sind sie meist schon so groß, das es zur Metastasenbildung gekommen sein kann. Diese Methoden können also nicht zur Frühsterkennung von Krebserkrankungen eingesetzt werden.

1.4.2 Minimalinvasive Methoden

Als Beispiele für die minimalinvasiven Methoden stehen hier die Endoskopie und als Bindeglied zwischen minimalinvasiven und mikroskopischen Methoden, die Feinnadelaspirations-Zytologie.

Mit der Endoskopie werden die Vorteile der bildgebenden Methoden mit dem Vorteil, den zu untersuchenden Bereich des Körpers mit nur kleinsten invasiven Eingriffen zu erreichen, kombiniert. Zudem sind die Bilder direkt erzeugt und werden nicht durch Strahlung oder computergestützte Verfahren indirekt erstellt (Sivak & Fleischer, 1984). Der Nachteil ist wiederum der kleine Ausschnitt, der geboten wird, obwohl man mit dieser Methode auch ganze Organe, wie den Darmbereich oder die Speiseröhre untersuchen kann. Somit kann die Endoskopie zu Vorsorgeuntersuchungen eingesetzt werden. Außerdem können endoskopisch Gewebeproben entnommen werden, die dann histologisch untersucht werden können.

Die Feinnadelaspiration-Zytologie ist eigentlich eine weiterführende Diagnosemethode, bei der kleinste Gewebestücke mit Hilfe einer Hohlnadel aus den krebserdächtigen Geweben entnommen und anschliessend mikroskopisch oder histologisch vom Pathologen untersucht werden können (Übersicht: Buley & Roskell, 2000).

1.4.3 Mikroskopische Methoden

Diese Methoden, in erster Linie die Histologie, erlauben in der Regel, den Verdacht auf eine Tumorerkrankung zu bestätigen oder auszuschließen. Sollte eine Krebserkrankung vorliegen, so kann deren Art und auch der Grad der Bösartigkeit bestimmt werden. Die Vorteile liegen darin, dass eine genauere Bestimmung der vorliegenden Krebserkrankung gemacht werden kann und dass selbst in geringer Zahl vorhandene Tumorzellen detektiert werden können.

Desweiteren können die histologischen Erkenntnisse wichtige Hinweise für die Therapie des Tumors geben. Die Nachteile erschliessen sich aus der Tatsache, dass die oben beschriebenen Diagnoseverfahren den Krebsverdacht einräumen müssen, damit anschliessend die mikroskopischen Analyseverfahren zur Anwendung kommen.

Durch einen cervikalen Abstrich könne diese mikroskopischen Methoden auch zur Früherkennung bei cervikalen Tumoren eingesetzt werden (Johansen, 1979). Bei Tumoren der Haut gelangt man sehr einfach an Gewebeproben, die dann histologisch untersucht werden und zur Diagnose beihelfen.

1.4.4 Molekularbiologische Methoden

Aufgrund des exponentiellen Wachstums des Wissens in der Molekularbiologie haben viele Forscher immer wieder neue Wege gesucht dieses Wissen auch in der Krebsdiagnose einzusetzen.

Aus diesen Versuchen sind eine Reihe verschiedenster Ansätze erwachsen, die *in vitro* versuchen, das Krebsrisiko eines Patienten zu analysieren und eine möglichst frühe Diagnose zu stellen.

Die verschiene Methoden die diese eben genannten Ziele verfolgen benutzen die PCR-Methode (*polymerase chain reaction*) um Mutationen in bestimmten Genen zu finden oder die Überexpression bestimmter Gene zu evaluieren; desweiteren basieren viele Tests auf immunologischen Verfahren, um bestimmte Proteine im Gewebe oder in Körperflüssigkeiten und Exkrementen nachzuweisen.

Die meisten Gene oder Proteine, nach denen in diesen Tests gesucht wird, bezeichnen Tumormarker, die sich in vorklinischen und klinischen Versuchen als mögliche Marker für die verschiedenen Krebsarten herausgestellt haben. Ich möchte im folgenden Kapitel näher auf die einzelnen Methoden und Moleküle eingehen, die diesen Kriterien entsprechen.

1.5 Tumormarker

1.5.1 Was versteht man unter Tumormarkern ?

Gemäß der medizinischen Definition sind es tumorassoziierte Substanzen von Protein-, Lipid- oder Kohlenhydratcharakter, die in oder auf Tumorzellen vorkommen oder in ihrer Umgebung induziert werden. Einige von ihnen sind als zirkulierende Antigene im Serum oder anderen Körperflüssigkeiten (Aszites, Urin) messbar. Ihre Konzentration resultiert aus der Summe der Tumormarkereexpression, der Synthese, der Freisetzung, des Katabolismus und der Exkretion. Die Konzentration korreliert in hohem Maße mit der Entstehung, Ausbreitung und Tumorgroße. Andere Tumormarker sind nicht im Serum oder sonstigen Körperflüssigkeiten nachzuweisen, sondern werden auf cDNS-Ebene oder histologisch in Gewebeschnitten nachgewiesen. Im Idealfall sollte ein bestimmter Tumormarker eindeutig auf eine bestimmte Krebserkrankung hinweisen. Diese ideale Situation ist leider praktisch nie gegeben. Vollkommen tumorspezifische Marker konnten beim Menschen bisher noch nicht gefunden werden, und verschiedene Tumormarker können bei unterschiedlichen Krebsarten erhöht sein. Auch existieren bei weitem nicht für alle Krebserkrankungen Tumormarker. Aber nicht nur die Diagnose Krebs kann mit Hilfe der Tumormarker gestellt werden. Sie können auch zur Überwachung eines Therapieansatzes oder des Fortschritts der Krankheit dienen. In den nächsten Kapiteln gebe ich eine Übersicht der in der Klinik gebräuchlichsten Tumormarker und über hoffnungsvolle Kandidaten .

1.5.2 Welche Serum-Tumormarker sind bekannt und werden in der Klinik benutzt ?

Wie schon oben beschrieben, gibt es bis jetzt keinen Marker, der absolut tumorspezifisch ist, da viele der bis jetzt entdeckten Tumormarker auch bei anderen Krankheitsbildern in erhöhten Mengen zu finden sind. Trotzdem erweisen sich einige von ihnen als sehr hilfreich in der frühen Diagnose von Krebserkrankungen und können weiterhin auch als Maß für den Verlauf einer Therapie eingesetzt werden.

Eins der bekanntesten Beispiele für einen Tumormarker ist das *Prostata spezifische Antigen* (PSA), das nur in normalem, benignem und malignem Prostatagewebe exprimiert wird und dessen Expressionslevel einen Hinweis auf eine mögliche Krebserkrankung gibt (Barak et al., 1989). Inzwischen wurde festgestellt, dass es auch bei älteren Männern durch nichtmalignes Wachstum der Prostata zu einer Erhöhung der PSA-Produktion kommen kann. Dennoch kann dieser Marker, richtig eingesetzt und bewertet, zur Frühdiagnose von Prostatakrebs mithelfen.

Ein weiterer in der Klinik eingesetzter Marker ist das CEA (engl.: carcino-embryonic antigen), das in geringen Mengen im Blut von gesunden Menschen nachgewiesen werden kann. Ein erhöhter Level kann aber auf verschiedene Krebserkrankungen hinweisen, wie z.B. das Dickdarmkarzinom (z.B. Alsabti, 1979), Magenkarzinom (Kim et al., 2000), auf Brustkrebs (Ballasta et al., 1995) oder Lungenkrebs (Goslin et al., 1981).

Die Präsenz von CEA in Kolonkarzinomas ist schon seit fast 30 Jahren beschrieben. CEA ist nicht organspezifisch und wird in einer Reihe von Krebsarten gefunden. Es gilt jedoch nicht als einer der besten Tumormarker, da es auch in Patienten mit benignen Krankheiten wie zum Beispiel in Leberzirrhosen, Bauchspeicheldrüsenerkrankungen oder in akuter Hepatitis in erhöhten Mengen gefunden wird. Trotzdem scheint die Malignität der Krebserkrankungen direkt mit der erhöhten Expression von CEA verbunden zu sein (Ballasta et al, 1995).

Ein weiterer Marker, der in der Klinik eingesetzt wird ist CA 15-3 (CA für cancer antigen). Dieser Marker wird vorallem während der Therapie von Brustkrebs als Marker für den Verlauf der Therapie eingesetzt. Eine relativ neue Studie konnte zeigen, dass CA 15-3 auch als prognostischen Marker von Brustkrebs dienen kann (McLaughlin et al., 2000). Aber auch hier gibt es gutartige Erkrankungen, wie z.B. eine Leberzirrhose oder Hepatitis, die zu einer Erhöhung des CA 15-3 Antigens führen.

Als weiteres Beispiel möchte ich hier das AFP (Alpha-Fetoprotein) aufführen, das normalerweise während der Schwangerschaft vom Fötus produziert wird (Überblick von: Mizejewski, 2001). Erhöhte AFP-Werte gehen mit verschiedenen gut- und bösartigen Erkrankungen einher. Tumorerkrankungen, mit denen erhöhte Werte vom AFP zusammenhängen, sind das primäre Leberzellkarzinom und Keimzelltumore von Hoden und Ovar. Aber auch eine Leberzirrhose kann erhöhte Werte hervorrufen, was diesen Marker nur als zusätzlichen Anhaltspunkt für eine Krebserkrankung geeignet erscheinen lässt.

Das SCC–Antigen (engl. "squamous cell carcinoma antigen", Plattenepithelkarzinom-antigen) wird in der Klinik auch als Tumormarker verwendet. Das Antigen ist Bestandteil der Zellmembran von Plattenepithel-Krebszellen. Dementsprechend kann SCC nur bei Plattenepithelkarzinomen als Tumormarker fungieren. Falsche Werte kommen zu stande, wenn die untersuchte Probe mit Speichel oder Haut in Kontakt gekommen ist. Tumore die gehäuft mit erhöhten Werten von SCC-Antigen verbunden sind, sind Plattenepithelkarzinome von Enddarm (u.a. Gebauer, 1997) und Gebärmutterhals (de Bruijn et al., 1998).

All diese beschriebenen Tumormarker sind nicht absolut spezifisch und viele Marker zeigen auch bei gutartigen Erkrankungen erhöhte Werte. Die meisten der genannten Markern können somit nur als zusätzliche Information für den Arzt dienen. Ziel ist es solche Marker zu finden, die mit an Sicherheit grenzender Warscheinlichkeit eine Krebserkrankung erkennen lassen und auch bei der Überwachung einer Therapie eingesetzt werden können.

1.5.3 Tumormarker auf Gen- oder RNS-Ebene

Eine weitere Gruppe der Tumormarker wird vor allem in der Vorsorgeuntersuchung eingesetzt und sucht nach Hinweisen für eine genetische Disposition von Patienten für bestimmte Krebsarten. Ebenfalls können verschiedene genetische Marker zur Diagnose und Einleitung weiterer Untersuchungen eingesetzt werden. Bei diesen Markern wird das Erbmateriale auf bestimmte Mutationen hin untersucht, oder die verdächtigen Zellen werden auf die Überexpression verschiedener Gene hin analysiert.

Dies geschieht meist mittels der PCR-Methode, die innerhalb kürzester Zeit die entsprechenden Sequenzen millionenfach erzeugen kann, um sie dann zu analysieren.

Mit am besten beschrieben sind diese Risikomarker und Marker zur frühen Diagnose im Kolonkarzinom, von denen ich hier beispielhaft einige Marker kurz beschreiben möchte.

Risikofaktoren für die Entwicklung eines Dickdarmkrebses sind in den meisten Fällen vererbt worden. Alleine sind sie meistens nicht ausreichend um die Krankheit hervorzurufen. Dazu benötigt es noch somatische Mutationen, zumeist in der normal ausgeprägten Kopie des Gens, welches schon defekt vererbt wurde, die dann in ihrer kumulierenden Wirkung für den Ausbruch der Krankheit sorgen.

Durch die Heterogenität und Komplexität von Krebs scheint aber keines dieser Gene die Entwicklung von Krebs zu 100% voraussagen zu können.

Es gibt den Nachweis, dass sich Dickdarmkrebs vom normalen Gewebe über das Adenom hin zum Karzinom durch eine Akkumulation genetischer Veränderungen entwickelt (Fearon & Vogelstein, 1990; Boland et al., 1998; Chung, 2000).

Heutzutage wissen wir von Mutationen und dem Verlust von Heterozygotität (LOH, **loss of heterozygosity**) im Kolonkarzinom, die Onkogene, wie *K-ras* (Bos et al., 1989) und verschiedene Tumor-Suppressor-Gene, wie *p53* (Hollstein et al., 1991), *MCC* (**m**utated in **c**olorectal **c**ancer) (Kinzler et al., 1991), *APC* (adenomatous polyposis coli) (Grodin et al., 1991) oder *DCC* (**d**eleted in **c**olon **c**ancer) (Fearon & Vogelstein, 1990) betreffen.

Über 50% der Patienten mit einem Adenokarzinom des Dickdarms tragen ein mutiertes Allel des *K-ras* Gens. Die hohe Frequenz und das frühe Auftreten dieser Mutation zeigt das Potential dieses Gens als Biomarker für eine frühe Diagnose (Sidransky et al., 1992; Ahlquist et al., 2000).

Auch *APC* wird in einer grossen Anzahl von Dickdarmkrebs-Patienten in mutierter Form gefunden. Diese Mutation wird per PCR aus Stuhlproben der Patienten nachgewiesen. Für die frühe Diagnose von Kolonkrebs scheint dies eine hilfreiche Untersuchungsmethode darzustellen. Besonders ist dies bei gleichzeitiger Betrachtung von Mutationen des *β-catenin* – Gens der Fall, wobei man weiß, dass beide Gene den gleichen Signalweg in der Zelle aktivieren (Miyake et al., 1999).

1.5.4 Histologische Marker

Eine der am häufigsten angewandten Methoden ist die immunhistochemische Untersuchung von Gewebeschnitten der auffälligen Gewebe. Entsprechend groß ist auch die Menge der Marker, die zur Untersuchung herangezogen werden. Ich möchte hier ein paar Beispiele geben, welche Marker bei dieser Form der Diagnose eingesetzt werden. *HER2/neu* wird in einigen Studien bei Brustkrebs oder bei Magenkrebs als prognostischer Marker angesehen (Cooke et al., 2001; Yonemura, 1991), wobei oft nur Untergruppen der Brustkrebspatienten diesen Marker erhöht exprimieren. Der Verlust an *E-Cadherin* Expression im Brustkrebsgewebe ist Gegenstand einiger Studien als histologischer Marker (Gonzalez et al., 1999; Asgeirsson et al., 2000; Parker et al., 2001).

Galectin-3 wird in einer Studie als Marker für thyroideale Krebserkrankungen bezeichnet, der in fast allen untersuchten Gewebeproben erhöht exprimiert nachzuweisen war (Orlandi et al., 1998). Im Gegensatz dazu zeigt eine andere Studie, dass der Verlust Galectin-3 Expression invers mit der Aggressivität von Kopf- und Nackenkarzinomen korreliert (Choufani et al., 1999). Es wird bei der histologischen Untersuchung oft nicht nur auf das Vorhandensein oder die Abwesenheit eines Markers hin getestet, sondern auch auf die Lokalisierung des zu untersuchenden Antigens geachtet, die bei manchen Markern eine Diagnose ermöglicht.

1.5.5 Marker für die Metastasierung von Krebs

Im Verlauf einer Krebserkrankung sollte auch immer wieder das Ansprechen eines Patienten auf die Therapie sowie die Tumorprogression untersucht werden. Um frühstmöglich entstehende Metastasen zu entdecken, ist es ein Ziel der Forschung, Marker für diesen Prozess der Tumorprogression zu finden. Gleichzeitig könnten solche Marker auch in der Therapie eingesetzt werden.

Es wurden in den letzten Jahren einige Marker vorgeschlagen, die sich als Progressions- oder Metastasierungsmarker eignen könnten, wobei die verschiedenen Untersuchungen an Patienten meist zu widersprüchlichen Ergebnissen führten. Zum Beispiel für Veränderungen im Expressionsmuster von c-erbB2 (Her2/neu) in primären Tumoren im Vergleich mit Metastasen des entsprechenden Tumors. Viele unabhängige Versuchsreihen haben eine schlechte Prognose von Brustkrebs mit Abnormalitäten des c-erbB2 (Genamplifizierung und Überexpression des Proteinprodukts) in Verbindung bringen können (Ross et al., 1998). Aber es gibt genauso Studien, die überhaupt keine Relation von hoher c-erbB2 Proteinexpression und schlechter Prognose aufzeigen, obwohl die Mengen an Protein in malignen Tumoren etwa 20 mal höher lag, als in normalem Brustgewebe (Ferrero-Pous et al., 2000).

Ein relativ neu entdeckter Marker ist Cyclooxygenase-2, dessen Rolle in kolorektalen Karzinomen von Yamauchi et al. (2002) mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern untersucht wurde. Dabei zeigte sich, dass Cox-2 im Zytoplasma von Tumorzellen, aber nicht in normalen Zellen, exprimiert ist. Desweiteren konnte eine signifikante Korrelation der Expression mit Invasion und Lebermetastasen gezeigt werden. Die Expression von Cox-2 steht zusätzlich in Zusammenhang mit einer schlechten Prognose für die Patienten.

Einige potentielle Marker sind nur wenig klinisch untersucht. Ein Beispiel für einen solchen Marker, der ein großes Potential zu haben scheint, ist PSCA (**p**rostate **s**tem **c**ell **a**ntigen). In einer groß angelegten klinischen Studie mit monoklonalen Antikörpern konnte eine starke Korrelation zwischen erhöhter PSCA Expression und höherem Gleason-Grad und Knochenmetastasen gezeigt werden (Gu et al., 2000). Dieser potentielle Marker muss aber bei weiteren Untersuchungen zeigen, ob er den Anforderungen eines Markers für Tumorprogression und Metastasierung standhalten kann.

Auch Caveolin-1 ist ein solches Beispiel. Klinische Studien konnten eine Hochregulation von Caveolin-1 in Brust- und Prostatakrebs zeigen und dass es zusätzlich, vorallem nach radikaler Prostatektomie, einen prognostischen Wert hat. Auch andere Studien zeigen auf, dass durch die starke Assoziation mit fortgeschrittenem Krankheitsbild, Caveolin-1 als Marker für Metastasierung dienen könnte (Lavie et al., 1998; Li et al., 2001; Yang et al., 1999).

Die schon weiter oben von mir erwähnten Matrix-Metalloproteinasen sind ebenfalls sehr gute Kandidaten als Marker für das Metastasierungspotential von Tumoren. Eine Reihe von Untersuchungen hat eine positive Korrelation zwischen der MMP-Expression und dem metastatischen Potential von verschiedenen Tumorarten, wie denen von Lunge, Brust, Prostata und Kolon demonstrieren können (z.B Kahari et al., 1999).

Für all diese Beispiele gilt, dass weiter extensive Studien angelegt werden müssen, um ihren Wert als Metastasierungsmarker zu untermauern. Weiterhin muss die molekulare Funktion so weit wie möglich aufgeklärt werden, damit man die Signalwege, in die die einzelnen Proteine eingebunden sind, versteht. Dieses Wissen kann dann letztendlich dazu beitragen neue Tumormedikamente zu entwickeln, die spezifisch in Krebszellen, die Signalwege dieser Proteine unterbinden können und somit zu einer Eindämmung des metastatischen Potentials der Primärtumore führen würde.

Zudem sollte man weiter nach krebsspezifischen Proteinen suchen, die eine noch genauere Aussage über das Potential von Tumoren zulassen. Der wohl vielversprechendste Weg ist, gleichzeitig sehr viele verschiedene Faktoren zu untersuchen, wie es mit den neuesten Methoden der Chip-Technologie möglich ist (z.B. Alizadeh et al., 2000), um somit Tumore zu klassifizieren und damit spezifischere Behandlungsmethoden zu generieren. Dies könnte dann später dazu führen, dass jeder Patient seine, auf ihn abgestimmte Therapie erhält.

1.6 Differentielle Methoden

Wie schon im letzten Paragraph angedeutet, bieten die verschiedenen differentiellen Methoden die wohl besten Möglichkeiten neue Gene, Proteine oder andere Antigene zu entdecken, die uns neue Erkenntnisse für den Hintergrund, die Diagnose oder die Therapie von Krebserkrankungen ermöglichen. Auf dem Gebiet der differentiellen Methoden gibt es die verschiedensten Ansätze, die letztendlich alle dazu führen sollen, die Unterschiede von zwei oder mehr verschiedenen Zuständen aufzuzeigen. Diese Unterschiede können sich dann auf die Genaktivität, auf die Proteinmenge oder auf die Lokalisierung der Proteine beziehen.

Viele der oben genannten Marker sind durch differentielle Methoden entdeckt worden, von denen ich hier die bedeutendsten kurz beschreiben möchte.

1.6.1 SSH

In unserem Institut wurde in den letzten Jahren die SSH (**s**uppressive **s**ubtractive **h**ybridisation) erfolgreich eingesetzt (von Stein et al., 1998; Nestl et al., 2001). Das Ziel dieser Methode ist, die Gene zu isolieren, die nur in der einen Zelllinie, aber nicht in der anderen aktiv sind. Es werden von zwei verschiedenen Zelllinien die gesamte RNS isoliert, von denen die eine RNS-Population als „Treiber“ eingesetzt wird und die andere als „Tester“. Nachdem man die RNS mittels einer reversen Transkriptase in DNS umgeschrieben hat, gibt man beide Populationen nach einem Normalisierungsschritt zusammen. Alle DNS-Stränge die doppelt vorhanden sind hybridisieren und können dann mittels einer Endonuklease, die nur doppelsträngige DNS erkennt, geschnitten werden. Übrig bleiben nur die DNS-Stücke der Tester-Population, die vorher mit Adaptoren ausgestattet, isoliert und in Vektoren kloniert werden können. Nachfolgend beginnt die Analyse der so erhaltenen Klone. Die Vorteile dieser Methode sind teilweise auch ihre Nachteile, so kann man zwar global alle exprimierten Gene der Zellen auf einmal untersuchen, doch hat man nachher auch so viele Ergebnisse, dass man mit weiterführenden Methoden die Zahl eingrenzen muss, um auf eine Anzahl von Genen zu kommen, die dann weiter analysiert werden können. Zum Zweiten hat man damit noch kein Werkzeug zur Hand um funktionelle Analysen durchzuführen. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass kaum falsch positive Ergebnisse aus ihr resultieren.

1.6.2 „Differential Display“

Die Methode des „Differential Display“ wurde anfangs entworfen und genutzt, um Unterschiede in der Genexpression zweier oder mehrerer Zustände zu untersuchen. Dabei wurde die gesamte mRNA isoliert in cDNA umgeschrieben und auf einem Gel geladen, um die Sequenzen zu isolieren, die unterschiedlich repräsentiert waren. Die Nachteile liegen in dem hohen Aufwand der betrieben werden muss, um alle Sequenzen zu vergleichen und in der hohen Anzahl an falsch positiven Ergebnissen. Zudem können durch diese Methode keine Gene isoliert werden, bei denen es eine Veränderung in der Lokalisation ihres Genprodukts gibt. Die Vorteile dieser Methode liegen darin, dass mehrere Zustände auf einmal untersucht werden können, im Gegensatz zur subtraktiven Hybridisierung, bei der nur zwei Zustände gleichzeitig ins Auge gefasst werden können. Es gibt heutzutage Weiterentwicklungen dieser Methode, die die Vorteile der vorher beschriebenen subtraktiven Hybridisierung mit denen des „differential display“ kombinieren, um so die Nachteile der einzelnen Methoden zu kompensieren. Dieses Schema wurde dann auch erfolgreich genutzt (Kang et al, 1998), um neue Gene zu isolieren, die mit Krebs und Metastasierung assoziiert sind.

1.6.3 „Microarray“ – Analyse

In den letzten Jahren ist die Entwicklung und Nutzung von Microarrays zur Genexpressionsanalyse immer mehr in den Vordergrund gerückt (Hedenfalk et al., 2001; Mok et al., 2001; Hippo et al, 2002). Hierbei kann man ganz global oder auch sehr spezifisch die differentielle Genaktivität zweier Zustände untersuchen. Die Arrays bestehen zumeist aus Glaträgern, auf denen sehr viele DNA-Stücke von allen bekannten offenen Leserastern (ORF, engl: open reading frame) oder ganz speziell gewählten Genen kovalent gebunden sind.

Die zu untersuchenden RNS-Proben der verschiedenen Zustände werden in DNS umgeschrieben und gleichzeitig mit jeweils einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert. Die Proben werden dann zu gleichen Anteilen gemischt und auf den Chip (den Glaträger) gegeben. Mittels eines Scanners werden dann die gebundenen Proben nachgewiesen, wobei man anhand der Fluoreszenzfärbung das Verhältnis der Bindung der beiden Proben an die jeweiligen DNS-Stücke ermitteln kann.

Eingesetzt wird die Technik in vielen Bereichen, auch in der Krebsforschung. Es konnten z.B. Hedge et al. (2001) beim Vergleich der Genexpression von 6 verschiedenen Kolon-Tumorzelllinien (davon 3 hochmetastasierende und 3 geringmetastasierende) auf einem Microarray mit 19.200 DNS-Stücken in der Schnittmenge 176 Gene isolieren, die mindestens zweifach hoch- oder herunterreguliert waren, von denen 108 Gene mit bekannter und 68 Gene mit unbekannter Funktion sind.

Die Vorteile dieser Methode liegen vor allem in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und, da schon fertige Chips käuflich zu erwerben sind, in der schnellen Durchführung. Zudem können viele verschiedene Ergebnisse mit Hilfe eines Computers ausgewertet werden um Kandidaten zu finden, die interessant erscheinen. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit ganz global die Expression von tausenden von Genen gleichzeitig zu untersuchen. Die große Anzahl der Ergebnisse ist aber auch ein Nachteil, da man sich für die funktionelle Analyse ein paar wenige Gene herauspicken muss. Ein weiterer Nachteil ist, dass eine unterschiedliche Lokalisierung eines Genprodukts nicht durch diese Methode festgestellt werden kann.

Ganz allgemein ist zu beachten, dass bei den DNS-basierenden Methoden keine spezifischen Antigene, wie z.B. Kohlenhydratreste oder Glykolipide, entdeckt werden können. Ebenso wird es damit nicht möglich sein Serum-Antigene zu entdecken, da nur die Genexpressionsrate als Unterscheidungsmerkmal vorliegt. Mit keiner der vorgestellten DNS-basierenden Methoden können Unterschiede in der Lokalisierung von Genprodukten oder Veränderungen in der posttranskriptionellen Prozessierung festgestellt werden. Um diese Unterschiede zu entdecken, müssen andere Verfahren angewandt werden.

1.6.4 Oberflächen-Epitop Maskierung

Es gibt ein hohes Interesse daran, neben den reinen Genaktivitätsunterschieden, auch immunologische Reganzien, vorallem Antikörper, zu identifizieren, welche selektiv Tumorzellen erkennen. Auch hier wurden und werden differentielle Methoden entwickelt und eingesetzt, um diesem Interesse gerecht zu werden.

Eine dieser Methoden ist die Oberflächen-Epitop Maskierung (SEM, engl.: surface epitope masking). Hierbei werden die Mäuse zuerst mit einer Kontroll- oder parentalen Zelllinie immunisiert, zum Beispiel einer nichtmetastasierenden Linie. Dann wird das Serum mit den Antikörpern gegen die Kontrollzellen isoliert und die zweite Zelllinie, z.B. eine hochmetastasierende, damit inkubiert, um alle gemeinsamen Epitope abzudecken. Diese so behandelten Zellen werden zur Immunisierung weiterer Mäuse benutzt, die im Idealfall nur noch Antikörper gegen freie, einzigartige Epitope auf der zweiten Zelllinie produzieren (Shen et al., 1994; Su et al., 1996).

1.6.5 Subtraktive Immunisierung

Um neue Antigene zu finden, die mit Tumorprogression und Metastasierung assoziiert sind, verwende ich bei meinen Untersuchungen eine ähnliche Methode. Bei der Methode der subtraktiven Immunisierung (Brooks et al., 1993) ist es das Ziel, eine Immunantwort gegen einzigartige Moleküle der immunogenen Zelllinie zu erhalten und die Immunantwort gegen gemeinsame Epitope beider Zelllinien zu minimieren. Es werden normalerweise zwei Zelllinien aus einem System genommen die unterschiedliche Merkmale aufweisen, z.B. eine nichtmetastasierende und eine stark metastasierende. Um eine Immunantwort gegen einzigartige Epitope der metastasierenden Zelllinie zu erhalten, wird zuerst die nichtmetastasierende, oder allgemein tolerogene Zelllinie in Mäuse injiziert. Nach 24 und 48 Stunden zerstört man die entstehende Immunantwort, indem man die Mäuse mit Cyclophosphamid behandelt, einer Chemikalie, die vorallem B-Zellen des Immunsystems zerstört.

Dann immunisiert man die Mäuse mehrfach mit der metastasierenden Zelllinie (immunogene Zelllinie), wobei aufgrund der noch vorhandenen Gedächtniszellen des Immunsystems, eine Immunantwort nur gegen neue Epitope auf der immunogenen Zelllinie erfolgen sollte. Nach Beendigung der Immunisierung werden die B-Zellen aus der Milz mittels einer Hybridoma-Bildung zur Erzeugung monoklonaler Antikörper benutzt, die dann durch einen ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) auf den beiden Zelllinien hinsichtlich ihrer Spezifität getestet werden.

Als Beispiel möchte ich den in unserem Labor entdeckten Antikörper M-N#1 anbringen. M-N#1 wurde mittels der subtraktiven Immunisierung zwischen den Zelllinien NM081 (nicht metastasierend) und MT450 (stark metastasierend) isoliert. Diese Zelllinien sind Mitglieder eines Ratten-Mammakarzinomsystems und wurden wie oben beschrieben, eingesetzt. Dabei wurde die nichtmetastasierende Linie NM081 als Tolerogen eingesetzt und die hochmetastasierende MT450 als Immunogen. Nach der Hybridomabildung und anschließender Analyse der Klone stellte sich M-N#1 als hochspezifisch für die stark metastasierende Zelllinie heraus. Durch weitere Analysen konnte festgestellt werden, dass der Antikörper einen Zuckerrest bindet, der hohe Homologie zu Untergruppen des Blutgruppenantigens B aufweist. In Tumorexperimenten in der Ratte erwies sich der Antikörper als funktionell, um das Tumorstadium von MT450 Zellen komplett zu unterbinden (Sleeman et al., 1999).

Als in weiteren Versuchen die Funktion des Antigens im normalen Gewebe untersucht wurde, zeigte sich, dass es während der Involution (Rückbildung und Umstrukturierung nach der Laktation) des Brustgewebes hochreguliert und scheinbar exklusiv auf Zellen der Brustdrüse exprimiert wird, die nicht den Prozess der Apoptose vollziehen (Mengwasser & Sleeman, 2001).

Die Vorteile dieser Methode liegen darin, dass man mit den erhaltenen Antikörpern sofort ein Werkzeug in der Hand hat, um funktionelle Analysen zu starten. Desweiteren erhält man nicht so viele Ergebnisse, dass man erst weiterführende Analysen durchführen muss, um die geeigneten Kandidaten auswählen zu können. Ein Nachteil liegt darin, dass man das Gen für dieses Protein nicht sofort bestimmen kann.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Ich möchte hier die Ziele der vorgelegten Doktorarbeit auflisten.

- Fortsetzung der funktionellen Analyse des M-N#1 Antigens.
- Reziproke subtraktive Immunisierung mit der nichtmetastasierenden Zelllinie G und der stark metastasierenden Zelllinie AT6.1 des Dunning Rattenprostat-Krebsystems, um neue Antigene zu entdecken, die mit Tumorprogression und Metastasierung assoziiert sind, mit anschließender funktioneller Analyse.
- Reziproke subtraktive Immunisierung mit der nichtmetastasierenden Zelllinie 1AS und dem stark metastasierenden Klon 1AS Ln2 Ln2 Ln des BSP73 Rattenpankreas-Krebsystems, um ebenfalls neue Antigene zu identifizieren, die eine Rolle bei der Tumorprogression und Metastasierung spielen.
- Etablierung einer neuen Immunisierungsmethode in Abwandlung der subtraktiven Immunisierung mit der humanen Kolonkarzinoma-Zelllinie Colo320 DM, um neue Serummarker für Diagnose und Therapie zu identifizieren, mit anschließender Funktionsanalyse

2 Material

2.1 Bezugsquellen der Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0,8)	Serva, Heidelberg
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche Diagnostics, Mannheim
Agarose (Typ I)	Appligene, Heidelberg
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	BioRadLaboratories, München
Ammoniumthiosulfat	Sigma, Deisenhofen
ApopTag Plus Peroxidase Kit	Appligene, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Augsburg
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Augsburg
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Augsburg
Bakterienschalen (10 cm)	Greiner, Nürtingen
Biotin (Sulfo-NHS-LC)	Pierce,
Econo-Pack Säulen	BioRadLaboratories, München
Blaukappengefäße (15 ml und 50 ml)	Greiner, Nürtingen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva, Heidelberg
Cyclophosphamid	Sigma, Deisenhofen
Deckgläschen	Bender und Hobein, Karlsruhe
Desoxy-Nukleosidtriphosphate	Roche Diagnostics, Mannheim
Dextransulfat	Roth, Karlsruhe
D-Glucose	Roche Diagnostics, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka Buchs, Schweiz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Neu-Ulm
Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics, Mannheim
DNase I (RNase-frei)	Roche Diagnostics, Mannheim
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Eggenstein
Easy-Pure DNA Purification Kit	Biozym Diagnostik, Oldendorf
ECL-Western blotting detection reagents	AmershamPharmacia
	Biotech, Freiburg
Elektroporations-Küvetten	BioRad, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Eichproteine, gefärbt	BioRad Laboratories, München
Einbettkassetten	Leica Vertrieb GbmH, Bensheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Essigsäureanhydrid	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Folin Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt

Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco, Eggenstein
Formamid	Sigma, Deisenhofen
Gewebekulturschalen	Greiner, Nürtingen
Glutaraldehyd	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	BRL, Inc., Neu-Isenburg
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	BioRadLaboratories, München
Heringssperma-DNA Typ III	Sigma, Deisenhofen
Histowax	Leica Vertrieb GmbH, Bensheim
Hybond-N+ Membranen	AmershamPharmacia Biotech, Freiburg
Immobilon-P Transfer Membranen	Millipore, Eschbronn
Immu-Mount, wäßriges Einbettmedium	Shandon, Frankfurt
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol (2-Butanol)	Roth, Karlsruhe
Lambda DNA	Gibco, Eggenstein
Ligase Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Lithiumchlorid (LiCl)	Serva, Heidelberg
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Marathon-Ready-cDNA	Clontech, Heidelberg
Mayer's Hämatoxylin	Sigma, Deisenhofen
Mikrotiterplatten	Greiner, Nürtingen
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Serva, Heidelberg
Natriumthiosulfat	Sigma, Deisenhofen
N, N'-Methylen-Bisacrylamid	BioRadLaboratories, München
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BioRadLaboratories, München
Objektträger	Bender und Hobein, Karlsruhe
Oligo-d(T)-Cellulose	Gibco, Eggenstein
Oligonukleotide	MWG-Biotech, Ebersberg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Paraplast Plus Histowax	Sherwood, Athy
peqGold TriFast Lösung	peqLab, Erlangen
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein
Phenol	Roth, Karlsruhe
Präparationsbesteck	FineScienceTools, Heidelberg
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
Protein G Agarose	Dianova,
Protein L Agarose	Sigma, Deisenhofen
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Düsseldorf
Qiagen-tip-500-Säulen	Qiagen, Düsseldorf
QuikHyb-Hybridisierungslösung	Stratagene, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
RediPrime Random Primer Labeling	AmershamPharmacia Biotech, Freiburg
Restriktionsendonukleasen und Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
	Promega, Heidelberg
	USB, Cleveland
	AmershamPharmacia Biotech, Freiburg

Ribonukleotidtriphosphate	Roche Diagnostics, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
RNase A	Roche Diagnostics, Mannheim
RNAasin	Promega, Heidelberg
Röntgenfilme (Hyperfilm MP + ECL)	AmershamPharmacia Biotech, Freiburg
RPMI 1640 Kulturmedium	Gibco, Eggenstein
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Sephadex G 50 Nick Columns	AmershamPharmacia Biotech, Freiburg
SizeSep 400 Columns	AmershamPharmacia Biotech, Freiburg
Sterilfilter	Renner GmbH, Darmstadt
Superfrost Plus Objektträger	Labonord, Mönchengladbach
T4-Ligase	Promega, Heidelberg
T3-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
T7-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase und Puffer	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Thermosequenase Kit	AmershamPharmacia Biotech, Freiburg
TOPO-TA-Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Transkriptionspuffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Triethanolamin	Sigma, Deisenhofen
Tris-HCl, Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	BioRadLaboratories, München
Tween 20	Serva, Heidelberg
Vectastain ABC Peroxidase Standard Kit	Vector Alexis, Grünberg
Vectastain AEC Peroxidase Substrat Kit	Vector Alexis, Grünberg
Wasserstoffperoxid	Sigma, Deisenhofen
Whatmann 3MM-Papier	Bender und Hobein, Karlsruhe
Wizard Plus SV Miniprep Kit	Promega, Mannheim
Zellkulturartikel	Greiner, Nürtingen
Ziegenserum	Sigma, Deisenhofen

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Merck, Darmstadt und Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen bezogen.

2.2 Geräte

Brutschrank	Heraeus, Stuttgart
Durchflußzytometer FACStar ^{Plus}	BectonDickinson, Franklin Lakes USA
Elektrophorese-Apparaturen	PeqLab, Erlangen
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme	Kodak, New Haven
Geltrockner	BioRad, München
Image Reader FLA-3000	Fujifilm, Nakanuma, Japan
Heraeus Labofuge 400R	Heraeus, Stuttgart
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckmann, Stuttgart
PCR-Cycler, MJ-Research	Biozym, Oldendorf
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tisch-Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Stuttgart
UV-Transiluminator	Bachofer, Reutlingen
UV-Ofen Stratalinker	Stratagene, Amsterdam, NL
Vortexer	Scientific Industries, Bohemia USA

2.3 Radiochemikalien

[$\alpha^{35}\text{S}$]-Promix	(248 Mbq/ml)
[$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP	(370 Mbq/ml)

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg bezogen.

2.4 Antikörper

Primärantikörper:

Selbst hergestellte:

AT-G.1	(α -Maus IgG1)
AT-G.2	(α -Maus IgG1)

M-N#1 (Maus IgG1)
1C1 (Maus IgM)
1B7 (Maus IgG-Kontroll-Antikörper)

gekaufte:

α -Prohibitin (Maus IgG1) monoklonal
 α -Prohibitin (Kaninchen IgG) polyklonal
 α - β -Aktin (Maus IgG) monoklonal (Sigma)
 α -Paxilin (Maus IgG) monoklonal (R&D Systems)
 α -Lamin (Maus IgG) monoklonal
IgM-Kontroll-Antikörper (α -Maus IgM) (Sigma)

Sonstige:

α -Galectin 3 (α -Maus IgG1) Klon A1D6 (freundliche Gabe von Prof. Fu Tong Liu)

Sekundärantikörper:

Alle Sekundärantikörper wurden von der Firma DAKO (Glostrup, Dänemark) bezogen.

α -Maus biotinyliert
 α -Kaninchen biotinyliert
 α -Maus HRP
 α -Kaninchen HRP
 α -Maus TRITC
 α -Maus FITC
 α -Maus CY3
 α -Maus CY5
 α -Maus RPE
 α -Kaninchen TRITC

2.5 Plasmide

Allgemeine Vektoren:

pCDNA3 (5,4 kb)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pCRII-TOPO (3,9 kb)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pGEX4.1 (4,9 kb)	Invitrogen, Groningen, Niederlande

2.6 Oligonukleotide

Aktin-Primer:

Act5' : AGA GGT ATC CTG ACC CTG AAG TAC

Act3' : CCA CCA GAC AAC ACT GTG GCA T

Prohibitin-Primer:

hProhf(5') : GCA GAA GGA AAC ATG GCT G

hProhr(3') : GCT GTG TTA AGA ATC ATC GG

BAP37-Primer:

Bap2f(5') : TGC GCG AAT CTG TGT TCA CC

Bap2r(3') : CTG CAC AAT TTT CTG CCG CTG

BstX I- Adapter : 5' –CTT TCC AGC ACA- 3'

3' –GAA AGG TC- 5'

Oligo dT (NotI) : 5'd PO₄ [AAC CCG GCT CGA GCG GCC GCT₁₈]₃'

2.7 Pro- und eukaryotische Zelllinien

Prokariotische Zellen:

E. coli DH5 α (aus der Zellbank des Instituts für Toxikologie und Genetik, ITG)

Elektromax *E. coli* DH10b (Invitrogen, Groningen)

Eukariotische Zellen:

Alle Zelllinien wurden bei den Firmen DSMZ, Braunschweig; ECACC, Salisbury oder ATCC, Manassas bestellt.

Zelllinie	Herkunft	Kulturbedingungen
G	Dunning Rattenprostata-Krebszellsystem	RPMI + 10 % FCS
AT 6.1	Dunning Rattenprostata-Krebszellsystem	RPMI + 10 % FCS
1AS	BSP73 Rattenpankreas-Krebszellsystem	RPMI + 10 % FCS
1AS Ln2Ln2Ln	BSP73 Rattenpankreas-Krebszellsystem	RPMI + 10 % FCS
Colo320 DM	Humane Kolonkarzinoma Zelllinie	RPMI + 10 % FCS
HT29 G+	Humane Kolonkarzinoma Zelllinie	DMEM + 10 % FCS
HT29 MTX	Humane Kolonkarzinomalinie	DMEM + 10 % FCS
HCT15	Humane Kolon-Adenokarzinomalinie	RPMI + 10 % FCS
LoVo	Humane Kolon-Adenokarzinomalinie	RPMI + 10 % FCS
LoVo C5	Humane Kolon-Adenokarzinomalinie	RPMI + 10 % FCS
LS174T	Humane Kolon-Adenokarzinomalinie	RPMI + 10 % FCS

SW1116	Humane Kolon-Adenokarzinomlinie	L-15 + 2mM Glut +10% FCS
BT549	Humane Brust-Adenomkarzinomlinie	
MCF-7	Humane Brust-Adenomkarzinomlinie	EMEM + 2mM Glut + 1% (NEAA) + 10% FCS
Capan-1	Humane Pankreas-Adenokarzinomlinie	
SHP-77	Humane Lungenkarzinomlinie (SCLC)	RPMI + 2mM glut + 10% FCS
NCI-M23	Humane Lungenkarzinomlinie (bronchioloalveolar)	
A-172	Humane Glioblastomlinie	DMEM + 10 % FCS
T47D	Humane Brusttumormlinie	DMEM + 10 % FCS
FADU	Humane Pharynx Plattenepithel-Karzinomlinie	
HEL	Humane Leukemiazelllinie	RPMI + 10 % FCS
U937	Humane Leukemiazelllinie	RPMI + 10 % FCS
WEHI – 3B D+	Humane Leukemiazelllinie	RPMI + 10 % FCS
COS7	Affen-Fibroblasten (SV40 transformiert)	DMEM + 10 % FCS
HUVEC	Humane Umbilikalvenen Endothelialzellen	spez. Endothelialzell-Medium (Promocell)
HNEpC	Humane nasale Epithelialzellen	spez. Epithelialzell-Medium (Promocell)
NHDF	Humane dermale Fibroblasten	spez. Fibroblasten-Medium (Promocell)

3 Methoden

3.1 Zellkulturmethoden

Alle eukaryontischen Zelllinien wurden in einem Brutschrank (Heraeus, Stuttgart) in befeuchteter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ in Zellkulturflaschen kultiviert. Die Arbeitsschritte mit Zelllinien erfolgten soweit möglich an einer Sterilbank (Glatt AG, Schweiz). Medien, Puffer, Glaswaren und sonstiges Verbrauchsmaterial für die Zellkultur wurde vor Gebrauch sterilisiert (120 °C, 1,4 bar, 20 min).

3.1.1 Passagieren von Zellen

Bei allen adhärenz wachsenden Zellen wurde die Zellen vor Erreichen der Konfluenz von der Zellkulturschale abgelöst und in geringerer Dichte erneut ausgesät. Hierzu wurden alle Lösungen auf 37 °C vorgewärmt. Das Medium wurde abgesaugt und die Kulturflasche mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gespült. Je nach verwendeter Zelllinie wurde 0,05 bzw. 0,25 % Trypsinlösung (0,1 ml / cm Durchmesser der Kulturschale) auf die Zellen gegeben. Bis zum Ablösen der Zellen von der Kulturschale wurde diese in den Brutschrank gestellt (1-5 min). Anschließend wurden die Zellen je nach Größe der Kulturflasche in 5-10 ml Kulturmedium aufgenommen und vor dem Ausplattieren aus dem trypsinhaltigen Medium für 3 min bei 300 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und in der jeweils gewünschten Verdünnung auf neue Kulturflaschen verteilt. Für ein Experiment wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Anzahl an Zellen ausgesät.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Auftauen von eingefrorenen Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37 °C. Die Zellen wurden sogleich in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, 3 min bei 400 g zentrifugiert und zur Kultivierung erneut in Medium aufgenommen.

Logarithmisch wachsende Zellen wurden trypsiniert und die erhaltene Zellsuspension 3 min bei 400 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in kaltem (4 °C) Einfriermedium (Kulturmedium mit 20 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert (ca. 1 ml pro 5×10^6 Zellen). Jeweils 1 ml wurde in ein Einfrierröhrchen gegeben und zunächst 45 min auf Eis inkubiert; in einem Styroporbehälter wurden die Zellen dann über Nacht auf – 80 °C abgekühlt und schließlich in flüssigem Stickstoff (-196 °C) aufbewahrt.

3.1.3 Transfektion von COS7 Zellen durch Elektroporation

18 h vor der Transfektion wurden logarithmisch wachsende Zellen trypsiniert und in einer Dichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen in eine Ø16 cm Gewebekulturschale eingesät. Vor der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, trypsiniert, und in DMEM ohne FCS in einer Zellzahl von $2 \cdot 10^6$ pro 200 µl aufgenommen. Pro Elektroporation wurden 3-20 µg DNA in 20 µl Wasser mit 200 µl Zellsuspension gemischt und in eine Elektroporationküvette (Spaltbreite 0,2 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 220 mV und einer Kapazität von 250 µF am Gene-Pulser (BioRad, München). Ca. 5 min nach der Elektroporation wurden die Zellen in 10 ml DMEM mit 10% FCS aufgenommen, gut resuspendiert, in eine Ø10 cm Gewebekulturschale überführt und im Brutschrank bei 37°C und 6% CO² inkubiert. Nach 16-24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen bis zur weiteren Verwendung inkubiert.

3.2 DNA-Methoden

3.2.1 Analyse von Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde spektrophotometrisch durch Messen der optischen Dichte (OD) bei 260 nm durchgeführt. Eine $OD_{260}=1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA oder 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Einen Hinweis auf Verunreinigungen gibt die OD bei 280 nm (hier absorbieren Phenol, DNA und Proteine). Das Verhältnis OD_{260} zu OD_{280} sollte im Idealfall 1,8:1 bei DNA und 2:1 bei RNA sein.

Phenol/Chloroform Extraktion

Zur Reinigung der Nukleinsäure-Lösung von Proteinen wurde die Probe mit Wasser auf mindestens 100 μl aufgefüllt. Nach Zugabe des gleichen Volumens eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (50:49:1) wurde gut durchmischt. Zur Phasentrennung wurde 3 min zentrifugiert, die obere Phase abgenommen und noch einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform auf die gleiche Weise extrahiert.

Fällung von Nukleinsäuren

Die gelöste DNA wurde mit 3 M Natriumazetatlösung (pH 4,8) auf eine Endkonzentration von 0,3 M gebracht und mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol gemischt. Die Fällung erfolgte mindestens 1 Stunde bei -20°C . Das Präzipitat wurde bei 13000g 20 min pelletiert, zur Entfernung von Salzresten mit 70% Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert und anschließend getrocknet.

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8-1,5% Agarose-Minigele mit einem Gelvolumen von 50 ml, Puffervolumen von 100 ml und Taschenvolumen von 25 µl verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 50 ml 1x TAE gegeben und im Mikrowellenherd aufgeköcht bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde das Gel in die Kammer gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach Abkühlen und Erstarren der Agarose wurde das Gel vollständig mit Laufpuffer (1x TAE) überschichtet, der Kamm entfernt und die mit Glycerin-Probenpuffer versetzten Proben aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in der Regel bei 100 V. Die DNA-Banden wurden im UV-Durchlicht (302 nm) sichtbar gemacht und zur Dokumentation photographiert.

1x TAE:	40 mM Tris pH 8,3; 40 mM NaAcetat; 2 mM EDTA pH 8,0
Glycerin-Probenpuffer:	10 mM EDTA; 10% Glycerin; 0,1% SDS; 0,02% Bromphenolblau

3.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung eines bestimmten DNA-Fragmentes wurde die DNA-Lösung in einem Agarosegel entsprechender Konzentration aufgetrennt. Die entsprechende Bande wurde am UV-Tisch ausgeschnitten und mit Hilfe des Easy-Pure Kits (Biozym, Hameln) nach Angaben des Herstellers isoliert. Pro 100 µg Gelstück wurden 300 µl Salt-Lösung und 5 µl Bind verwendet. Das isolierte Fragment wurde anschließend mit 20 µl Wasser eluiert und direkt für Ligationen oder andere Anwendungen eingesetzt.

3.2.4 Plasmid DNA Mini-Präparation

Die Bakterienkolonie wurde in 2 ml Nährmedium mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml der Kultur wurden in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 4000g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Minilösung¹ (M1) resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer Lösung und Mischen wurden 150 µl 3 M Natriumazetat zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienreste bei 13000 rpm für 5 min abzentrifugiert und die Plasmid-DNA aus dem Überstand mit 1 ml Ethanol präzipitiert (30 min bei -20°C) und durch 10 min Zentrifugation bei 13000 UpM sedimentiert. Nach dem Waschen mit 70% Ethanol wurde die Plasmid-DNA im Vakuum getrocknet und in 50 µl Wasser gelöst.

M1: 50 mM Glukose; 10 mM EDTA pH 7,8; 25 mM Tris pH 8,0
alkalische Lösung: 0,2 M NaOH; 1% SDS

3.2.5 Plasmid-DNA Maxi-Präparation

200 ml Selektionsmedium wurden mit dem gewünschten Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde 10 min bei 3600g sedimentiert, das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und die Bakterien in 10 ml P2 für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Das Bakterienlysat wurde mit 10 ml P3 neutralisiert (10 min bei Raumtemperatur), bei 4°C und bei 10000g 30 min lang zentrifugiert. Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Quiagen-tip AX-500-Säulen (Quiagen, Düsseldorf) laut Herstellerprotokoll.

Nach Elution der Plasmid-DNA von der Säule wurde diese mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt, abzentrifugiert, getrocknet und anschließend in 500 µl Wasser gelöst.

Puffer P1: 50 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A
P2: 0,2 M NaOH; 1% SDS
P3: 3 M Kaliumazetat pH 5,5

3.2.6 PCR – Ansätze

Für die PCR wurde immer das Taq-Polymerase-Kit von Invitrogen verwendet, indem der 10x-PCR-Puffer, die Taq-Polymerase und das MgCl₂ enthalten sind. Wenn nicht anders angegeben wurden folgende Mengen pro PCR-Reaktion benutzt:

5µl cDNS-Vorlage
0,5µl dNTPs (10mg/ml)
0,75µl MgCl₂ (50mM)
2,5µl 10x-PCR-Puffer
0,25µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
1µl Primer A (20pM)
1µl Primer B (20pM)
ad 25µl H₂O dest.

Die Reaktionen liefen unter denen im Folgenden angegebenen Konditionen in einem PCR-Cycler von MJ Research ab.

Die Bedingungen für alle Aktin-PCRs:

94°C für 3min.

94°C für 30s

58°C für 30s

72°C für 1min

24 Zyklen

Hier die PCR-Bedingungen für die Prohibitin PCR:

94°C für 3min.

94°C für 30s

51°C für 30s

72°C für 1min

22+24 Zyklen

Die PCR-Bedingungen für die BAP37 PCR:

94°C für 3min.

94°C für 30s

58°C für 30s

72°C für 1min

24 Zyklen

3.3 Klonierungstechniken

3.3.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

In einer wässrigen DNA-Lösung wurde durch Zugabe von 10-fach konzentrierten Puffer/Salzlösungen ein für die jeweilige Restriktionsendonuklease notwendiges Milieu entsprechend den Herstellerangaben eingestellt. Pro μg DNA wurden 2-3 U Restriktionsendonuklease zugegeben. Das Reaktionsvolumen betrug mindestens das 10-fache des Volumens der zugesetzten Enzym/Glyzerin-Lösung. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte (wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen) bei 37°C für mindestens 2 h.

3.3.2 Dephosphorylierung von DNA

Die DNA wurde mit 1 μl alkalischer Phosphatase (2 U/ μl) in einem Endvolumen von 50 μl CIP-Puffer versetzt. Die Abspaltung der Phosphatgruppe erfolgte bei 5'-überhängenden Enden durch 30 min Inkubation bei 37°C. Danach wurde erneut 1 μl Enzym zugegeben und für weitere 30 min bei 37°C dephosphoryliert.

Bei 3'-überhängenden und glatten Enden wurde 15 min bei 37°C und 15 min bei 56°C inkubiert (ebenfalls mit Zugabe von 1 μl Enzym nach den ersten 15 min).

In beiden Fällen wurden anschließend 42,5 µl H₂O; 10 µl TNE und 2,5 µl SDS zugegeben und 15 min bei 68°C inkubiert. Danach erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion und Präzipitation der DNA.

CIP-Puffer: 50 mM Tris pH 9,0; 1 mM MgCl₂; 0.1 mM ZnCl₂; 1 mM Spermidin
1x TNE: 100 mM NaCl; 10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0

3.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden mit 2 µl 10x Ligasepuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (2 U/µl) versetzt und in einem Endvolumen von 20 µl für 16 h bei 16°C inkubiert. Für die Ligation inkompatibler Enden wurde ein dreifacher Überschuß an freien Enden des Inserts eingesetzt, für die Ligation von glatten Enden (blunt) wurden gleiche Mengen von Vektor und Insert verwendet.

Ligationspuffer: 50 mM Tris pH 7,4; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM Spermidin; 1 mM ATP

3.3.4 TOPO-Klonierung

Die Klonierung mit dem TOPO-Klonierungs-Kit wurde komplett nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt.

3.3.5 Transformation durch Elektroporation:

Pro Transformation wurde ein 25 µl Aliquot kompetenter Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1-5 µl DNA (am besten in Wasser) wurden die Bakterien auf Eis für 1 min inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Spaltbreite 0,1 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 1,8 kV, einer Kapazität von 25 µF am Gene-Pulser (BioRad, München). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium resuspendiert und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB/Amp-Platten (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.4 RNA Methoden

3.4.1 Präparation von gesamt-RNA aus Zellen und Gewebe

Das Gewebe wurde zuerst mit einem Mörser zerkleinert, Zellen wurden direkt verwendet, nachdem sie dreimal in PBS gewaschen wurden. Die RNA wurde mit dem Macharey&Nagel-Kit isoliert. Die Durchführung erfolgte laut dem Protokoll von Macharey&Nagel.

3.4.2 Präparation von PolyA⁺-RNA aus Zellen

Zur Präparation von PolyA⁺-RNA aus Zellen wurden $3 \cdot 10^6$ Zellen auf einer 15 cm Kulturschale ausgesät und für 24 Stunden mit ihrem entsprechenden Medium im Brutschrank bei 37°C und 6% CO² inkubiert. Zur Ernte der Zellen wurden sie zweimal mit eiskaltem, sterilem PBS gewaschen und mit 10 ml sterilem STE abgeschabt, wobei die Zellen lysierten. Die genomische DNA wurde mit Hilfe eines Ultra-TuraxTM-Homogenisators (Janke und Kunker GmbH & CoKG, Staufen) für 30 s geschert und die Suspension für 30 min bei 37°C inkubiert. Nachdem die NaCl-Endkonzentration auf 0,5 M eingestellt wurde, wurden pro Ansatz 100 mg Oligo-dT-Zellulose 1:1 in HSB zugegeben.

Unter ständigem Rotieren über Nacht bei Raumtemperatur wurde die PolyA⁺-RNA an die Oligo-dT-Zellulose gebunden. Diese Suspension wurde in 15ml Falcon-Röhrchen überführt und dann dreimal mit 10 ml HSB gewaschen. Die Elution der PolyA⁺-RNA erfolgte einmal mit 2 ml und einmal mit 3 ml Wasser. Die Konzentration der RNA wurde mit 400 µl des Eluats spektralphotometrisch bestimmt. Das verbleibende Eluat wurde mit 3 M NaAc pH 4,8 auf die Endkonzentration 0,2 M eingestellt und zusammen mit Hefe-tRNA (10µg/ml) als Fällungshilfe und dem 2,5 fachen Volumen an Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt.

Nach der Fällung wurde die RNA bei 10000g und 4°C für 30 min zentrifugiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die RNA wurde mit Wasser zu einer Konzentration von 0,5 µg/µl aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM CaCl₂; 0,6 mM MgCl₂; 5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄
STE: 20 mM Tris-HCl, pH7,4; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0,5% SDS; 300 µg/ml Proteinase K
HSB: 10 mM Tris-HCl, pH7,4, 300 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,1% SDS

3.4.3 RNA – Agarose – Gelelektrophorese

Die RNA – Agarose – Gele für die Northern-Hybridisierung wurden folgendermaßen hergestellt: Es wurden 2 g Agarose in 153 ml sterilem Wasser erhitzt und anschließend die Lösung auf eine Temperatur von 60°C gebracht. Dann wurden 5 ml Formaldehyd (37%) und 8.33 ml 20x MOPS hinzugegeben. Nach dem Aushärten des Gels wurde es mit 1x MOPS übergossen und zu den Proben denaturierenden RNA-Ladepuffer (Sigma) gegeben, die Proben 10min. bei 55°C erhitzt und geladen. Nach dem Lauf bei 70V für 4-5 Std. wurde das Gel anschließend unter UV-Licht fotografiert.

3.4.4 Northern Blot: Transfer von RNA auf Nylonmembran

Die durch die Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennte RNA wurde aus dem Gel mittels Kapillarkräften auf eine HybondT N+ - Nylonmembran transferiert. Dafür wurde das Gel auf 3 Lagen mit 20x SSC-Puffer (3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat pH 6.5) gesättigtem Whatman 3MM-Papier plaziert, wobei beide Enden des Whatman-Papiers in 20x SSC-Puffer getaucht waren. Auf das Gel wurde eine seiner Größe entsprechende Nylonmembran aufgelegt, folgend wieder 3 Lagen Whatman-Papier und ein Stapel Zellstofftücher. Der ganze Aufbau wurde mit einer Glasplatte abgedeckt und mit einem Gewicht beschwert. Nach etwa 16 Std. war die RNA auf die Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde anschließend im Stratalinker 2400 bei 254nm (Auto-Crosslink-Funktion) bestrahlt und somit die RNA an die Membran gebunden.

3.4.5 Northern-Hybridisierung

Die Membran wird nun (RNA-Seite nach oben) in ein Hybridisierungs-Gefäß gerollt und nach Zugabe von 20 ml Hybridisierungs-Puffer für 3-4 h bei 68°C (rollend) prä-hybridisiert.

Nun wird die cDNS-Sonde mit dem Stratgene-Kit radioaktiv markiert. Dies geschieht nach den Angaben des Herstellers. Bevor die radioaktiv-markierte RNA-Sonde zugegeben wird, muss diese bei 95°C für 5 min denaturiert und darauffolgend auf Eis abgekühlt werden.

Die Hybridisierung erfolgt über einen Zeitraum von 20 – 24h. Anschließend wird die Membran zuerst 3 x für jeweils 10 min (rollend) nieder-stringent und danach 2 x für je 30 min (rollend) hoch-stringent bei 65°C gewaschen. Die Analyse erfolgt, nachdem die Membran für 1 min auf 3MM-Papier getrocknet wird, durch ein Autoradiogramm.

Verwendete Sonden: Die verwendete Ratten-Galectin-3-Sonde korrespondiert zu den Basen 41-830 der publizierten Sequenz (Gen-Bank Nummer: NM031832). Sie wurde mittels eines Restriktionsverdau aus dem pcDNA3.1-Vektor geschnitten (BamHI, EcoRI).

3.4.6 Herstellung von cDNA aus PolyA⁺ -RNA

Für die Erststrang-Synthese wurden 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer (100 ng/µl) mit 0,5 bis 1 µg PolyA⁺-RNA gemischt und auf 12 µl mit sterilen Wasser aufgefüllt und für 10 min bei 70°C denaturiert. Nach Abschrecken auf Eis wurden 4 µl des 5x Erststrang Synthese Puffers, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl eines 10 mM dNTP-Mixes zugegeben. Nach Inkubation auf 42°C wurde 1 µl (200 Units) der SuperScriptTM-Reversen Transkriptase (Gibco BRL, Eggenstein) zugegeben und die Reaktion für 1 -1,5 h bei 42°C inkubiert.

Die Zweitstrangsynthese erfolgte direkt aus dem obengenannten Ansatz durch Zugabe von 20 U *E.coli* DNA-Ligase; 50 U *E. coli* DNA Polymerase; 1 U *E. coli* RNaseH; 6 µl 0,1 M DTT; 3 µl 10 mM dNTPs und 32 µl 5x Zweitstrang Synthesepuffer in einem Endvolumen von 160 µl. Die Reaktionen wurden für 2 h bei 16°C inkubiert. Zum "blunten" aller cDNA-Enden wurden anschließend 20 U T4 DNA Polymerase zugegeben. Nach einer Phenol-Chloroformextraktion wurde die cDNA durch Zugabe 1/10 Volumens 3 M NaAc pH 4,8 mit 2,5 Volumen Ethanol und 10-15 µg Glykogen bei -20°C gefällt. Nach dem Abzentrifugieren der präzipitierten cDNA wurde sie in Wasser resuspendiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

5x Erststrang Synthese Puffer: 250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; pH8,3

5x Zweitstrang Synthese Puffer: 100 mM Tris-HCl; 250 mM KCl; 25 mM MgCl₂; pH 8,4

3.4.7 Herstellung einer AT6.1 cDNA-Bibliothek

Zur Herstellung der Bibliothek wurde wie oben beschrieben aus AT6.1 Zellen polyA+ - RNA isoliert. Die cDNS wurde ebenfalls nach dem obigen Protokoll angefertigt, mit dem einen Unterschied, dass ein oligo-dT-Primer mit einer angehängten NotI-Schnittstelle (Invitrogen) verwendet wurde. Die Zweitstrangsynthese erfolgte laut oben beschriebener Methode. Nach dem Abschneiden des Überhangs am 5'-Ende wurde die cDNS mit einem BstX I-Adapter ligiert. Um überschüssigen Adaptor zu entfernen wurde die komplette Ligation über eine „SizeSep 400“-Säule (Amersham) gegeben, und somit alle cDNA-Stückchen, die kürzer als 400 bp sind, eliminiert. Der Erfolg dieser Eliminierung wurde mittels eines Agarosegels überprüft.

Als nächstes wurden Anteile der cDNS mittels Elektroporation in elektrokompente Bakterien transformiert und auf 40 große LB-Agarplatten ausgestrichen. Nach 24 Std. wurden die Bakterien mit LB-Medium und einem Gummischaber abgeschabt und durchmischt. Ein Teil wurde in Aliquots bei -80°C eingefroren und der Rest wurde für eine Plasmid Maxi-Präparation benutzt. Die erhaltene DNS wurde ebenfalls in Aliquots bei -20°C eingefroren und im weiteren für die Elektroporation von COS7-Zellen benutzt.

3.5 Proteinmethoden

3.5.1 Präparation von Zellen und Gewebe für Proteingele

Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen und dann in Protein-Probenpuffer aufgenommen. Gewebe wurde im Mörser zerkleinert und ebenfalls in Protein-Probenpuffer aufgenommen. Dann wurden die DNS in den Proben mit Hilfe eines Sonifiziergerätes zerkleinert. Die Proben konnten nun für die Proteingele verwendet werden.

3.5.2 Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)

Proteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese analysiert. Dabei wurden sie zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und in einem sich direkt anschließenden, höherprozentigen Trenngel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Die Trenngel-Lösung wurde nach vorsichtigem Mischen zwischen zwei durch 0,75-1,5 mm dicke Abstandhalter voneinander getrennte Glasplatten gegossen. Nach Überschichten mit Isopropanol läßt man das Gel in vertikaler Lage polymerisieren. Nach erfolgter Polymerisation entfernt man das Isopropanol und gießt die Sammelgel-Lösung direkt auf das Trenngel. Nach Einsetzen eines Kammes läßt man das Sammelgel in vertikaler Lage polymerisieren. Anschließend wurde das Gel in eine Vertikalapparatur eingespannt und die Reservoirs mit Elektrophorese-Puffer gefüllt. Die Proben wurden mit einfachem Volumen 2x Probenpuffer versetzt, zum Denaturieren 5 min auf 100°C erhitzt und nach Entfernen des Kammes in die Taschen des Gels transferiert. Die Elektrophorese erfolgte in der Regel bei einer Stromstärke von 80 mA. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die beiden Glasplatten voneinander getrennt. Das Gel wurde entweder direkt oder nach Anfärbung der Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau getrocknet oder die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen (Westernblot). Zur Größenbestimmung wurde ein Proteinmarker (SDS 7B, Sigma) mitgeführt.

Trenngel-Lösung: 6-12% Acrylamid; 0,16-0,32% N,N'-Methylenbisacrylamid;
375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED

Sammelgel-Lösung: 4% Acrylamid; 0,1% N,N'-Methylenbisacrylamid; 125 mM Tris-HCl pH 6,8;
0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED
Elektrophorese-Puffer: 25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 0,1% SDS
2x Probenpuffer: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau;
2% 2-Mercaptoethanol

3.5.3 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE

Proteine, die in SDS-PAGE aufgetrennt worden sind, wurden durch Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel 30 min in 0,5 ml/cm² Gelfläche Färbelösung und danach in den Entfärbelösungen 1 und 2 inkubiert, bis die Proteinbanden gut sichtbar wurden.

Färbelösung: 0,2% Coomassie-Brilliant-Blau R250; 50% Methanol; 7,5% Essigsäure
Entfärbelösung 1: 50% Methanol; 10% Essigsäure
Entfärbelösung 2: 5% Methanol; 7% Essigsäure

3.5.4 Silberfärbung von Proteingelen

Die Silberfärbung ist etwa um den Faktor 10-100 sensitiver als die Coomassie-Färbung, es können noch Proteinmengen von 5-10ng nachgewiesen werden. Wenn die Proteine nicht durch Inkubation mit Glutaraldehyd mit der Matrix des Gels vernetzt werden, kann man die Banden ausschneiden und einer Proteinanalyse unterziehen. Für die Silberfärbungen wurde immer das „silver-staining“ – Kit von Amersham benutzt. Die Prozedur wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Methode basiert darauf, dass sich ein Silbersalz an die Proteine anlagert und nach dem Auswaschen des überschüssigen Silbersalzes ein zweites Salz hinzugegeben wird, dass das an den Proteinen gebundene Silber ausfallen lässt und somit die Proteinbanden sichtbar werden.

3.5.5 Herstellung von F(ab')₂-Fragmenten

Vorbereitung der Antikörper:

Zuerst wurden 10mg Antikörper intensiv gegen eine 20mM Natriumacetat-Lösung (pH 4,5) dialysiert. Die erhaltene Antikörperlösung wurde mit Minicon-Säulen auf etwa 0,5ml aufkonzentriert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Antikörperlösung bei 4°C aufbewahrt.

Antikörper-Verdau:

Es wurden 0,25ml Pepsin-beads in ein 15ml Corexgefäß gegeben, dazu wurden 4ml Verdau-Puffer (20mM Natriumacetat, pH 4,5) gegeben und gemischt. Mit einem Separator wurden die Beads von dem Puffer getrennt. Dieser Waschvorgang wurde einmal wiederholt und die Pepsin-Beads wurden in 0,5ml Verdau-Puffer resuspendiert. 0,5ml der Antikörperlösung wurden mit der gleichen Menge Verdau-Puffer versetzt und zu den Pepsin-Beads gegeben. Dieses Gemisch wurde dann in einem Schüttelbad bei 37°C für fünf Stunden inkubiert. Dann wurden die Pepsin-Beads mit dem Separator von der Lösung abgetrennt. Die Pepsin-Beads wurden dann noch einmal mit 1,5ml Immunopur IgG Bindepuffer gewaschen und beide Überstände vereint.

Aufreinigung der F(ab')-Fragmente:

Zuerst wurde eine Protein A Säule mit 13ml Bindepuffer gewaschen. Dann wurden die 3ml Überstand aus dem Verdau auf die Säule gegeben und der Ausfluss in 1ml Aliquots gesammelt. Die Aliquots wurden bei 280nm auf ihren Proteingehalt geprüft. Diejenigen Aliquots mit den höchsten Werten wurden vereinigt und die endgültige Proteinkonzentration wurde festgestellt. Abschließend wurden sie bei -20°C bis zur Verwendung eingefroren.

3.5.6 Analyse von Proteinen durch Transfer auf Membranen und Detektion durch spezifische Antikörper (*Western blot*)

Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen wurden durch Elektrotransfer mit Hilfe einer Naßtransferkammer (Trans-Blot, BioRad Laboratories GmbH, München) auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) übertragen. Zuvor wurde die Membran 1 min in Methanol aktiviert, 5 min in ddH₂O gewässert und für mindestens 5 min in Transferpuffer (48 mM Tris-Base, 39 mM Glycin, 10 % Methanol) äquilibriert. Mit Hilfe eines Trägers wurde die Membran zusammen mit dem Gel luftblasenfrei zwischen je 3 Lagen Whatman 3MM-Papier feucht in Transferpuffer zusammengebaut. Der Träger wurde dann senkrecht in die mit Transferpuffer gefüllte Kammer so eingesetzt, dass die Membran zur Anode hin orientiert war. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte bei 4 °C für mindestens 4 h mit 300 mA.

Das Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation der Membran für mindestens 1 h in der Blockierungs-Lösung (PBS- 0.5%Tween20 mit 4% fettarmen Milchpulver) bei Raumtemperatur. Nach dem Abschütten der Blockierungs-Lösung wurde der Primär-Antikörper in 10 ml PBS-T / 4% Milchpulver zugegeben und 1h, eingeschweißt in Kunststoff-Folie, bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3-maligem Waschen für jeweils 10 min mit je 20 ml PBS-T verfährt man genauso mit dem Sekundärem-Antikörper. Nach wie oben beschriebenem Waschen wurden die Proteine, die spezifisch vom Primär-Antikörper erkannt worden sind, sichtbar gemacht.

Das Detektionsverfahren richtet sich nach dem verwendeten Sekundär-Antikörper. Bei den hier verwendeten Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundär-Antikörpern wurde die Membran 1 min mit einer 1:1-Mischung der beiden ECL-Lösungen (engl.: *enhanced-chemiluminescence*) überschichtet (2ml/dm² Membranfläche).

Nach Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit wurde schließlich in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm auf die sich in einer Kasette befindliche Membran aufgelegt und entwickelt Autoradiogramme z.B. nach 10s, 30s und 1 min.

3.5.7 Radioaktive Immunpräzipitation von Proteinen (hot-IP)

Bei der radioaktiven IP wurden die Zellen zuerst in Methionin-freiem Medium für eine halbe Stunde gehungert und dann wurde pro grosse Zellkulturplatte 100µl Promix (Amersham) hinzugegeben. Nach 2-4 Std. Inkubation wurden die Zellen in PBS gewaschen und mittels des Lysepuffers von den Platten abgelöst. Nach vollständiger Lyse wurden die Zellreste bei 13000 U/min für 15min abzentrifugiert. Nach Überführung in ein neues Eppendorfgefäß wurde 1/10 des Volumens 50%ige Protein G oder Protein L-Agarose (je nach verwendetem 1. Antikörper: Protein G bei IgG-Ak, Protein L bei IgM-Ak) hinzugegeben und Übernacht inkubiert um alle unspezifisch an die Agarose bindenden Proteine loszuwerden („preclear“).

Am nächsten Tag wurde die Agarose abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, in dem sich der Erstantikörper (Konz.: 10µg/ml) und Protein G oder Protein L – Agarose befand. Nach einer Inkubationszeit von 1-2 Std. bei 4°C unter ständigem Rotieren wurde die Agarose mit den gebundenen Proteinen mehrfach mit dem Lysepuffer gewaschen. Nach kompletter Entfernung des Puffers von der Agarose wurde 50µl Protein-Ladepuffer hinzugegeben und die Proben auf ein SDS-Protein Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Um die radioaktiven Signale sichtbar zu machen wurde das Signal zunächst verstärkt. Dazu wurde das Gel mittels DMSO entwässert und anschliessend mit DMSO-PPI behandelt. Das PPI lagert sich ins Gel ein und verstärkt die radioaktiven Signale. Nach anschließender Wässerung des Gels wurde es auf einem Geltrockner getrocknet. Dann wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und nach entsprechender Belichtungszeit entwickelt, um die radioaktiv markierten Proteinbanden sichtbar zu machen.

3.5.8 „Kalte“ Immunpräzipitation von Proteinen (IP)

Hierbei wurden die Zellen, nachdem sie in PBS gewaschen wurden, direkt mit Lysispuffer lysiert und ein „preclear“, wie oben beschrieben, durchgeführt. Auch die Immunpräzipitation erfolgte wie oben beschrieben. Nach dem Laden auf das Gel und der anschliessenden elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele dann entweder Silber- oder Coomassie-gefärbt.

3.5.9 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Zuerst wurde die Proteinlösung (0,2-1,0µg/well) über Nacht in einer feuchten Kammer in den wells gebunden. Nachdem man die überschüssige Proteinlösung abgeschüttet hatte wurden alle nichtbesetzten Bindestellen mittels 10% FCS in PBS abgeblockt. Dann wurde das Protein durch den entsprechenden Antikörper detektiert (10µg/ml, für 1 h). Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde für eine halbe Stunde mit dem Zweitantikörper, der HRP gekoppelt ist, inkubiert. Es wurde anschliessend wieder dreimal mit PBS gewaschen und die Färbelösung hinzugegeben, wobei man ABTS-Tabletten in der entsprechenden Menge ABTS-Puffer löst (laut Herstellerangaben). Die sich entwickelnde Reaktion wurde beobachtet und mittels eines UV-Lesegeräts bei 405nm ausgewertet. Zusätzlich wurde ein Bild der Farbreaktion aufgenommen

3.5.10 Zell-ELISA

Der Zell-ELISA funktioniert im Prinzip genau wie der normale ELISA. Der Unterschied besteht darin, dass man Rundboden-Platten anstatt Flachboden-Platten benutzt, damit man die Zellen nach jedem Schritt abzentrifugieren kann (1300 U/min, 3 min.). Die Zellen können auch direkt benutzt werden, sie müssen nicht erst an die Platte binden. Sonst wurde sich aber komplett an das obige Protokoll gehalten. Auch hier wurde das Ergebnis mittels eines UV-Plattenlesegeräts bei 405nm ermittelt. Der Zell-Elisa bei dem die Bindung von von biotinyliertem Galectin-3 an MT450-Zellen überprüft wurde, lief wie folgt ab: Die MT450-Zellen wurden mit biotinyliertem Galectin-3 für eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde gebundenes Protein wie in 2.5.8 beschrieben nachgewiesen. In einem zweiten Test wurden die MT450-Zellen zuerst mit verschiedenen Konzentrationen des M-N#1 Antikörpers inkubiert, nach dem Auswaschen des überschüssigen Antikörpers mit PBS wurden die Zellen mit biotinyliertem Galectin-3 Protein inkubiert. Der Nachweis, ob das Protein gebunden hat wurde, wie oben beschrieben durchgeführt.

3.5.11 „Sandwich“-ELISA

Das Prinzip des „Sandwich“-ELISA ist, in einem Proteingemisch bestimmte Proteine ganz spezifisch zu detektieren, indem man zwei Erstantikörper benutzt, die gegen verschiedene Epitope des Proteins gerichtet sind (idealerweise ist einer dieser Antikörper ein polyklonaler). Man versucht dadurch unspezifische Kreuzreaktion zu minimieren. Von der Technik läuft dieser „Sandwich“-ELISA ganz ähnlich ab, wie der oben beschriebene normale ELISA. Hierbei wurde der „capturing“-Erstantikörper über Nacht an 96-well-Flachbodenplatten gebunden. Wie oben wurden alle nicht gesättigten Bindestellen geblockt, hier aber mit 2% BSA in PBS. Dann wurde für eine Stunde das zu untersuchende Proteingemisch inkubiert und das gesuchte Protein sollte an den „capturing“-Erstantikörper binden. Dann wurde alles überschüssige Protein wieder abgewaschen (3x mit PBS).

Nun wurde das gebundene Protein mit dem Detektions-Erstantikörper nachgewiesen (zumeist ein polyklonaler AK.), der für eine Stunde inkubiert wurde. Diese Bindung wurde dann durch die oben beschriebene Methode mittels einer Farbreaktion nachgewiesen.

3.5.12 Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen

Für die Immunfluoreszenz wurden die entsprechenden Zellen verwendet. $2,5 \cdot 10^5$ Zellen wurden am Vortag auf 8-well-Chamber-Slides ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht auf den Chamber-Slides kultiviert. Am nächsten Morgen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann mit einer 3% Paraformaldehyd-Lösung für 20 min fixiert. Um überschüssiges Paraformaldehyd abreagieren zu lassen, wurden die Zellen 15 min in 50 mM NH_4Cl (in PBS) inkubiert und anschließend mit 0,1% Triton-X100 (in PBS) für 5 min permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in PBS mit 10% FCS (PBS-10% FCS) für 1 h geblockt.

Nach komplettem Absaugen der Flüssigkeit wurde der erste Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in einem Volumen von 150 µl PBS-10% FCS direkt auf die Zellen pipettiert und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS-10% FCS gewaschen und der sekundäre Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in einem Volumen von 150 µl PBS-10% FCS aufgetragen. Nach 30-60 min Inkubation bei RT wurden die Zellen dreimal mit PBS-10% FCS gewaschen und anschließend die Kammerkonstruktion von den Objektträgern entfernt und mit einem Deckglas abgedeckt. Bis zur Betrachtung der Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Proben im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

3.5.13 Immunfluoreszenzfärbung für die FACS – Analyse

Die Antikörperfärbung wurde genauso durchgeführt wie bei der Immunfluoreszenzfärbung, die oben beschrieben ist. Die Unterschiede liegen nur darin, dass die Zellen nicht fixiert und permeabilisiert wurden, somit Oberflächenproteine detektiert wurden, und dass die Reaktion in 96-well-Platten durchgeführt wurde. Alle Lösungen und Bedingungen entsprechen den oben beschriebenen.

3.5.14 Immunhistochemie

Die jeweiligen Gewebe wurden in 4%igen PFA in PBS fixiert und anschließend durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe und mit Xylol prozessiert in Paraffin überführt. Dann wurden sie in Paraffinblöcke gegossen und an einem Mikrotom geschnitten (gewöhnlich 6µm-Schnitte).

Die hier beschriebene Methode beruht auf einem indirektem Nachweis, wobei die an einem Streptavidin-Biotin-Komplex des Zweitantikörpers gebundene Peroxidase mit z.B. AEC eine Farbreaktion auslöst.

Zuerst wurden die Objektträger mit den Schnitten 2x 5 min. in Xylol deparaffiniert, danach in einer abnehmenden Ethanolreihe (2x 5 min. 100%, 1x 3 min. 95%, 1x 3 min. 70%) gewaschen und in PBS gewaschen und aufbewahrt. Als Blockierungsschritt wurden die Schnitte 15 min. in 10% Ziegen Serum in PBS inkubiert. Danach wurde mit dem entsprechenden Erstantikörper für 1 Std. inkubiert und nach dreimaligem Waschen in PBS mit 3% H₂O₂ (einer 30%igen Stammlösung) in PBS 5 min behandelt um alle endogenen Peroxidasen in den Schnitten zu zerstören. Nach erneutem, dreimaligem Waschen wurden die Schnitte mit dem biotinyliertem Zweitantikörper für eine halbe Stunde inkubiert. Um die anschließende Färbereaktion zu verstärken wurden die Schnitte danach mit dem StreptABComplex von Dako inkubiert, der vorher nach Herstellerangaben gemischt wurde.

Es folgte die Farbentwicklung mit AEC, das vorher in 1ml DMF gelöst, mit 20ml NaAc (50mM, pH 4,9) versetzt und anschließend filtriert und 6,5 µl H₂O₂ hinzugegeben wurde. Die Entwicklungszeit betrug etwa 10min. Nachdem kurz in H₂O bidest gewaschen wurde, folgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Nach mehreren Waschschritten mit normalem Leitungswasser wurden die Schnitte getrocknet und gedeckelt.

3.5.15 Apoptosefärbung von Gewebeschnitten

Die Schritte der Deparaffinierung und die Waschschriffe ergeben sich aus der oben beschriebenen Methode. Es folgt aber dann ein Proteinase K-Verdau (20µg/ml) für 15 min. bei Raumtemperatur mit anschließendem Waschschriff in H₂O. Nach der H₂O₂-Behandlung wurden die Schnitte mit den Lösungen aus dem Apoptag-Kit (Oncogene) behandelt. Zuerst wurden sie mit 75µl Äquilibriumspuffer 5 min inkubiert, dann in einer feuchten Kammer bei 37°C mit TdT-Enzym-Puffer (38µl Reaktionspuffer + 16µl TdT-Enzym pro Schnitt) für eine Stunde inkubiert. Danach wurde der Stop/ Wash-Puffer aufgetragen und für weitere 15 min. inkubiert. Nach dem anschließenden Waschschriff in PBS wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 min mit Anti-Dogoxygenin-Peroxidase-Antikörpern behandelt.

Abschließend wurde, wie oben beschrieben, mit AEC gefärbt. Für die Doppelfärbung wurde zuerst das Protokoll für eine Immunhistochemie durchlaufen; diesmal in der Abwandlung, dass hier nicht das Streptavidin-Biotin Kit benutzt wurde, sondern das alkalische Phosphatase-Kit von der Firma Vector. Die Farbentwicklung wurde mit dem Vector-Färbekit III (blaue Färbung) durchgeführt. Anschließend folgte dann die Färbung mit dem Apoptose-Kit. Für die Farbentwicklung wurde dann AEC benutzt.

3.5.16 Organfärbung von ganzen Brustgeweben mit Karmin

Nachdem die Brustgewebe aus den Mäusen entnommen wurden, wurden sie in einer 6:3:1 Lösung von Methanol:Chloroform:Essigsäure übernacht fixiert. Dann wurden sie eine Stunde in 70%igem Ethanol gewaschen und anschliessend für ein paar Minuten in H₂O gewaschen. Schließlich wurden die Gewebe erneut über Nacht in einer Karminlösung gefärbt (1g Karmin + 2,5g Kalium-Aluminium-Sulphat in 500ml H₂O für 20min kochen, dann filtrieren und zur Konservierung 50-100mg Thymol hinzugeben). Am nächsten Tag wurden die Organe je zwei Stunden in 70%, 95% und 2x 100% Ethanol gewaschen. Nach dieser Prozedur wurden sie in Methylsalicylat überführt. Darin wurden sie dann bis zur Analyse aufbewahrt.

3.5.17 Magnetische Zellsortierung (MACS)

Die magnetische Zellsortierung basiert auf dem Prinzip, dass ein Erstantikörper gegen ein bestimmtes Epitop von einem Zweitantikörper erkannt wird, der an Eisenbeads kovalent gebunden ist. Wenn diese Antikörper in ein magnetischen Feld gelangen, werden sie festgehalten und alle nicht markierten Zellen können ausgewaschen werden.

Die Zellen wurden also zuerst mit einem Primärantikörper (IgG) für 1 h inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit dem an die Eisenbeads gebundenen Zweitantikörper inkubiert, nach einer halben Stunde gewaschen und die Zellen anschliessend auf eine MACS-Säule gegeben, die vorher in den MACS-Separator gesteckt wurde, sich somit in einem Magnetfeld befindet. Dann lässt man die Zellen an die Säule binden und es wurde mehrfach mit einer Waschlösung gewaschen (PBS/ 0,5%BSA/2mM EDTA). Abschließend löst man die Säule heraus und die so separierten Zellen wurden zur weiteren Analyse aus der Säule gewaschen.

3.6 Tiermethoden

Alle hier beschriebenen Tierversuche wurden gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Experimente sind alle vom Regierungspräsidium genehmigt worden. Alle hier beschriebenen Ratten- und Mausstämme sind entweder aus dem Tierhaus des ITG oder von Harlan, England gekauft worden.

3.6.1 Hormoninjektionen in Rattenbrustgewebe

Weiblichen BDX-Ratten wurde am Ende der Laktationsphase, für die Zeiträume von 2, 4, 6 und 8 Tagen, 200 µl einer Lösung von 10mg/ml Dexamethason in Benzylbenzoat : Castor-Öl (1:2.5) direkt in das inguinale Brustgewebe injiziert. Nach der Injektionsphase wurden die Ratten getötet und das entsprechende Brustgewebe entnommen. Die Gewebe wurden entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren um RNS zu erhalten oder in 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert, um anschliessend Gewebeschnitte anzufertigen.

3.6.2 Tumorwachstum und Metastasierungsversuche in Ratten

Um das Tumorwachstum und das Metastasierungsverhalten der Dunning-Zelllinien zu testen, wurden 1×10^6 Zellen subcutan in Kopenhagen-Ratten injiziert. Bei Erreichen des Größenlimits des Tumors wurden die Ratten getötet und einer Autopsie unterzogen. Dabei wurden die Ratten auf Metastasen untersucht.

3.6.3 Tumorzell- und Antikörperinjektion in Ratten

Kopenhagen-Ratten wurden lateral subkutan Tumorzellen (AT6.1, 2×10^6) in PBS injiziert. Die Ratten wurden in Gruppen zu je acht Tieren aufgeteilt. Die einzelnen Gruppen erhielten nun über den Zeitraum von vier Wochen, zweimal wöchentlich eine Injektion von:

AT-G.1 Ak.	200µg/200µlPBS
AT-G.2 Ak.	200µg/200µlPBS
1B7 Ak.	200µg/200µlPBS
AT-G.1 F(ab')	100µg/100µl PBS
AT-G.2 F(ab')	100µg/100µl PBS
1B7 F(ab')	100µg/100µl PBS
PBS	200µl

Über den ganzen Zeitraum hinweg bis zur gesetzlich vorgeschriebenen Tötung der Tiere, wegen eines zu großen Primärtumors, wurden die Dimensionen der entstehenden Tumore gemessen und festgehalten. Nach der Tötung wurden die Tiere einer Autopsie unterzogen, um eventuelle Metastasen festzustellen.

3.6.4 Tumorzellinjektion in Mäusen

Balb/C-Nacktmäusen wurden Colo320 DM Tumorzellen (1×10^6 , in PBS) dorsal unter die Haut gespritzt. Nach Entwicklung des Tumors wurden die Tiere mit CO₂ betäubt und ihnen wurde durch eine Herzpunktion das Blut entnommen, um das Serum zu gewinnen. Außerdem wurde noch der Tumor zur Erstellung von Gewebeschnitten herausgenommen und in 4% PFA fixiert.

3.6.5 Immunisierung von Mäusen zur Herstellung monoklonaler Antikörper

Für die Immunisierung wurden Balb/C – Mäuse genommen, denen das Immunogen subkutan fünfmal innerhalb von 17 Tagen injiziert wurde (immer in einer Konzentration von etwa 15µg/Maus). Dabei wurde das Immunogen bei der ersten Injektion als eine Emulsion mit „Freund's Complete Adjuvance“ und bei der zweiten als eine Emulsion mit „Freund's Incomplete Adjuvance“ gegeben. Bei den drei restlichen Injektionen wurde es in PBS, oder im Falle des Serums, pur gegeben. Am Ende der Immunisierung wurden die Mäuse getötet, die poplitealen Lymphknoten (aus den Kniekehlen) entnommen und zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern mittels einer Hybridoma-Bildung verwendet.

3.6.6 Subtraktive Immunisierung in Mäusen

Für die Immunisierung wurden C / B6 – Mäuse genommen, denen zuerst die eine Zelllinie intraperitoneal injiziert wurde (2×10^6 , in PBS). 24 Stunden später wurde ihnen ihrem vorher gemessenen Gewicht entsprechend eine Dosis Cyclophosphamid gespritzt. Dann wurden sie dreimal im Abstand von drei Wochen mit der zweiten Zelllinie (2×10^6 , in PBS) immunisiert, die ebenfalls intraperitoneal injiziert wurde. Nach Vollendung der Immunisierung wurden die Mäuse getötet und die Milz steril entnommen, um die darin enthaltenen B-Zellen zur Produktion von monoklonalen Antikörpern heranzuziehen.

3.7 Hybridoma-Bildung zur Herstellung monoklonaler Antikörper

3.7.1 Vorbereitung

Als erstes wurden SP2/0-Maus-Myelomazellen in Kultur genommen und in ausreichender Menge produziert (etwa 5×10^8). Am Tag vor der eigentlichen Hybridoma-Bildung wurden die sogenannten „Feeder“-Zellen aus dem Peritoneum von Mäusen mittels einer 0,34 molaren Sucrose-Ausspülung isoliert. Die Zellen wurden in Hybridoma-Medium aufgenommen und auf zehn 96-well-Platten verteilt.

Hybridoma-Medium:

RPMI-Medium + 20% FCS

1 Fl. OPI (**O**xaloacetat, **P**yruvat, **I**nsulin) Medienzusatz

1 Fl. Azaserin-Hypoxanthin 50x

1 Fl. Endothelialer Zellwachstums-Zusatz (ECG-S, engl: endothelial cell growth supplement) 15 mg

3.7.2 Hybridoma-Bildung

Die immunisierten Mäuse wurden nach der Tötung in Ethanol getaucht, um sie steril zu halten. Dann wurde unter der Sterilbank entweder die Milz entnommen oder die poplitealen Lymphknoten (je nach Immunisierungsmethode) und in RPMI-Medium überführt. Mittels zweier steriler Nadeln wurden dann die B-Zellen aus den entnommenen Organen gerieben. Nachdem man die Zellen, möglichst ohne Organstückchen, in ein 50ml Falcon-Röhrchen transferiert hat, wurden die B-Zellen und die Myelomazellen 3x in RPMI gewaschen (1200U/min, 5min). Nach dem letzten Waschen wurden die Myeloma- und B-Zellen vereinigt, nochmals zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Nun erfolgte die Fusionierung mittel PEG (Polyethylenglykol). Dazu wurden die vereinigten Zellen in 400µl RPMI aufgenommen und 600µl PEG hinzugegeben. Durch leichtes Schütteln wurde alles vermischt und dann bei 1200U/min für 5min zentrifugiert. Dann wurden etwa 500µl Überstand abgenommen und durch leichtes Klopfen die Zellen wieder resuspendiert. Es wurden nun vorsichtig 5ml RPMI und dann 10ml Hybridoma-Medium hinzugegeben, um die Fusionierungsreaktion zu stoppen. Nach erneutem vorsichtigem Mischen wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 100ml Hybridoma-Medium aufgenommen. Als letztes wurden die Hybridoma-Zellen auf den zehn 96-well-Platten ausgesät.

3.7.3 Testen der Klone

Die 96-well-Platten wurden ab dem siebten Tag nach der Hybridoma-Bildung fast täglich auf wachsende Klone hin untersucht. Bei Klonen die etwa ein Drittel des wells ausfüllten, wurde das Medium fast ganz abgezogen und neues Medium gegeben. Am nächsten Tag wurde bei diesen wells etwa 100µl Medium abgenommen und dieses Medium mit den enthaltenen Antikörpern mittels eines Zell-ELISA getestet. Erwünscht war eine Bindung an die immunogene Zelllinie und keine oder eine schwache Bindung an die tolerogene Zelllinie.

3.8 Lipidextraktion

Die Lipidextraktion beruht auf der Methode von Bligh & Dyer von 1959. Hierbei wird zu in PBS gewaschenen Zellen zuerst eiskaltes Chloroform (1,25ml auf 1ml Zellsuspension) gegeben. Dann gibt man 2,5ml eiskaltes Methanol dazu, das mit dem Chloroform für den Zellaufschluss sorgt, wozu man es einige Minuten auf Eis stehen lässt. Es werden weitere 1,25ml Chloroform hinzugegeben und abschließend 1,25ml 0,2%ige Ameisensäure (HCOOH). Das Gemisch wird gevortext und für 10-30 min. auf Eis stehen gelassen. Zur besseren Phasentrennung wird abschließend bei 2500 U/min für 5 min. zentrifugiert und dann die untere organische Phase entnommen. Die so erhaltene Lipidlösung wird bei -20°C für den weiteren Gebrauch aufbewahrt.

4 Ergebnisse

4.1 M-N#1 und Galectin-3: Analyse eines schon früher identifizierten Antigens

Das M-N#1 Antigen wurde mittels einer subtraktiven Immunisierung entdeckt, die darauf ausgerichtet war, Oberflächenepitope zu entdecken, die metastasierungsspezifisch exprimiert werden. Der monoklonale Antikörper gegen dieses Antigen erkennt Kohlenhydrat-Antigene (Sleeman et al., 1999). Spezifisch bindet der Antikörper die Untergruppen 2, 3 und 4 des Blutgruppenantigens B (BGA B) mit einer leichten Kreuzreakanz zum Blutgruppenantigen A, Subtyp 2. Die Expression des Kohlenhydratrestes auf den Tumorzellen ist funktionell bedeutsam, da der M-N#1 Antikörper sehr effizient das Tumorwachstum in spontanen Metastasierungsversuchen inhibiert. Somit lassen diese Experimente den Schluss zu, dass die Expression dieser Untergruppen des BGA B, die durch den Antikörper erkannt werden, zwar nicht direkt im metastatischen Prozess involviert sind, jedoch den Tumorzellen einen Wachstums- oder Überlebensvorteil verschaffen.

Das M-N#1 Antigen wird praktisch nicht im normalen Brustgewebe exprimiert, ist jedoch stark hochreguliert während des Prozesses der Involution nach dem Stoppen der Laktation (Mengwasser & Sleeman, 2001). Die Involution, also die Rück- und Umbildung des Brustgewebes nach der Laktation ist in zwei Phasen unterteilt, eine erste, einleitende Phase, die durch lokale Hormone gesteuert wird und durch die Apoptose von voll entwickelten Epithelzellen des Brustgewebes ohne eine erkennbare Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) gekennzeichnet ist; und eine zweite Phase, in der die Umstrukturierung der ECM mit anschließender Apoptose derjenigen Zellen, die ihre differenzierte Form verloren haben, stattfindet (Lund et al., 1996).

Das M-N#1 Antigen ist in diesem Prozess praktisch ausschliesslich auf denjenigen Zellen exprimiert, die nicht der Apoptose unterliegen, was von mir anhand Doppelfärbungen gezeigt werden konnte (Mengwasser & Sleeman, 2001). Somit scheint auch im normalen Brustgewebe die M-N#1 Expression den Epithel-zellen, die für die Umstrukturierung des Brustgewebes benötigt werden, einen Wachstums- oder Überlebensvorteil zu gewähren.

Eine mögliche Erklärung für das Blockieren des Tumorwachstums durch den M-N#1 Antikörper könnte sein, dass der Antikörper die Interaktionen der Tumorzellen mit Liganden oder der ECM, die für das Wachstum oder das Überleben der Tumorzelle *in vivo* entscheidend sind, unterbindet. Ein Kandidat für so einen Liganden wäre Galectin-3.

Galectin-3 ist ein endogenes Säugetierlektin, das an ABH-Blutgruppenantigene bindet (Sato & Hughes, 1992) und das sowohl im Nukleus, im Zytoplasma, als auch extrazellulär sezerniert, zu finden ist (Übersicht durch Hughes, 1999). Es gehört zu einer Familie von Genen, deren Produkte durch zwei Eigenschaften verbunden sind: Sie teilen charakteristische Aminosäure-Sequenzen und zeigen alle eine spezifische Affinität für β -galaktoside Zucker (Barondes et al, 1994). Eine Anzahl von Funktionen wurde für Galectin-3 beschrieben, darunter die Modulation von Zelladhäsions-Eigenschaften (Inohara & Raz, 1995; Kuwabara & Liu, 1996; Warfield et al., 1997, Ochieng et al., 1998) und die Regulation der Zellmotilität (Sano et al., 2000). Zusätzlich wurde festgestellt, dass es auch anti-apoptotische und wachstumsfördernde Eigenschaften besitzt (Yang et al., 1996, Akahani et al., 1997) und die Zellinvasion unterstützt (Le Marer & Hughes, 1996). Diese Fähigkeiten sind offensichtlich mit Aspekten der Tumorgenese und Metastasierung verbunden. In einigen Fällen wurde gezeigt, dass die Expression von Galectin-3 mit dem histologischen Grad der Tumorgenese korreliert und prognostisch signifikant ist (Nakamura et al., 1999; Honjo et al., 2000). Noch bedeutender ist, dass die ektopische Expression oder die Inhibierung von Galectin-3 die Tumorigenität und die Neigung der Tumorzellen zu metastasieren erhöht, respektive vermindert (Bresalier et al., 1998; Yoshii et al., 2001; Honjo et al., 2001).

Mein Ziel in diesem Teil der Doktorarbeit war es nun, die Expression von Galectin-3 im Brustgewebe zu untersuchen um festzustellen, ob die Galectin-3 Expression mit der M-N#1 Antigen Expression korreliert, ob M-N#1 ein Ligand für Galectin-3 darstellt. Um diese Frage zu klären, sollte untersucht werden, ob Galectin-3 an MT450 Zellen bindet und ob diese Bindung durch Vorbehandlung mit dem M-N#1 Antikörper blockiert werden kann. All diese Ergebnisse sollten uns Einsichten in die Funktionweise des M-N#1 Antigens bringen, um mehr über seine Rolle in der Tumorprogression und Metastasierung zu erfahren.

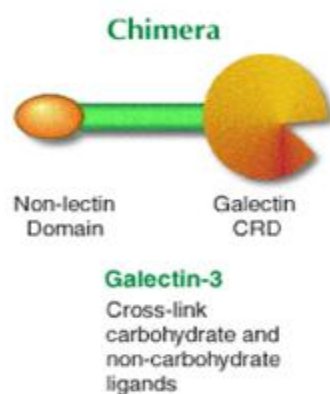


Abb.3: Hier eine schematische Darstellung des Galectin-3 Moleküls. Es stellt einen Sonderfall unter den Galectinen dar, da es einen chimären Charakter hat. Es hat eine Galectin übliche Kohlenhydrat-

4.1.1 Galectin-3 Expression im involutierenden Brustgewebe

Wie schon oben beschrieben ist das M-N#1 Antigen im sich rückbildenden Brustgewebe exprimiert. Um die Hypothese zu stützen, dass es sich bei Galectin-3 um einen möglichen Liganden für M-N#1 handelt, untersuchte ich die Expression von Galectin-3 im laktierenden und involutierenden Brustgewebe. Dazu wurden Paraffinschnitte von Rattenbrustgeweben angefertigt und immunhistochemisch mit einem Galectin-3 Antikörper angefärbt. Wie die Abbildung 4 zeigt, konnte keine Galectin-3 Expression im laktierenden Brustgewebe nachgewiesen werden. Dafür ist Galectin-3 nach dem Beginn der Involution stark hochreguliert und verbleibt hoch exprimiert für den restlichen Zeitraum der Involution.

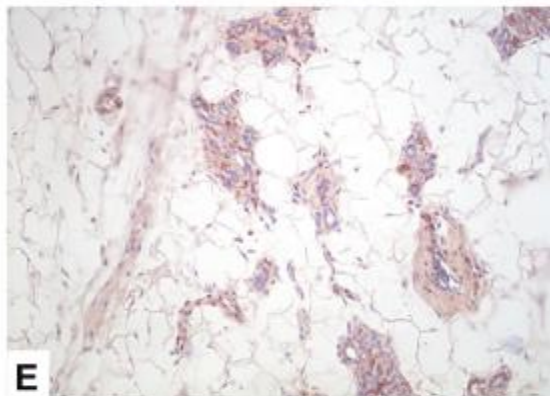
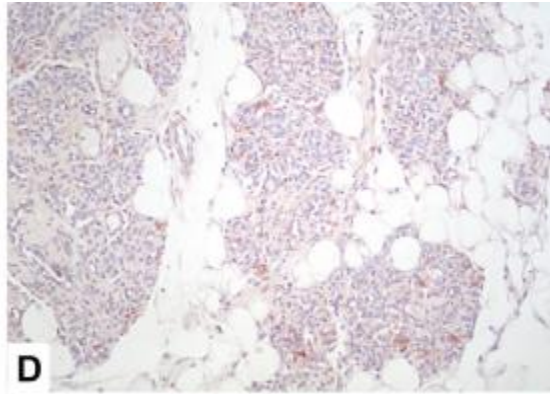
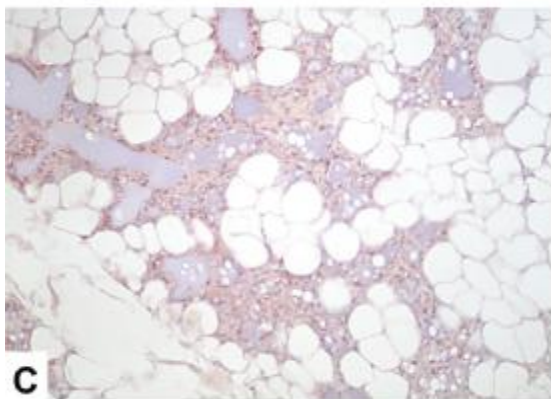
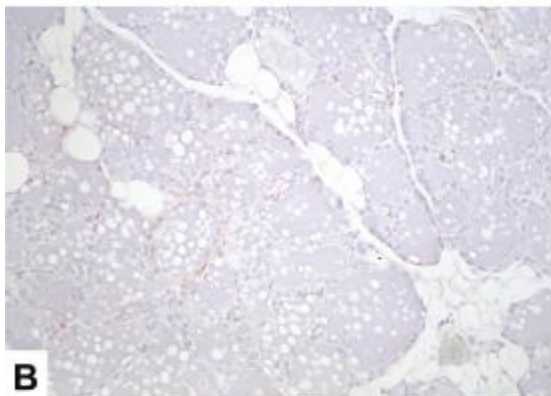
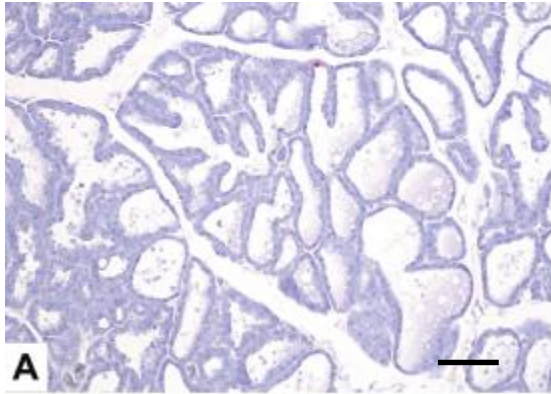


Abb.4: Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten mit dem Galectin-3 Ak. auf Rattenbrustgeweben (rBG)

A: laktierendes rBG,

B: 2 Tage (T) involutierendes (inv.) rBG,

C: 4T inv. rBG,

D: 6T inv. rBG,

E: 8T inv. rBG

Galectin-3 (rote Färbung)

Gegenfärbung mit Hämatoxilin (blau), Balken: 50µm

4.1.2 Galectin-3 Expression und apoptotische Zellen im involutierenden Brustgewebe

Da ich in früheren Versuchen zeigen konnte, dass das M-N#1 Antigen praktisch nur auf Zellen exprimiert wird, die nicht den Prozess der Apoptose untergehen, wollte ich nun feststellen, ob dies auch bei Galectin-3 exprimierenden Zellen der Fall ist, da das Expressionmuster von Galectin-3 in involutierenden Brustgeweben dem von M-N#1 stark ähnelt. Es wurden wieder Schnitte von Rattenbrustgeweben genommen, die dann einer Färbung mit einem Galectin-3 Antikörper und zusätzlich mit dem Apoptag-Kit auf apoptierende Zellen untersucht wurden. In der Abbildung 5 ist zu sehen, dass es in den involutierenden Brustgeweben praktisch keine Zellen gibt, die sowohl eine Galectin-3 Expression zeigen (blaue Färbung) und apoptotisch (rote Färbung) sind. Das Bild 5F zeigt einen solch seltenen Fall und beim Bild 5G wurde der Gewebeschnitt mit mit β -Aktin Antikörpern und dem Apoptag-Kit behandelt, um zu verdeutlichen, dass in den apoptotischen Zellen noch intakte Proteine vorhanden sind.

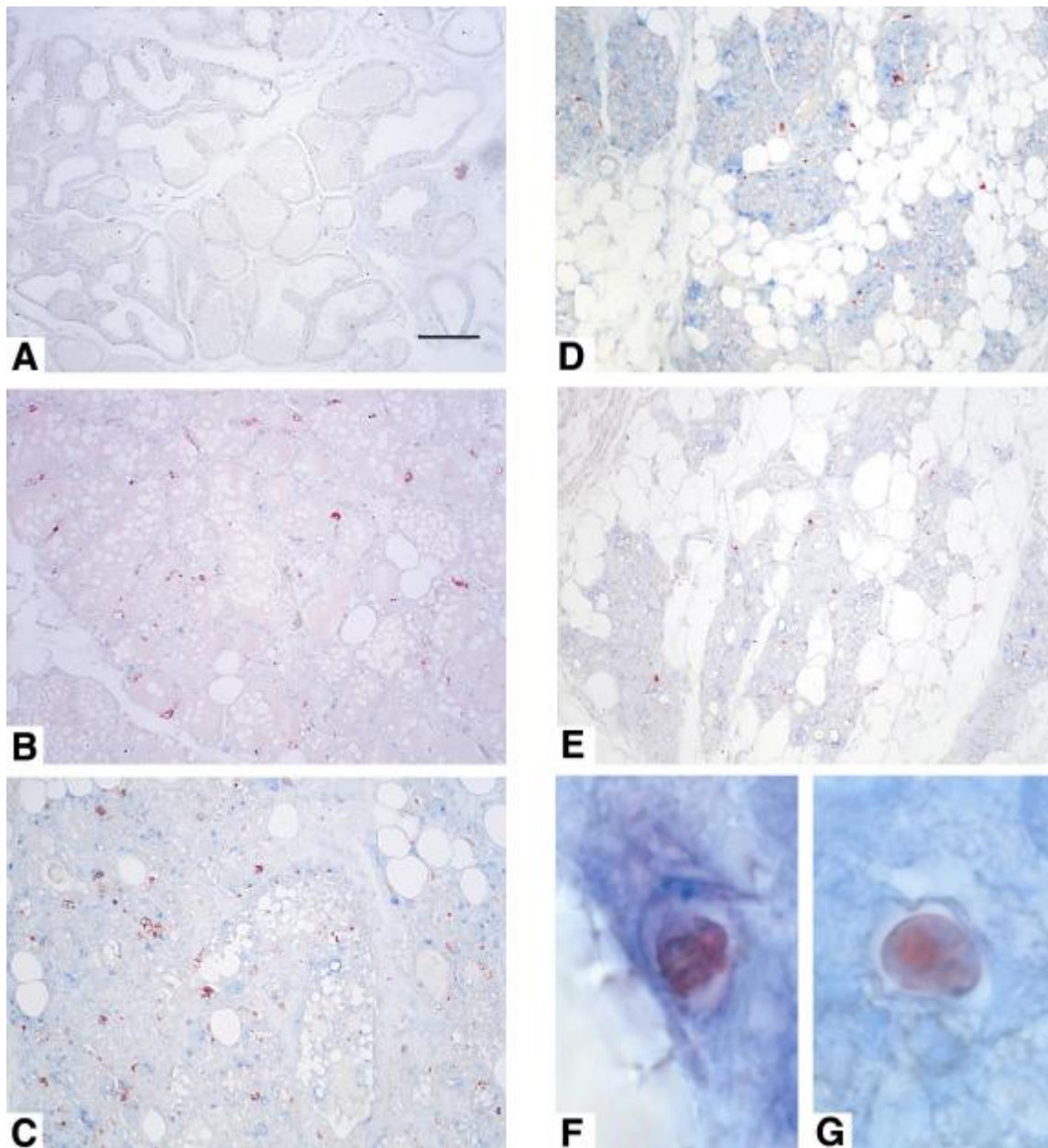


Abb.5: Apoptotische Zellen sind nicht Galectin-3 positiv. IHC-Doppelfärbung mit dem Galectin-3 Ak. (blau) und einem Apoptose-Kit (rote Färbung) auf Rattenbrustgeweben (rBG) **A:** laktierendes rBG, **B:** 2 Tage involutierendes rBG, **C:** 4T inv. rBG, **D:** 6T inv. rBG, **E:** 8T inv. rBG, **F:** doppelgefärbte Zelle (Gal-3 und apoptotisch) **G:** Dieser Schnitt wurde mit Aktin-Ak. und Apoptag-Kit angefärbt, um zu zeigen, dass auch in apoptotischen Zellen noch Proteine exprimiert sind (Aktin:blau, Apoptag: rot)
Gegenfärbung wurde zur besseren Übersicht weggelassen, Balken: A-E: 50µm

4.1.3 Koexpression von Galectin-3 und M-N#1 und apoptotischen Zellen im Rattenbrustgewebe

Nun war die Frage, ob Galectin-3 eine Kolokalisation mit dem M-N#1 Antigen aufweist. Hierzu wurden erneut Gewebeschnitte immunhistochemisch gefärbt, diesmal mittels eines Galectin-3 Antikörpers und zusätzlich mit einem M-N#1 Antikörper. Es zeigte sich, dass die Expression von Galectin-3 und M-N#1 auf einer großen Zahl von Zellen im Brustgewebe kolokalisiert ist, obwohl nicht alle Zellen diese Koexpression der beiden Antigene aufweisen (siehe Abb. 6, oben, violette Färbung). Besonders deutlich wird der Unterschied zu den beiden Geweben, die mit M-N#1 und Apoptag, respektive Galectin-3 und Apoptag gefärbt wurden (Abb. 6, mitte und unten, rote und blaue Färbung).

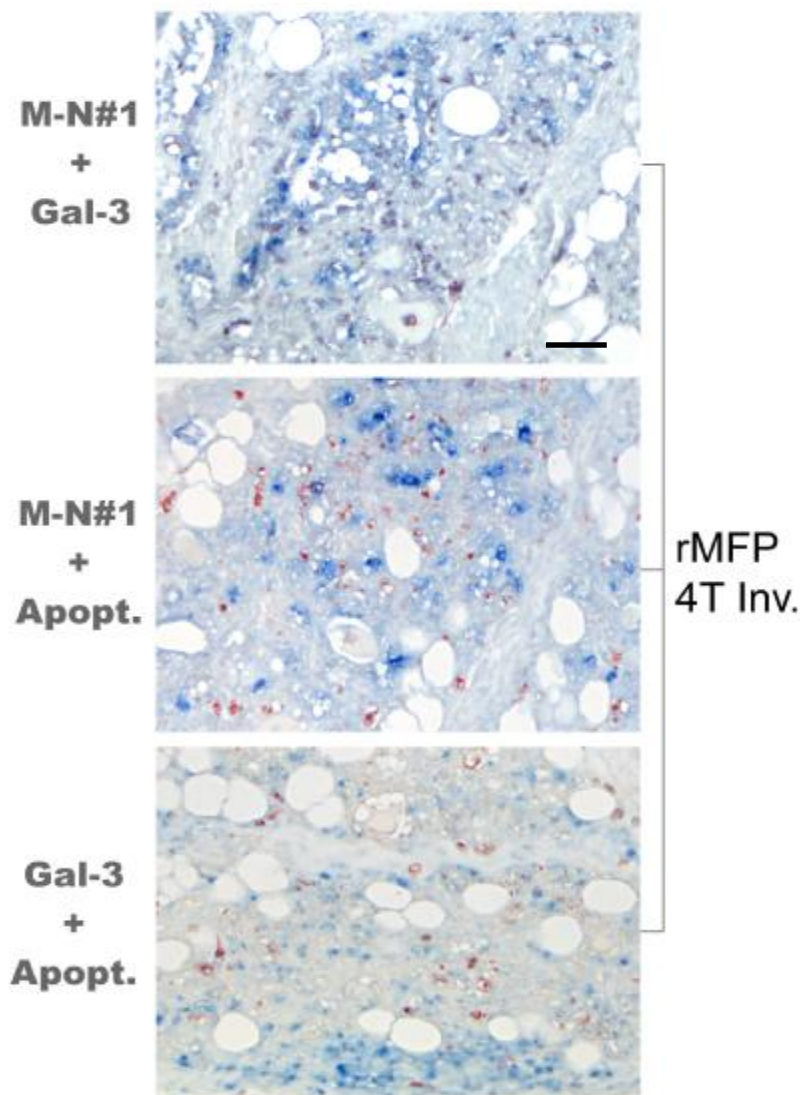


Abb.6:
Immunhistochemische Doppelfärbung auf Paraffinschnitten von Ratten-Brustgeweben
Oben: 4T inv. rBG mit M-N#1-Ak. und Gal-3 Ak. gefärbt, man sieht die violette Färbung, die eine Kolokalisation anzeigt
Mitte: 4T inv. rBG mit M-N#1 Ak. und Apoptag-Kit gefärbt. Hier ganz klare Trennung von roter (Apoptag) und blauer (M-N#1) Färbung
Unten: 4T inv. rBG mit Gal-3 Ak und Apoptag-Kit gefärbt. Hier auch klare Trennung von roter und blauer Färbung
Balken: 50µm

4.1.4 Statistische Auswertung der Expression von Galectin-3, M-N#1 und apoptotischer Zellen im involutierenden Brustgewebe

Um die erhaltenen Ergebnisse besser werten zu können wurde zusätzlich noch eine statistische Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse angefertigt. Dazu wurden mehrere Schnitte von Rattenbrustgeweben 4 Tage nach Ende der Laktation angefertigt und mit Galectin-3 Antikörpern, M-N#1 Antikörpern oder dem Apoptag-Kit gefärbt. Ich benutzte deswegen Rattenbrustgewebe 4 Tage nach Ende der Laktation, da dort die Expressionsmengen von Galectin-3 und M-N#1 als auch die Zahl der apoptotischen Zellen am größten ist. Nach der Färbung wurden die Schnitte in der Form ausgewertet, indem ich pro Schnitt in 5 Feldern von 1mm² Größe die gefärbten Zellen zählte. Dies wurde bei drei unterschiedlichen Schnitten von unterschiedlichen Tieren durchgeführt. Die Ergebnisse (Tab.1) zeigen, dass es quasi keine Zellen gibt, die sowohl apoptotisch sind als auch eine Galectin-3 oder M-N#1 Expression zeigen. Zusätzlich zeigen etwa 25-30 % der gefärbten Zellen eine Kolo-kalisation von Galectin-3 und M-N#1. Somit konnte gezeigt werden, dass Galectin-3 im involutierenden Brustgewebe stark hochreguliert ist und die Expression invers mit apoptotischen Zellen korreliert. Ebenso zeigt sich eine signifikante Anzahl an Zellen, die Galectin-3 und M-N#1 zusammen auf der Oberfläche exprimieren.

	M-N#1 pos. Zellen/mm ²	Gal-3 pos. Zellen/mm ²	Apoptotische Zellen/mm ²	doppelt pos. Zellen/mm ²
M-N#1 + Apoptag	283 ±18	—	156 ±14	1 ±0.4
Galectin-3 + Apoptag	—	364 ±22	146 ±3	4 ±0.4
M-N#1 + Galectin-3	329 ±20	398 ±28	—	87 ±9

Tab.1: Anzahl doppelt positiv gefärbter Zellen in Ratten-Brustgewebe-Schnitten 4 Tage involutierend. Die Schnitte wurden entweder mit M-N#1 Ak. und dem Apoptag-Kit, Galectin-3 Ak. und dem Apoptag-Kit oder M-N#1 Ak. und einem Galectin-3 Ak. doppelt gefärbt. Der Durchschnitt und der Standardfehler von fünf 1mm² großen Feldern pro Schnitt sind angegeben, wobei jede Färbung mind. zweimal unabhängig durchgeführt wurde.

4.1.5 Regulation der Galectin-3 Expression durch systemische Hormone

In früheren Versuchen konnte ich bestätigen, dass die systematische Gabe von Dexamethason ins laktierende Brustgewebe die zweite Phase der Involution unterdrücken kann (schon zuvor gezeigt durch: Lund et al., 1996; Li et al., 1997), dass aber die M-N#1 Expression und die Anzahl der apoptotischen Zellen nicht dadurch geändert wird (Mengwasser & Sleeman, 2001).

Ich wollte nun wissen welche Auswirkung diese Hormonbehandlung der Brustgewebe auf die Expression von Galectin-3 in diesen Brustgeweben hat. Dazu wurden Schnitte von Brustgeweben 2, 4, 6 und 8 Tage nach der Laktation genommen, die entweder für diesen Zeitraum mit Dexamethason behandelt wurden oder unbehandelt belassen wurden. Die Schnitte wurden dann durch eine immunhistochemische Färbung auf ihre Galectin-3 Expression untersucht. Wie man in der folgenden Abbildung sehen kann (Abb.7) haben die Brustgewebe, die mit Dexamethason behandelt wurden, nicht die Involution durchlaufen, was dadurch deutlich wird, dass ihre Milchkanälchen immer noch voll Milch sind und sie sich nicht zurückbilden (Bilder E-H). Jedoch ist in den behandelten Schnitten, im Gegensatz zu den unbehandelten Schnitten, eindeutig zu sehen, dass die Galectin-3 Expression dramatisch reprimiert ist und erst gegen Ende der Laktation langsam wieder ansteigt. Eine Quantifizierung der Ergebnisse zeigt (Tab.2), dass die Expression von Galectin-3 stark durch die Gabe von Dexamethason bis zum Tag 6 nach Ende der Laktation unterdrückt wird und sich dann langsam wieder erhöht.

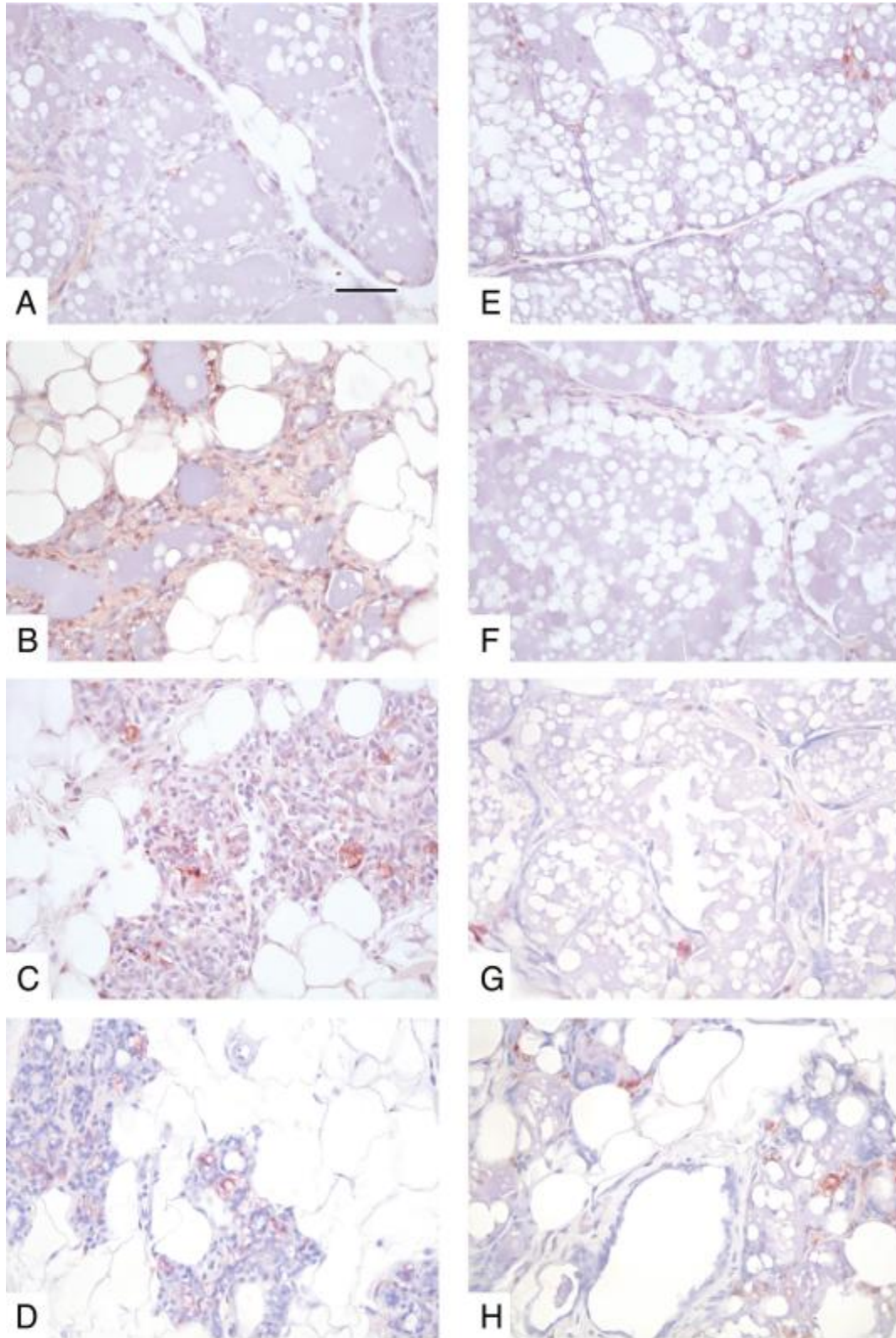


Abb.7: Immunhistochemische Färbung auf Paraffinschnitten von rBGs, die entweder mit Dexamethason behandelt wurden (E-H) oder nicht behandelt wurden (A-D), mit einem Galectin-3 Ak:

Die Gewebe wurden den Tieren 2 Tage(A, E), 4 Tage (B, F), 6 Tage (C, G), und 8 Tage (D, H) nach Ende der Laktation entnommen.

Galectin-3 Färbung (rot), Gegenfärbung mit Hämatoxilin (blau), Balken: 50µm

	a-M-N#1 pos. Zellen/mm ²		a-Galectin-3 pos. Zellen/mm ²		Apoptotische Zellen/mm ²	
	- Dex	+ Dex	- Dex	+ Dex	- Dex	+ Dex
0T	0	0	8 ±1.4	8 ±1.4	1 ±0.6	1 ±0.6
2T	59 ±2	83 ±10	74 ±11	29 ±4	81 ±6	184 ±17
4T	283 ±20	519 ±49	307 ±14	16 ±2	164 ±16	140 ±21
6T	329 ±29	451 ±58	174 ±10	99 ±2	43 ±8	70 ±4
8T	150 ±7	342 ±18	132 ±3	122 ±3	18 ±1	49 ±8

Tab.2: Anzahl positiv gefärbter Zellen in Ratten-Brustgewebe-Schnitten von Dexamethason behandelten und unbehandelten Tieren. Die Schnitte wurden entweder mit M-N#1 Ak, Galectin-3 Ak. oder dem Apoptag-Kit gefärbt. Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler von fünf 1mm² großen Feldern pro Schnitt, wobei jede Färbung mind. zweimal unabhängig durchgeführt wurde.

4.1.6 Analyse der Galectin-3 Expression in hormonbehandelten Brustgeweben durch „Northern-Blot“ Hybridisierung

Die Immunhistochemischen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Hochregulation von Galectin-3 während der Involution der Brustgewebe in einer hormonabhängigen Weise geschieht. Um diese Ergebnisse zu stützen wurde von mir die Expression von Galectin-3 in behandelten und nichtbehandelten Brustgeweben durch die Northern-Blot Hybridisierung und nachfolgend durch eine Western-Blot Analyse untersucht.

Wie erwartet können keine signifikanten Mengen an Galectin-3 vor dem Start der Involution festgestellt werden (Abb.8, 0d). Zu beachten ist, dass bei der Probe vom laktierenden Brustgewebe mehr polyA+-RNA geladen wurde, um das GAPDH Signal anzugleichen. Es wurde von mir in früheren Versuchen schon gezeigt, dass die GAPDH-Expression im involutierenden Brustgewebe hochreguliert ist (Mengwasser & Sleeman, 2001). Die Expression von Galectin-3 ist stark im sich rückbildenden Brustgewebe hochreguliert und bleibt konsistent hoch bis 8 Tage nach der Laktation. Überraschenderweise zeigt sich die gleiche Situation in den Brustgeweben, die mit Dexamethason behandelt wurden.

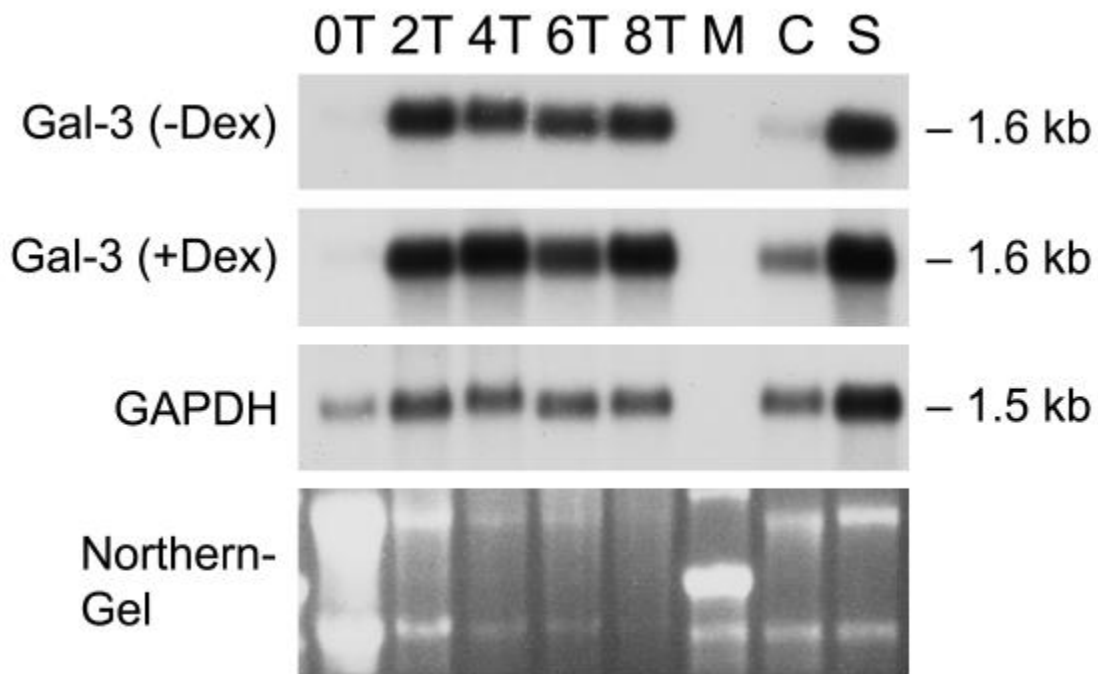


Abb.8: Northern Hybridisierung von RNS aus Ratten-Brustgeweben mit einer Galectin-3 Sonde. Die Gewebe wurden Tieren, die entweder mit Dexamethason behandelt wurden (+Dex), oder nicht behandelt wurden (-Dex) entnommen. Poly (A+) RNS von Brustgeweben 0, 2, 4, 6 und 8 Tage nach Ende der Laktation wurden mit einer Probe für Galectin-3 (Gal-3 oder GAPDH hybridisiert. Als positive Kontrollen für diese Proben wurde poly (A+)-RNS von Rattenkolon (C) und Magen (S) benutzt. Alle Bahnen wurden mit 5µg beladen, außer der 0Tage-Bahnen, wo die Menge erhöht wurde, um bei der Ladekontrolle GAPDH ein Signal zu erhalten. Das ist nötig, da GAPDH während der Involution reguliert wird (Mengwasser & Sleeman, 1999). Das Gel zeigt die relativen Mengen, die geladen wurden (-Dex)-Gel. Für den Gal-3 (+Dex)-Northern Blot wurden equivalente Ergebnisse erzielt.

4.1.7 Analyse der Galectin-3 Proteinmengen in involutierenden Brustgeweben mittels „Western Blot“

Um einen vollständigen Überblick über die Galectin-3 Mengen in den unbehandelten und mit Dexamethason behandelten Brustgeweben zu erhalten, wurde zusätzlich die Proteinmenge von Galectin-3 durch eine „Western Blot“-Analyse untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb.9 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Galectin-3 Proteinmengen während der Involution stark ansteigen und zum Zeitpunkt 4-6 Tage nach der Laktation ihren Höhepunkt erreichen. Bei den mit Dexamethason behandelten Brustgeweben bleiben die Proteinmengen niedrig und steigen nur leicht bei 6 und 8 Tagen nach der Laktation an.

Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Immunhistochemie. Es scheint, dass Galectin-3 zusätzlich zur transkriptionellen Kontrolle einer post-transkriptionellen Kontrolle unterliegt.

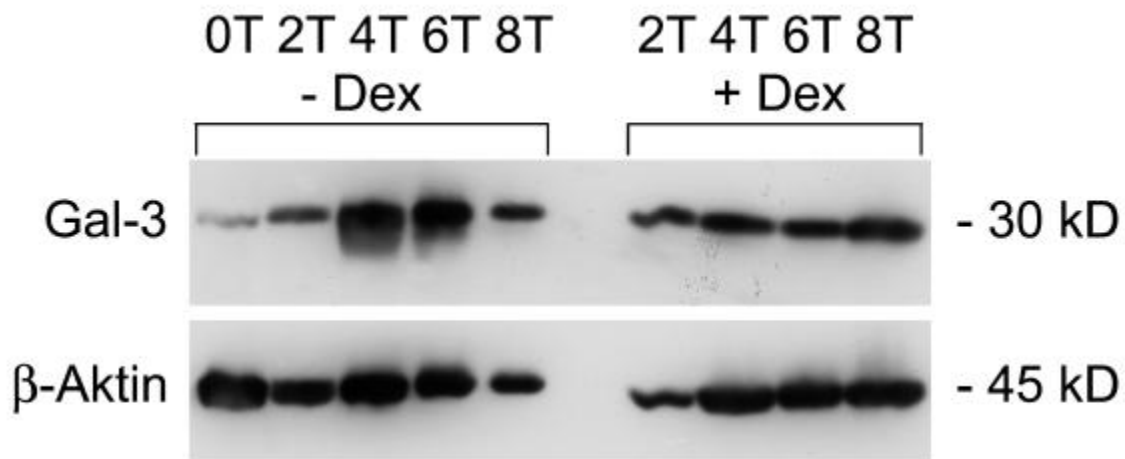


Abb.9: Western-Blot-Analyse der Galectin-3 Expression während der Involution des Brustgewebes. Das Gewebe, das benutzt wurde um die Protein-Lösung herzustellen, kam von Tieren, die entweder mit Dexamethason behandelt (+Dex) oder nicht behandelt (-Dex) wurden. Die Protein-Lösung von Brustgeweben entnommen 0, 2, 4, 6 und 8 Tage nach Ende der Laktation wurde auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einem Western Blot unterzogen. Die Membranen wurden zuerst mit einem Galectin-3 Ak. getestet, dann gestriipt und anschließend mit einem β -Aktin-Ak. getestet. Die Größe wurde im Vergleich mit einem Protein-Molekulargewichtsmarker ermittelt.

4.1.8 Analyse der Brustgewebe von Galectin-3 „Knockout“-Mäusen im Vergleich zu normalen Mäusen

Da Galectin-3 im involutierenden Brustgewebe stark exprimiert wird und dies unter hormoneller Kontrolle steht, stellte sich die Frage, welche Auswirkungen die komplette Unterbindung der Galectin-3 Expression auf das Brustgewebe und die Involution haben könnte. Es gibt schon mehrere etablierte Mauslinien, in denen das Galectin-3 Gen gezielt ausgeschaltet ist (Poirier & Robertson, 1993; Colnot et al, 1998; Hsu et al., 2000). Durch zwei Kollaborationen war es uns möglich, zum einen involutierende Brustgewebe von Galectin-3 Nullmutanten (freundl. Gabe von Prof. F.T. Liu) für immunhistochemische Analysen, und zum anderen Gal-3 (-/-) - Mäuse für die Zucht (freundl. Gabe von Fr. Prof. Poirier) und anschließende Analyse der Brustgewebe zu erhalten.

Von den involutierenden Brustgeweben der Galectin-3 Nullmutanten und den entsprechenden Brustgeweben von normalen Mäusen mit dem gleichen genetischen Hintergrund wurden Paraffin-Schnitte angefertigt und die Schnitte dann mit Eosin und Hämatoxylin angefärbt. Anschliessend untersuchte ich die Gewebeschnitte unter dem Mikroskop auf morphologische Unterschiede hin. Wie sich bei der Analyse zeigte, konnten keine offensichtlichen Unterschiede im Zeitraum des Involutionsprozesses festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Galectin-3 Nullmutanten-Mäuse wurden in unserem Tierhaus weiter gezüchtet und ich entnahm weiblichen Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten das inguinale Brustgewebe um eine Organ-Färbung mit Karmin durchzuführen. Da ich bei den involutierenden Brustgeweben von Galectin-3-Nullmutanten keine Veränderungen zu denen von normalen Mäusen feststellen konnte, untersuchte ich diesmal Brustgewebe zu verschiedenen Zeitpunkten der Pubertät und Brustgewebe direkt nach dem Beginn der Laktation. Ebenso entnahm ich Kontrollmäusen mit dem gleichen genetischen Hintergrund die Brustgewebe zum gleichen Zeitpunkt, um eine Färbung durchzuführen. Wie sich nach den Versuchen herausstellte, konnte ich keine offensichtlichen Unterschiede in der Morphologie der Brustgewebe von Galectin-3 Nullmutante und den Kontrollmäusen feststellen, wie in der Abb.10 beispielhaft dargestellt ist.

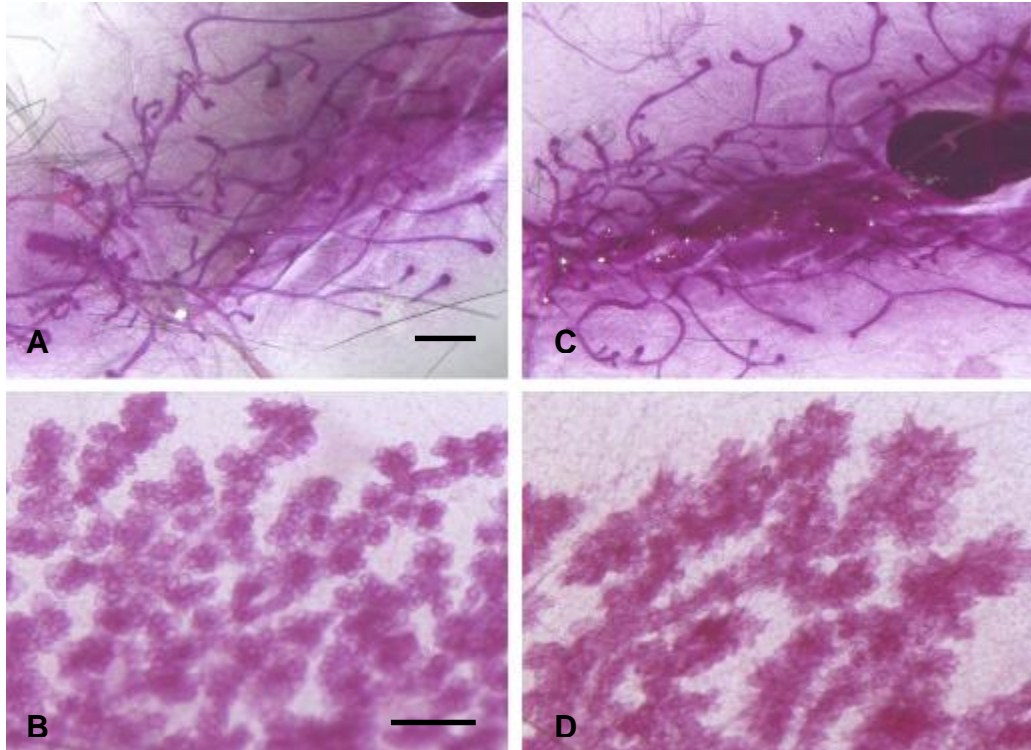


Abb.10: Karminfärbung von ganzen Maus-Brustgeweben aus Galectin-3 Nullmutanten (A, B) und Wildtyp-Mäusen (C, D).

Die Gewebe wurden 7 Wochen alten Mäusen (A, C) oder 1 Tag laktierenden (B, D) Mäusen entnommen. Die Gewebe wurden auf offensichtliche, morphologische Unterschiede untersucht.

Balken: 0.5mm (A, C), 200 μ m (B, D)

4.1.9 Galectin-3 Bindung an MT450-Zellen: Kann der M-N#1 Antikörper diese Bindung blockieren ?

Die Experimente in den Brustgeweben weisen darauf hin, dass Galectin-3 und M-N#1 in großem Maße koloaliesieren. Diese Beobachtung ist konsistent mit der Idee, dass M-N#1 als Ligand für Galectin-3 in Frage kommt. Um einen weiteren Hinweis darauf zu bekommen, wollte ich zum einen feststellen, ob Galectin-3 an MT450 Zellen, aus denen das M-N#1 Antigen isoliert worden ist, bindet und zum anderen, ob diese Bindung durch eine Präinkubation mit dem M-N#1 Antikörper unterbunden werden kann und somit z.B. die wachstumsfördernden Eigenschaften von Galectin-3 inhibiert.

Die Bindung von biotinyliertem Galectin-3 Protein (freundl. Gabe von Prof. Gabius) wurde mittels eines Zell-ELISA untersucht. Wie aus der unten aufgeführten Tabelle ersichtlich ist, erfolgt eine konzentrationsabhängige Bindung von Galectin-3 Protein an MT450 Zellen mit einer Sättigung bei etwa 0,5µg/ml (Abb.12). Nun wurden in einem zweiten Versuch die MT450 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des M-N#1 Antikörpers präinkubiert und anschliessend mit der zuvor ermittelten optimalen Konzentration an biotinyliertem Galectin-3 inkubiert. Die Abb.12 zeigt, dass die Galectin-3 Bindung an MT450 Zellen nicht durch den M-N#1 Antikörper blockiert werden kann.

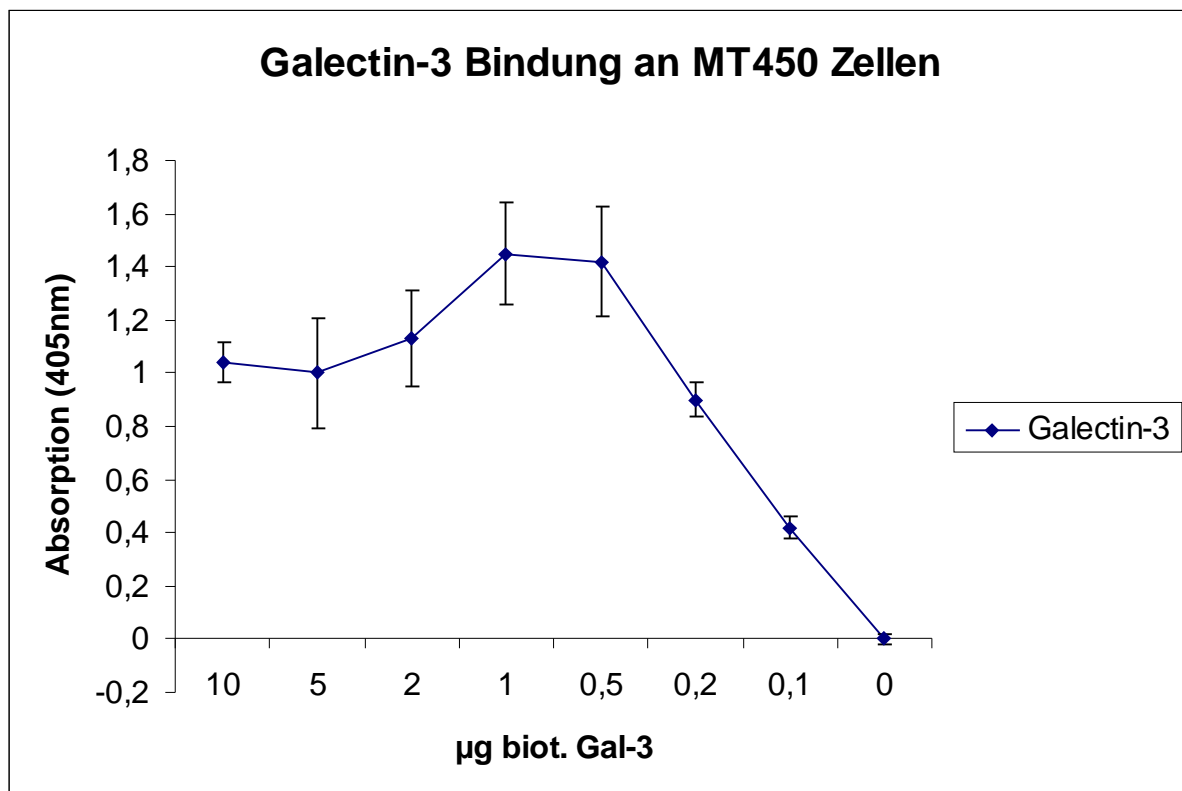


Abb.11: Bindung von biotinyliertem Galectin-3 an MT450 Zellen

In einem Zell-ELISA wurden verschiedene Mengen an biotinyliertem Galectin-3 Protein auf MT450 Zellen inkubiert. Die Y-Achse zeigt die Mittelwerte und Standardfehler der Absorption der ABTS-Reaktion bei 405 nm an. Auf der X-Achse sind die Mengen an biotinyliertem Galectin-3 aufgetragen

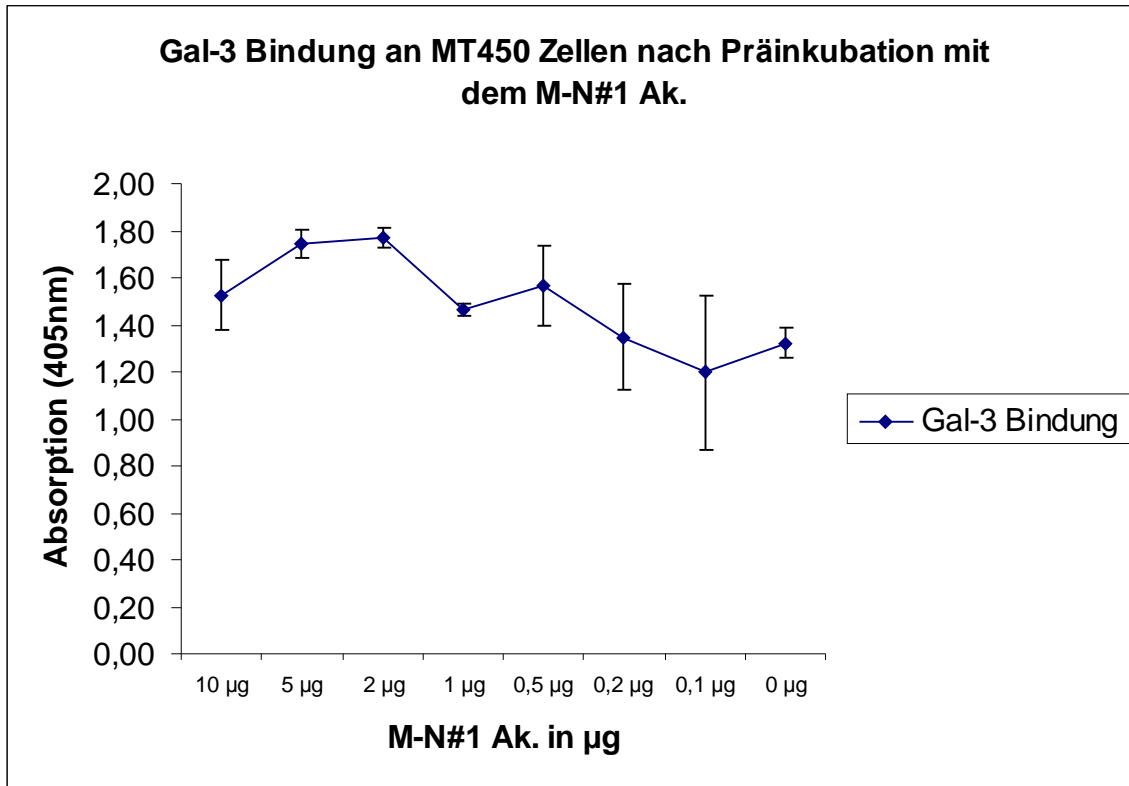


Abb.11: Bindung von biotinyliertem Galectin-3 an MT450 Zellen, die mit verschiedenen Mengen an M-N#1-Ak. präinkubiert wurden

In einem Zell-ELISA wurden zuerst verschiedene Mengen an M-N#1-Ak. auf MT450 Zellen inkubiert. Es wurde mit 0,5 μg biotinyliertem Galectin-3 inkubiert. Die Y-Achse zeigt die Mittelwerte und Standardfehler der Absorption nach ABTS-Reaktion bei 405 nm. Auf der X-Achse sind die Mengen an M-N#1.Ak. aufgetragen, die zur Präinkubation benutzt wurden.

4.2 Diskussion der Galectin-3 Ergebnisse

Ich habe hier gezeigt, dass Galectin-3 während der Involution nach dem Ende des Säugens stark hochreguliert ist. Obwohl der Anstieg der Expression während der ersten Phase der Involution beginnt, findet der hauptsächlichste Anstieg der Expression während der zweiten Phase statt. Dies wird noch von der Tatsache unterstützt, dass Dexamethason, ein Glukokortikoid Hormon, das den Beginn der zweiten Phase der Involution unterdrückt, die Galectin-3 Expression stark suprimiert. Diese Daten weisen auf eine mögliche Funktion von Galectin-3 während der zweiten Phase der Involution, welche im Gegensatz zur ersten Phase durch Gewebeumgestaltung charakterisiert ist (Li et al., 1997). Galectin-3 hat eine Reihe von Eigenschaften, die zur Gewebeumgestaltung beisteuern könnten, wie die Regulation von Zelladhäsion und Motilität, die Unterdrückung der Apoptose und die Förderung von Zellwachstum und Invasion. Darüberhinaus wurde für Galectin-3 gezeigt, dass es die Morphogenese der Verzweigung der Harnleiterknospe / des Sammelkanals in der embryonalen Niere moduliert (Bullock et al, 2001), und es ist zu notieren, dass diese Morphogenese der Verzweigung viele Ähnlichkeiten mit der Gewebeumgestaltung der Brustgewebe nach der Laktation aufweist. Welche der Eigenschaften von Galectin-3 könnte für die Gewebeumgestaltung verantwortlich sein? Wie gezeigt, konnte ich Galectin-3 Expression fast ausschliesslich auf nicht-apoptotischen Zellen nachweisen. Sieht man dies im Zusammenhang mit der Gewebeumgestaltung, könnte Galectin-3 die Induktion der Apoptose unterdrücken. Zusätzlich inhibiert Dexamethasone die Gewebeumgestaltung, aber nicht die Apoptose in sich rückbildenden Brustgeweben (Lund et al., 1996; Li et al, 1997; Mengwasser & Sleeman, 2001; Mengwasser et al., 2002 in Druck) und unterdrückt die Galectin-3 Expression (Abb.7, Abb.9, Tabelle 2). Wenn Galectin-3 die Apoptose im involutierenden Brustgewebe unterdrücken soll, wäre eine mögliche Prognose, dass eine Dexamethason Behandlung in einer erhöhten Apoptoserate resultieren würde. Ich stellte fest, dass die Dexamethason Behandlung nur einen schwachen Anstieg der Apoptoserate im involutierenden Brustgewebe auslöst (Tabelle 2).

Es ist aber auch gleichwohl möglich, dass andere Eigenschaften von Galectin-3 als die Unterdrückung der Apoptose oder zusätzlich zur Unterdrückung der Apoptose für die Gewebeumbildung verantwortlich sind.

Wenn Galectin-3 eine Rolle bei der Umgestaltung der Brustgewebe spielen soll, erwartet man eine gestörte Gewebeumbildung in Mäusen, die eine gezielte Deletion des Galectin-3 Gens aufweisen. Ich untersuchte histologisch die involutierenden Brustgewebe von Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu Brustgeweben von Galectin-3 Knockout-Mäusen (Hsu et al., 2000), aber ich konnte keine morphologische oder kinetische Unterschiede in Involutionsprozess feststellen (Daten nicht gezeigt). Es ist aber wichtig festzustellen, dass es viele Mitglieder der Galectin-Genfamilie gibt und es ist sehr wahrscheinlich, dass vielleicht andere Mitglieder das Fehlen von Galectin-3 in den Knockout-Mäusen kompensieren können. Um diese Fragestellung zu lösen, wäre es wichtig, konditionelle Knockout-Techniken zu benutzen, um die Rolle von Galectin-3 in involutierenden Brustgeweben zu untersuchen.

Eine unerwartete Beobachtung in dieser Arbeit war die Tatsache, dass die Galectin-3 Proteinmengen und die Galectin-3 mRNA Mengen unterschiedlich reguliert sind. Dies deutet darauf hin, dass Galectin-3 sowohl transkriptional als auch post-transkriptional reguliert wird. Das Glukokortikoid-Hormon Dexamethasone scheint post-transkriptionell auf Galectin-3 zu wirken, da keine Unterschiede in den Galectin-3 mRNA Mengen von Dexamethason-behandelten und -unbehandelten Geweben festzustellen war (Abb.8). Dies würde nahelegen, dass Dexamethason indirekt agiert, indem es möglicherweise die Galectin-3 Translation oder die Proteinstabilität beeinflusst. Solch ein Szenario ist nicht ohne Beispiel. So blockiert Dexamethason den IL-4 induzierten Anstieg von IL-4R α Protein auf T- und B-Zellen, ohne die IL-4R α mRNA-Mengen zu verändern (Mozo et al., 1998). Glukokortikoide sind bekannt dafür die Proteinsynthese negativ zu modulieren, teilweise durch die Inhibierung der funktionellen eIF4F-Holokomplex-Bildung, die für die Translationsinizierung benötigt wird (Shah et al., 2000a, b) und durch die Verminderung der Aktivierung der ribosomalen S6-Kinase (Shah et al., 2000b, c), deren Rolle ist, bevorzugt diejenigen mRNA zu selektieren, die ein cis-agierendes, terminales Oligopyrimidine (5'-TOP)-Motiv für die Translation aufweisen. Zusätzlich können Glukokortikoide die Proteasom- und Kalzium-abhängige Proteolyse stimulieren (Wang et al., 1998; Thompson et al., 1999).

Wenn die Vermutung, dass Galectin-3 eine Rolle in der Gewebeumgestaltung spielt, richtig ist, dann ist die Unterdrückung der Galectin-3 Protein Expression durch systemische Glukokortikoidhormone während der ersten Phase der Involution (trotz der hohen mRNS-Mengen zu diesem Zeitpunkt) vielleicht wichtig, um sicherzustellen, dass keine Gewebeumgestaltung während der ersten, reversiblen Phase der Involution stattfindet.

Die anfängliche Motivation, die Galectin-3 Expression in involutierenden Brustgeweben zu analysieren, war die Galectin-3 Expression mit der M-N#1-Antigen Expression zu vergleichen, um festzustellen, ob dieses Kohlenhydrat-Antigen ein Ligand für Galectin-3 während der Involution sein könnte. Es sollte hierbei mehr über die normale Funktion des M-N#1 Antigens herausgefunden werden, die dann Rückschlüsse auf die Funktion des Antigens in der Krebszelle zulassen. Wie M-N#1 ist auch Galectin-3 während der Involution stark hochreguliert, und es ist faktisch nie auf apoptotischen Zellen exprimiert. M-N#1 und Galectin-3 zeigen zusätzlich eine Kolo-kalisation (Tabelle 1). Somit sind Galectin-3 und M-N#1 räumlich und zeitlich ähnlich exprimiert. Daraus folgt, dass M-N#1 ein Ligand für Galectin-3 sein könnte. Dennoch ist die Kolo-kalisation von Galectin-3 und M-N#1 in keinem Falle vollständig. Zusätzlich wird M-N#1 nicht durch Glukokortikoid-Hormone reguliert (Mengwasser & Sleeman, 2001).

Um einen weiteren Hinweis zu erhalten, ob Galectin-3 an das M-N#1-Antigen bindet, wurde von mir untersucht, ob eine Präinkubation von MT450 Zellen mit dem M-N#1 Antikörper die Bindung von Galectin-3 an MT450 Zellen beeinflussen kann. Es könnte eine Erklärung dafür sein, dass der M-N#1 Antikörper das Tumorwachstum in Ratten blockiert, indem er verhindert, dass Galectin-3 an das M-N#1 Antigen bindet und seine Funktion ausüben kann.

Ich stellte fest, dass eine Präinkubation mit dem M-N#1-Antikörper die Bindung von Galectin-3 an MT450 Zellen nicht unterbinden kann, was aber nicht bedeuten muss, dass die Bindung an das M-N#1-Antigen nicht unterbunden wurde. Denn es ist möglich, dass das M-N#1-Antigen nicht der einzige Ligand für Galectin-3 auf den MT450 Zellen darstellt, da Galectin-3 zwar eine Spezifität für die Bindung an Galaktosereste hat, es aber auch andere Galaktosereste an anderen Kohlenhydrat-Antigenen geben kann, die nicht vom M-N#1-Antikörper erkannt werden.

Es kann natürlich auch sein, das Galectin-3 trotz des Antikörpers an das Antigen bindet und dass der Mechanismus der Blockierung des Tumorwachstums durch den Antikörper gar nichts mit dem Galectin-3 Protein zu tun hat.

Welche Möglichkeiten gibt es noch, um eine Interaktion zwischen Galectin-3 und dem M-N#1-Antigen nachzuweisen? Da die Struktur des M-N#1-Antigens schon teilweise aufgeklärt ist (Sleeman et al., 1999), könnte man es biochemisch synthetisieren und dann testen, ob Galectin-3 dieses synthetische Antigen bindet. Diese Tests sind schon für einige Blutgruppenantigene durchgeführt worden (Feizi et al., 1994). Dies würde aber nicht klären, ob diese Bindung auf zellulärer Ebene oder *in vivo* auch stattfindet, da das Antigen dort nicht isoliert vorkommt.

Die Familie der Galectine umfasst inzwischen mehr als 10 Mitglieder, über deren Funktion teilweise noch sehr wenig bekannt ist (Hughes, 1997, 2001; Bidon et al., 2001). M-N#1 könnte demnach auch der Ligand für ein anderes Galectin sein, da alle Galectine eine Spezifität für Galaktosereste haben. Es wäre also wichtig, die bereits unternommenen Versuche mit anderen Galectinen zu wiederholen. So könnte der M-N#1 Antikörper andere Galectine daran hindern an die MT450 Zellen zu binden, und der Effekt auf das Tumorwachstum könnte so vermittelt werden.

Weiterhin sollte man versuchen, das Protein, an dem das M-N#1-Antigen gebunden ist, zu isolieren, um so noch mehr über die Funktion des M-N#1-Antigens aufzuklären.

4.3 Subtraktive Immunisierung

Wenn eine Tumorzelle metastasierend wird, müssen eine ganze Reihe von Veränderungen stattfinden. Sie muss die Produktion von verschiedenen Proteinen einstellen und von anderen starten, um die verschiedenen Schritte vom Loslösen von Tumor, dem Durchbrechen der ECM über das Umgehen von Apoptose-Signalen und der entstehenden Immunantwort in den Gefäßsystemen, bis hin zur Extravasierung in das Zielgewebe mit anschließender erneuter Proliferation, zu vollziehen. Auch auf der Zelloberfläche, die für die meisten dieser Schritte als Kontaktfläche wichtig ist, müssen sich diese Veränderungen manifestieren. Diese Veränderungen zu identifizieren und zu studieren, ist das Ziel des folgenden Abschnitts. Solche Antigene können in der Grundlagenforschung dazu dienen mehr Informationen über die Grundlagen von Krebserkrankungen und dem Prozess der Metastasierung zu erhalten. Weiterhin können solche Antigene auch als Quelle für Werkzeuge in der Diagnose und Therapie darstellen. Es sollten Antigene gefunden werden, die entweder nur auf der nichtmetastasierenden Zelllinie exprimiert werden oder solche, die nur auf der metastasierenden Zelllinie vorhanden sind. Wir wählten die Methode der subtraktiven Immunisierung für dieses Unterfangen, da sie den Vorteil bietet, mit den gefundenen Antikörpern direkt ein Werkzeug in der Hand zu haben, um funktionelle Analysen durchzuführen. Zudem ist das vorher beschriebene M-N#1 Antigen ein effektives Beispiel dafür, dass mit dieser Methode tumorrelevante Antigene gefunden werden können. Aber wir denken, dass noch andere, neue Antigene zu finden sind.

Die Zelllinien die wir auswählten sind Rattentumor-Zelllinien. Der eine Vorteil besteht darin, dass es Zelllinien aus einem Zellsystem gibt, die unterschiedliche Metastasierungseigenschaften besitzen, dass die gefunden Unterschiede nicht daher rühren, dass die Zellen einen unterschiedlichen Ursprung haben. Der zweite Vorteil ist der, dass Rattentumorzellen, genau wie beim Menschen, vorwiegend über das Lymphsystem metastasieren, im Unterschied zu Mauskrebszellen, die vorwiegend über das Blutsystem metastasieren. Der dritte Vorteil ist, dass Tumorexperimente durchgeführt werden können, die mit menschlichen Zelllinien nur in Nacktmäusen möglich wären.

4.3.1 Subtraktive Immunisierung mit Zelllinien des BSP73 Rattenpankreas-Zellsystems

Für die erste subtraktive Immunisierung wurden zwei Klone des BSP73 Rattenpankreaskarzinom-Systems (Matzku et al., 1983) benutzt. Zum einen die 1AS Zelllinie, die nichtmetastasierend ist und zum zweiten ein Abkömmling dieser Zelllinie, genannt 1AS Ln2Ln2Ln, die von Dr. Sleeman durch mehrfaches Passagieren in Ratten und Isolation aus spontan entstehenden Metastasen, generiert worden ist.

Die subtraktive Immunisierung erfolgte reziprok mit beiden Zelllinien, wie in 3.6.6 beschrieben. Die Überprüfung des Serums nach der Immunisierung ergab eine höhere Reaktivität auf den immunogenen Zellen als das Serum nach Injektion der tolerogenen Zelllinie. Somit war die subtraktive Immunisierung erfolgreich (Abb.13). Nach erfolgreicher Hybridoma-Bildung wurden die Antikörper mittels eines Zell-ELISA (s. 3.5.10) auf den beiden Zelllinien getestet. Die Hybridomabildung wurde von mir zweimal mit insgesamt 4 verschiedenen Mäusen pro Ansatz durchgeführt. Leider erwies sich bei beiden keiner der produzierten Antikörper als spezifisch für nur eine der beiden Zelllinien.

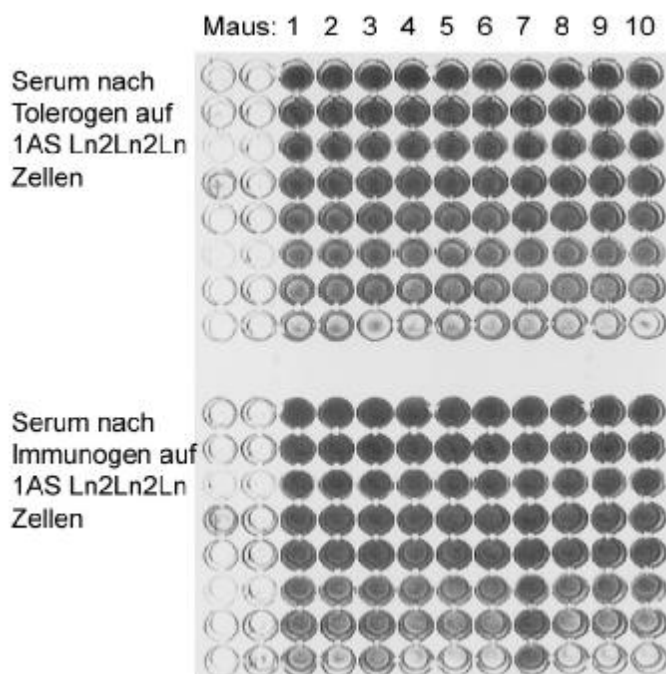


Abb.13: Serumtest mittels Zell-ELISA auf 1AS Ln2Ln2Ln-Zellen, ob die Immunisierung erfolgreich war.

Oben: Serum entnommen aus den Mäusen (1-10) nach Tolerogen-Injektion (1AS). Eine Verdünnungsreihe wurde von den Seren von oben nach unten angelegt (jeweils 1:1)

Unten: Serum entnommen aus den Mäusen (1-10) nach Abschluss der Immunisierung mit der immunogenen Zelllinie (1AS Ln2Ln2Ln). Erneut wurde eine Verdünnungsreihe von oben nach unten angelegt (1:1)

4.3.2 Subtraktive Immunisierung mit Zelllinien des Dunning Rattenprostatakarzinom-Systems

Etwa zur gleichen Zeit wurde von mir der Versuch gemacht, mittels zweier Zelllinien des Dunning Rattenprostatakarzinom-Systems (Voigt & Dunning, 1974), durch die Methode der subtraktiven Immunisierung Epitope zu finden, die nur auf einer der beiden Zelllinien exprimiert sind. Dazu wurden aus diesem System die G-Zelllinie (nichtmetastasierend) und die AT6.1 Zelllinie (stark metastasierend) ausgewählt, was auch in der Tab.3 deutlich wird, in der das Metastasierungsverhalten der verschiedenen Dunning-Zelllinien getestet wurde.

Zelllinie	Primärtumor	Lymphknoten-Metastasen	Lungen-Metastasen
G	8/8	-	-
AT 6.1	9/9	6/9	9/9
AT 1	8/8	2/8	6/8
AT 2	8/8	1/8	8/8
AT 3.1	8/8	1/8	7/8
MatLu	8/8	2/8	7/8
Matlylu	8/8	4/8	6/8

Tabelle 3: Metastasierungsverhalten der Zelllinien des Dunning Ratten Prostatakarzinom-Systems. Die Ratten wurden bei Erreichen der Maximalgröße des Tumors getötet Als Metastase wurde gewertet: > 5mm bei Lymphknoten, > 1mm in der Lunge. (-):keine Metastasen, z.B. 2/8: 2 von insgesamt 8 Ratten zeigten Metastasen

Erneut erfolgte die subtraktive Immunisierung reziprok mit beiden Zelllinien. Die subtraktive Immunisierung verlief erfolgreich, wie das Testen der Seren auf den AT6.1 Zelllinie mittels ELISA verdeutlicht (Abb.14). Nach Beendigung der Tests der Antikörper durch den Zell-ELISA, hoben sich zwei Antikörper heraus, die spezifisch an die stark metastasierende Zelllinie AT6.1 binden. Diese Antikörper, bezeichnet mit AT-G.1 und AT-G.2, wurden für die weiteren Versuche benutzt. In der Abbildung 15 sieht man AT 6.1 Zellen und G Zellen, die einer IF mit dem AT-G.1 Antikörper unterzogen wurden.

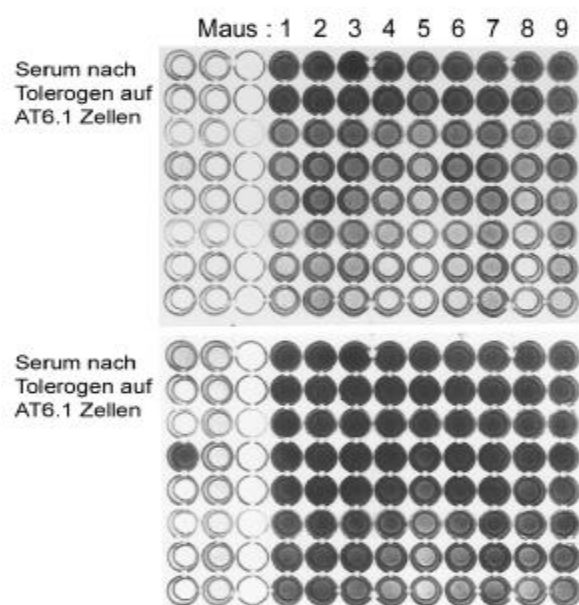


Abb.14: Serumtest mittels Zell-ELISA auf AT6.1-Zellen, ob die Immunisierung erfolgreich war.

Oben: Serum entnommen aus den Mäusen (1-10) nach Tolerogen-Injektion (G-Zellen). Eine Verdünnungsreihe wurde von den Seren von oben nach unten angelegt (jeweils 1:1)

Unten: Serum entnommen aus den Mäusen (1-10) nach Abschluss der Immunisierung mit der immunogenen Zelllinie (AT6.1). Erneut wurde eine Verdünnungsreihe von oben nach unten angelegt (1:1)

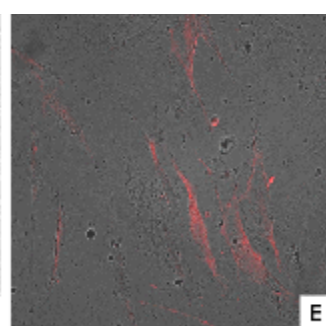
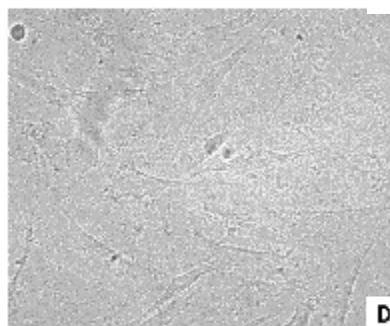
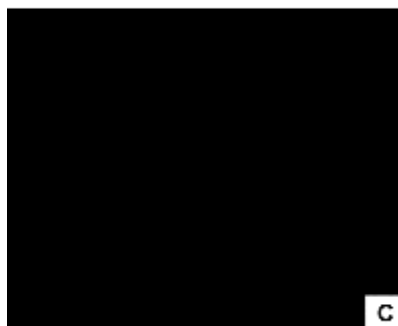
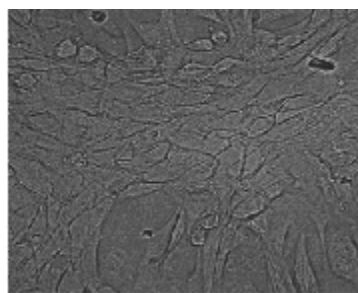
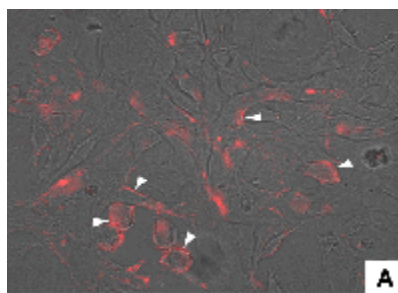


Abb.15 : Immunfluoreszenz mit AT-G.1 Ak. auf AT6.1 und G Zellen:

A: AT6.1 mit AT-G.1 Ak.

B: AT-G.1 ohne Erst-Ak.

C: G mit AT-G.1 Ak.

D: Durchlichtbild des gleichen Areals wie in C

E: G mit CD44 Ak. (pos. Kontr.)

Balken: 50µm

4.3.3 Tumorzellinjektion und Antikörperbehandlung in Copenhagen-Ratten

Da die gefundenen Antikörper spezifisch an die AT6.1 Zelllinie binden, war die nächste Fragestellung, welchen Einfluss eine Antikörperbehandlung in vivo auf das Tumorstadium von AT6.1 Zellen hat. Für diese Experimente wurden Copenhagen-Ratten, aus denen die Ursprungszelllinie G isoliert worden war, mit 2×10^6 Zellen der AT6.1 Linie gespritzt und anschliessend und für weitere vier Wochen zweimal pro Woche mit jeweils $200 \mu\text{g}$ pro Tier AT-G.1, AT-G.2 und 1B7-Kontrollantikörper behandelt. Sobald ein Tumor wuchs, wurden für die restliche Dauer des Experiments die Dimensionen des Tumors gemessen und festgehalten. Wie aus dem folgenden Graph (Abb.16) ersichtlich ist, konnte die Behandlung, mit den Antikörpern aus der subtraktiven Immunisierung, das Tumorstadium, im Vergleich zur Behandlung mit einem Kontrollantikörper, um etwa $2/3$ verringern. Aus den Daten dieses Experiments ging auch hervor, dass die Ratten signifikant später die maximal erlaubte Grösse des Tumors erreichten und somit ihr Überleben durch die Behandlung verlängert wurde (Abb.17). Bei der Analyse des Metastasierungsverhalten wurden bei diesem Experiment keine auffälligen Unterschiede festgestellt.

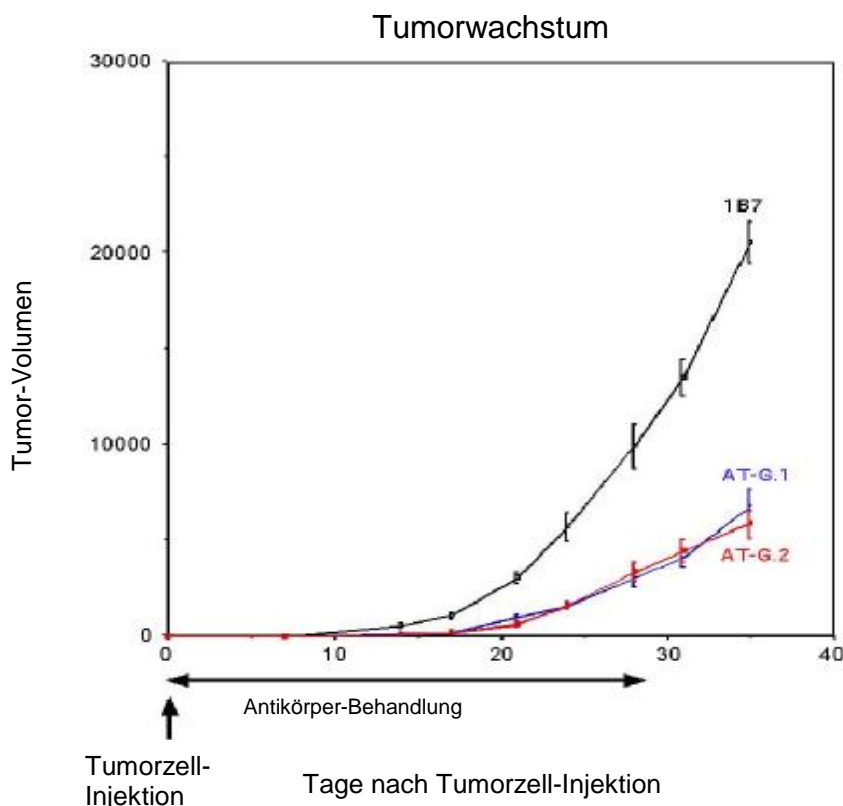


Abb.16: Tumorstadium von AT6.1 Tumoren in Copenhagen Ratten

AT-G.1: behandelt mit dem AT-G.1 Ak.

AT-G.2: behandelt mit dem AT-G.2 Ak.

1B7: behandelt mit dem 1B7 Ak. Tumorstadium in mm³

Die Tiere wurden zweimal pro Woche mit je $200 \mu\text{g}$ Ak. pro Tier behandelt. Die 1B7-Ak. dienten dabei als Kontrolle

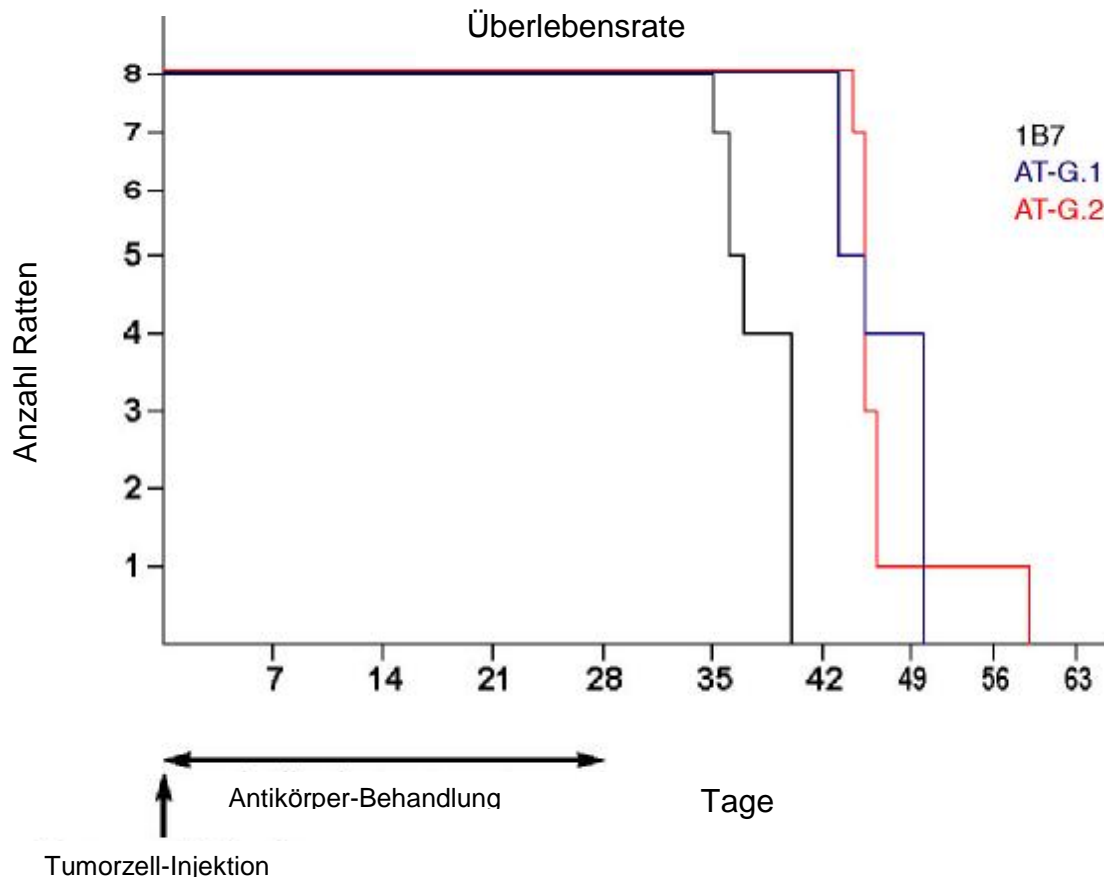


Abb.17: Überlebensrate nach Tumorzellinjektion mit unterschiedlicher Antikörperbehandlung
 AT-G.1, AT-G.2, 1B7: Behandlung mit dem jeweiligen Ak. Ratten wurden jeweils getötet, wenn das Limit der erlaubten TumorgroÙe in einer Dimension erreicht war (max. 50mm). Das ist die Auswertung der Überlebensrate des Experiments in Abb16. Pro Antikörper wurden acht Tiere benutzt.

Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass nicht die Bindung des Antikörpers an sein Antigen sondern eine Komplement-Aktivierung des Antikörpers oder eine antikörperabhängige Zell-Zytotoxizität für den festgestellten Effekt verantwortlich ist, wurde das Experiment mit $F(ab')_2$ -Fragmenten der entsprechenden Antikörper wiederholt. Diese $F(ab')_2$ -Fragmente können zwar noch das Antigen binden, sind aber nicht in der Lage, das Komplement-System zu aktivieren. Darüberhinaus wurde eine weitere Gruppe Ratten nur mit PBS behandelt, um festzustellen, ob der Kontrollantikörper wirklich keinen Effekt auf das Tumorwachstum hat. Zusätzlich wurde eine Gruppe Ratten noch mit dem kompletten AT-G.1 Antikörper behandelt, um Unterschiede im Tumorwachstum im Vergleich zu den $F(ab')_2$ -Fragmenten feststellen zu können.

Nachdem die $F(ab')_2$ -Fragmente der Antikörper von mir hergestellt und isoliert wurden (s. 3.5.5), injizierte ich erneut je 2×10^6 AT6.1 Zellen in die Tiere und behandelte sie, wie oben beschrieben, mit den verschiedenen Antikörpern und Antikörperfragmenten oder nur mit 200 μ l PBS. Im folgenden Graph sind die Ergebnisse erfasst. Das Tumorwachstum der Kontrollgruppen (PBS behandelt oder 1B7 behandelt) ist in etwa gleich stark. Die beiden von mir gefundenen Antikörper vermindern ebenfalls als $F(ab')_2$ -Fragmente das Tumorwachstum um etwa 2/3, was beweist, dass nicht die Komplementaktivierung für das geringere Tumorwachstum verantwortlich ist. Der komplette Antikörper vermindert in diesem Experiment das Tumorwachstum sogar noch stärker als in dem vorangegangenen Experiment, hier um etwa 4/5 gegenüber den Kontrollgruppen.

Die Überlebensrate entspricht in etwa der des vorangegangenen Experiments. Auffällig bei der Betrachtung des Metastasierungsverhalten der Tumorzellen ist hierbei, dass zwar viele der Ratten, die mit den Antikörpern aus der subtraktiven Immunisierung behandelt worden sind, Lungenmetastasen haben, aber es kaum Lymphknotenmetastasen gibt, oder wenn, dann sind diese sehr klein.

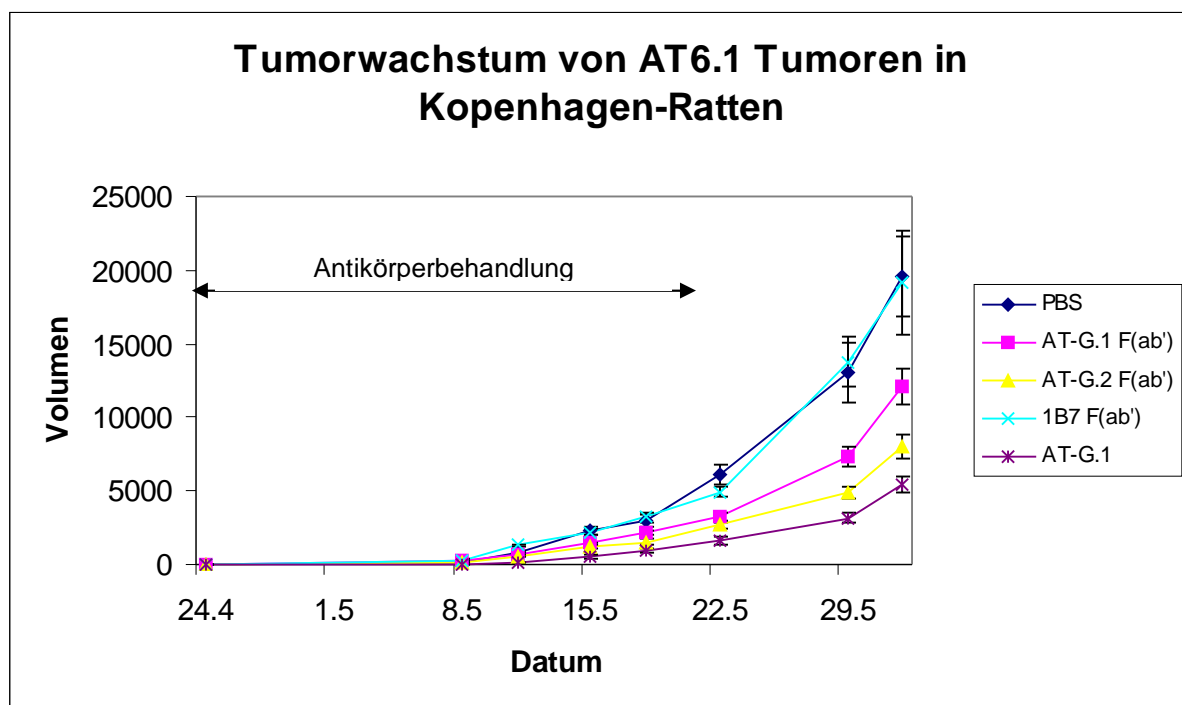


Abb.18: Tumorwachstum von AT6.1 Tumoren in Kopenhagen Ratten. Behandlungszeiten und Behandlungsmengen sind die gleichen, wie in 3.x.x, nur bei den Antikörper-F(ab')₂-Fragmente wurden 100 μ g pro Tier injiziert. Bei der Gruppe mit PBS wurden 200 μ l PBS pro Tier injiziert.

Tumorvolumen in mm³

4.3.4 Expression der Antigene auf anderen Tumorzellen

Es ist natürlich eine wichtige Frage, im Bezug auf die Relevanz des Antigens im Bereich Tumorprogression und Metastasierung, ob das Antigen auch auf anderen Tumorzellen zu finden ist. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Ratten- und menschliche Tumorzelllinien durch eine Immunfluoreszenz-Färbung oder FACS-Analyse auf das Vorhandensein des Antigens / der Antigene hin untersucht. Die Ergebnisse finden sich zusammengefasst in Tabelle 4. Es zeigte sich, dass die Antigene auch auf anderen Rattentumorzellen exprimiert sind.

Zelllinie	IF	FACS	Zelllinie	IF	FACS
AT 6.1	+	+	MTPa	-	-
G	-	-	MTLn2	-	-
AT-1	-	-	MTLn3	-	-
AT-2	-	-	MTLy	-	-
AT 3.1	+	+	DU 149	-	-
MatLu	-	-	PC 3	-	-
MatLuLy	+	+			
MTPa	-	-			
MTLn2	-	-			

Tab.4: Exprimierung des Antigens, das durch den AT-G.1-Antikörper gebunden wird, auf anderen Tumorzelllinien mittels FACS-Analyse oder Immunfluoreszenz (IF)

(+): Färbung in FACS oder IF, (-): keine Färbung

4.3.5 Expression der Antigene im normalen Rattengewebe

Um eine erste Idee zu bekommen, welche Identität hinter den von den Antikörper gebundenen Antigenen steckt oder welche mögliche Funktion sie haben, sind von mir die verschiedensten Gewebe aus Ratten isoliert worden. Nach der Prozessierung wurden die angefertigten Schnitte immunhistochemisch angefärbt. Die IHC wurde mit beiden Antikörpern separat durchgeführt. Die Intensität der Färbung war von Gewebe zu Gewebe unterschiedlich, die Lokalisation der Antigene aber immer die gleiche. Es wurden nur Färbungen im Bereich der Zelloberflächen oder der ECM gefunden. Nie wurde eine zytoplasmatische oder nukleäre Lokalisation festgestellt. Dies scheint die Identität der Antigene auf membrangebundene Proteine oder andere membrangebundene Moleküle zu reduzieren. Die genauen Ergebnisse stehen in Tab.5. und zur Unterstützung dieser Aussagen ist die Abb.19 beigelegt.

Gewebe	Färbung	Gewebe	Färbung
Gehirn	Meningis und Blutgefäße (++)	Ileum	Spitze der Villi (++)
Leber	Blutgefäße (+++) Gallengang (++)	Duodenum	Muskelschicht und Villi (+++)
Lunge	Bronchien (+++)	Cäcum	Krypten (++)
Milz	keine	Kolon	Muskelschicht (+++)
Pankreas	allg. (++) Blutgefäße (++)	Brustgewebe	Blutgefäße (++)
Testis	Kapsel (+++)	Haut	Um Haarfollikel (++)
Muskel	Um Muskelfasern (++)	Knochen+Mark	Blutgefäße (+)
Ovar	Allg. (++)	Prostata	Kanälchen (+++)
Uterus	Kapsel und Blutgefäße (++)	Thymus	Kapsel (++)

Vordermagen	Muskelschicht (+++)	Lymphknoten	Kapsel (++)
Magen	Muskelschicht (+++)	AT 6.1 Tumor	Äußere Zellschichten (+++)
Niere	Kapsel (+), Blutgefäße (++)		

Tab. 5: Immunhistochemische Färbung mit dem AT-G.1 Ak. auf verschiedenen Rattengeweben, +: schwache Färbung, ++: mittlere Färbung, +++: stark gefärbt

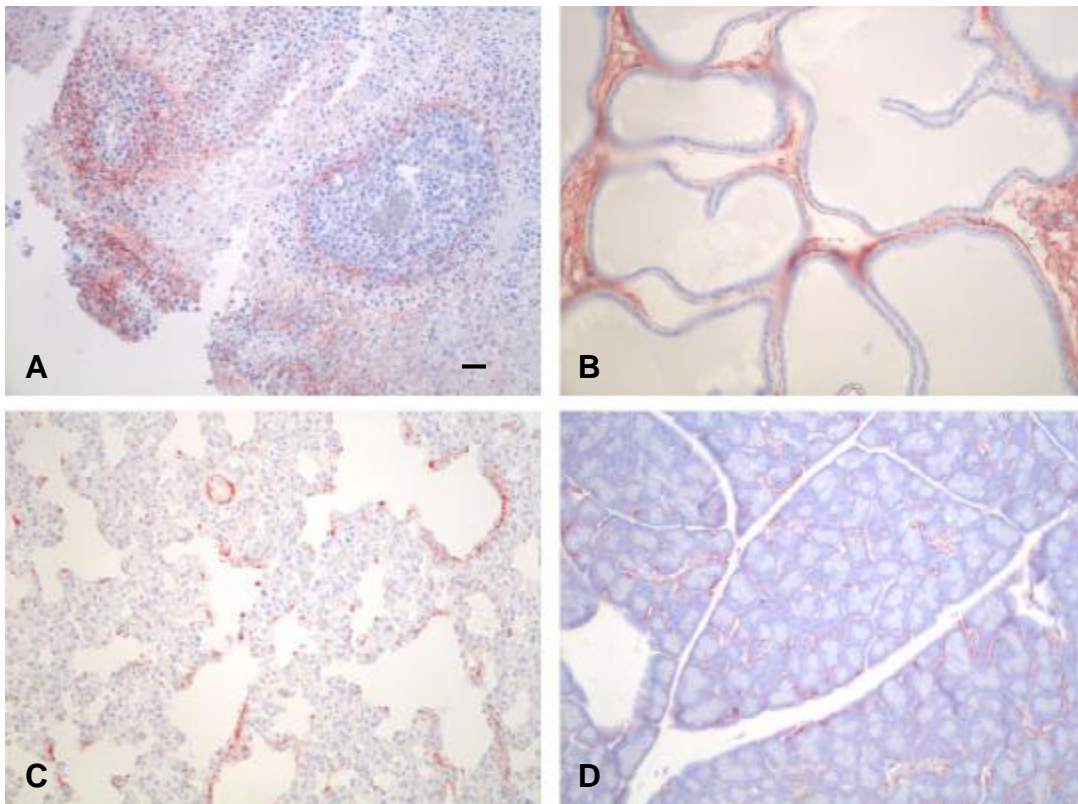


Abb. 19 : Immunhistochemische Färbung mit AT-G.1 Ak. (gefärbte Bereiche in rot) A: AT 6.1 Tumor, B: Prostata, C: Lunge , D: Pankreas, Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau), Balken: 50µm

4.3.6 Identifikation der Antigene: Immunpräzipitation (IP)

Nachdem die vorangegangenen Ergebnisse die gefundenen Antikörper, respektive Antigene, sehr interessant erscheinen lassen, war natürlich jetzt die Frage offen, worum es sich bei den Antigenen handelt. Um mehr über ihre Funktion zu erfahren, sollten sie identifiziert werden. Ein Ansatz zur Identifikation der Antigene ist die Immunpräzipitation. Bei der radioaktiven IP oder „hot IP“ werden die Zellen mit radioaktiv markiertem Methionin inkubiert, das dann in die Proteine eingebaut wird. Nachfolgend kann man die Proteine mittels der Antikörper aus einem Zelllysat präzipitieren. Dieses Präzipitat wird auf ein SDS-Proteingel geladen und nach dem Lauf wird das Signal verstärkt, das Gel getrocknet und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die so präzipitierten Proteine hinterlassen ein Bandenmuster auf dem Film, das dann ausgewertet werden kann. Dieser erste Versuch ergab vielversprechende Ergebnisse (Abb.20). Dieses Ergebniss konnte von mir nicht wiederholt werden. Man kann dies auch ohne Radioaktivität durchführen, dabei werden die präzipitierten Proteine mittels einer Silber- oder einer Coomassiefärbung im Gel sichtbar gemacht. Der Vorteil bei der zweiten Methode ist, dass man die so erhaltenen Proteinbanden ausschneiden und mittels einer Spektralanalyse untersuchen kann.

Von mir wurden beide Methoden angewandt, um die Antigene zu identifizieren. Wichtig dabei ist, dass man Kontrollen mitlaufen lassen muss, um keine falsch positiven Ergebnisse zu erhalten. Trotz mehrfachem Wiederholen des Versuchs mit biotinylierten Zellen zeigen die Ergebnisse keine Proteinbande auf, die nur in der AT6.1 Zelllinienprobe, die mit den Antikörpern AT-G.1 oder AT-G.2 präzipitiert wurden auftritt, und nicht entweder auch in der G – Zelllinienprobe oder in der AT6.1 – Probe, die mit einem Kontrollantikörper inkubiert wurde, zu sehen ist.

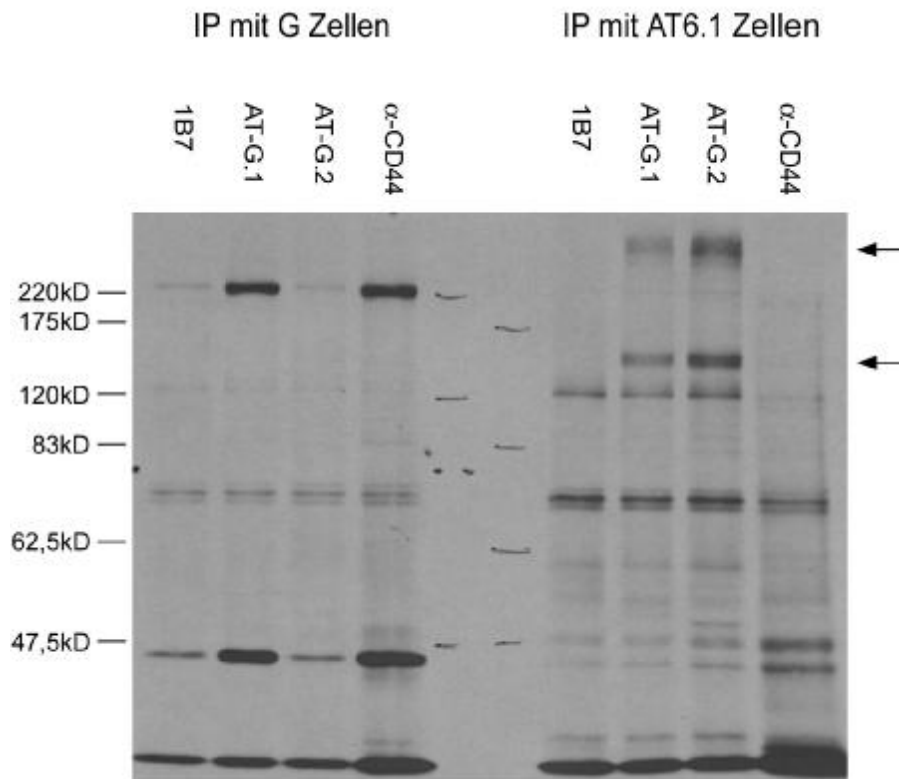
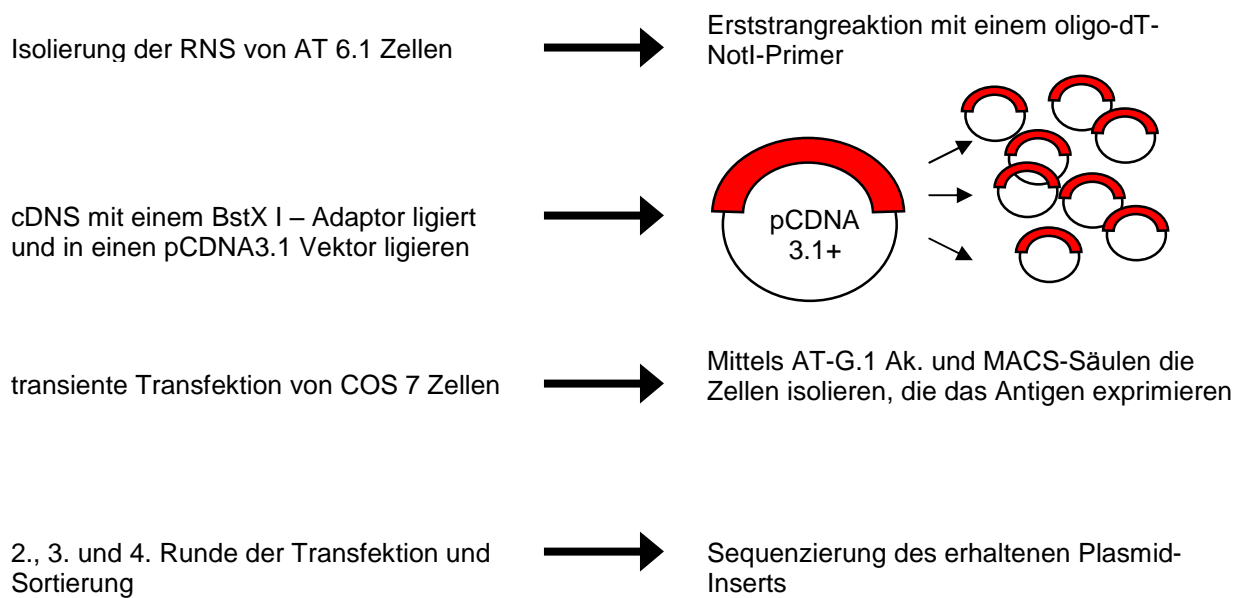


Abb.20: radioaktive Immunpräzipitation mit G (Spuren 1-4) und AT6.1-Zellen(Spuren 5-8). Die Zelllysate wurden mit dem AT-G.1 Ak. (2 und 6) oder mit dem AT-G.2 Ak. (3 und 8) inkubiert. Als Kontrolle wurden die Lysate mit dem 1B7 Ak. (1 und 5, neg. Kontrolle) oder CD44 Ak. (4 und 8, pos. Kontrolle) inkubiert. Nach dem Gellauf und dem Trocknen wurde ein Film aufgelegt. Die Banden, die nur in der AT6.1 Zelllinie zu finden sind, wurden mit Pfeilen markiert

4.3.7 Identifikation der Antigene über eine AT6.1 cDNS-Bibliothek

Da die IP's zu keinem Ergebnis geführt haben und auch die Fluoreszenzfärbung gezeigt hat, dass die Antigene nicht sehr stark auf den Zellen exprimiert sind, ist uns die Idee gekommen, durch mehrfaches transfizieren einer AT6.1 cDNS-Bibliothek in COS7-Zellen mit anschließender Sortierung der Antigen-exprimierenden Zellen mittels der Antikörper, das Signal so zu verstärken und das Antigen zu isolieren, um es dann zu identifizieren. Das folgende Schema soll verdeutlichen, wie ich vorgegangen bin.



Nachdem die cDNS-Bibliothek von mir erfolgreich produziert wurde (Abb.21), transfizierte ich transient COS 7 Zellen, um dann mit einer MACS-Säule (magnetic cell sorting) und dem AT-G.1 Antikörper diejenigen Zellen zu isolieren, die das Antigen exprimieren. Wie sich herausstellte, war es mir nicht möglich, das Antigen durch diese Methode zu isolieren. In Runde eins und zwei schien es so, dass sich die Zellen mit dieser Methode anreichern lassen, aber dies stoppte dann in Runde drei und vier der Transfektion. Ich startete einen erneuten Versuch mittels des Antikörper-„pannings“. Hierbei werden die Antikörper an Plastikschalen gebunden, auf die dann die transfizierten Zellen inkubiert werden. Auch hier wollte ich durch mehrere Durchgänge die Zellen anreichern, die das Antigen exprimieren. Aber auch dies schlug fehl.

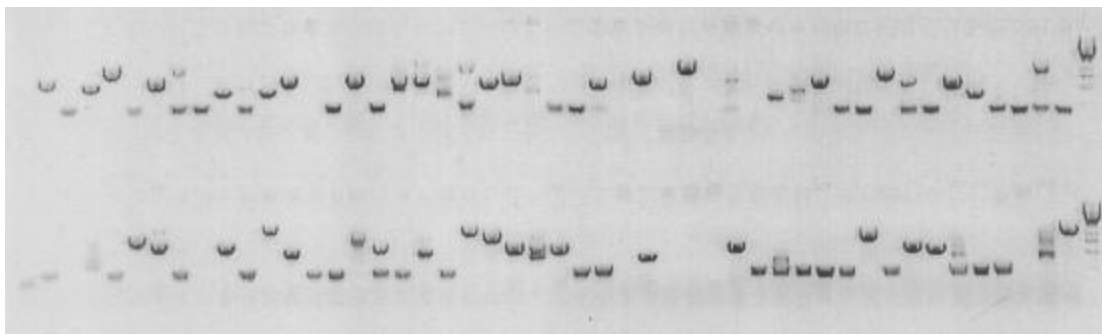


Abb.21: Colony-PCR von 96 zufällig gepickten Klonen der AT6.1 cDNS-Bibliothek. Die PCR wurde mit einem NotI-Primer und einem Primergemisch durchgeführt. Die unterschiedliche Größe der Fragmente zeigt, dass die Herstellung der cDNS-Bibliothek erfolgreich war.

4.3.8 Untersuchung zur Kohlenhydrat- oder Lipidnatur des Antigens

Die vorangegangenen Ergebnisse, die zur Identifizierung der Antigene führen sollten, ergaben Hinweise, dass es sich bei den Antigenen vielleicht gar nicht um ein Protein handelt. Somit wollten wir nun überprüfen, ob es sich bei den Antigenen um einen Kohlenhydratrest, wie auch das M-N#1 Antigen, oder um ein Lipid handelt.

Um die Möglichkeit zu testen, ob es sich um ein Kohlenhydratantigen handelt, wurde eine IP durchgeführt, bei der die präzipitierten Extrakte vor dem Gellauf mit Zuckerschneidenden Enzymen inkubiert wurden. Bei der Auswertung des Experiments konnte ich keine Unterschiede zwischen den Extrakten, die mit den Kohlenhydrat-schneidenden Enzymen behandelt wurden und den unbehandelten Extrakten feststellen (Daten nicht gezeigt).

Da auch ein Lipid als Antigen in Frage kommt, wurden als nächstes Versuche unternommen, die auf diese Fragestellung eine Antwort geben sollten. Dazu extrahierte ich die Lipidfraktion aus den AT 6.1 und den G Zellen und führte damit eine Dünnschichtchromatographie (DSC) durch. Zuerst überprüfte ich, ob überhaupt die Isolierung der Lipide funktioniert hatte. Nach dem Lauf färbte ich die DSC-Platte mit Kupfersulphat an. Ich konnte in beiden Zelllinien Lipidbanden sichtbar machen. In einem zweiten Versuch führte ich eine Immunfärbung durch, die ähnlich einer Western-Blot Immunfärbung ist. Da es bei der Positivkontrolle und mit dem AT-G.1 Antikörper zu keiner Reaktion kam, kann ich keine abschließende Aussage zu diesem Versuch machen.

4.4 Diskussion der subtraktiven Immunisierungen

4.4.1 Die subtraktive Immunisierung mit dem BSP73 RattenpankreasKarzinom-System

Wie ich im Ergebnisteil zeigen konnte, hat die Immunisierung der Mäuse funktioniert. Dies wird deutlich durch den Serumtest auf den beiden verwendeten Zelllinien (Abb.13). Nach zweimaliger Durchführung der Hybridomabildung mit insgesamt 4 Tieren konnte ich jedoch keinen Antikörper isolieren, der spezifisch an eine der beiden Zelllinien band. Nun ist zu überlegen, warum es nach erfolgreicher Immunisierung zu keiner Identifikation eines spezifischen Antikörpers kam.

Das kann mehrere Gründe haben. Die beiden Zelllinien sind sehr nah miteinander verwandt. Die metastasierende Zelllinie 1AS Ln2Ln2Ln wurde von Herrn Dr. Sleeman aus spontan entstehenden Lymphknotenmetastasen isoliert, die sich in Ratten gebildet hatten, die mit der eigentlich nichtmetastasierenden Zelllinie 1AS injiziert wurden. Der Lymphknoten wird als erster Ort beschrieben, in dem invasive Krebszellen zu finden sind (Sleeman, 2000), und möglicherweise bedarf es nicht vieler Veränderungen im Expressionsmuster, damit Tumorzellen die Fähigkeit erlangen in die regionalen Lymphknoten zu metastasieren.

Da die Methode der subtraktiven Immunisierung darauf ausgelegt ist, eindeutige Veränderungen auf der Zelloberfläche zu entdecken, kann es sein, dass sich durch die nahe Verwandtschaft der beiden Klone solche eindeutigen Veränderungen noch nicht oder erst sehr wenige manifestiert hatten. Es kann auch sein, dass die Veränderungen auf der Zelloberfläche nur feine Proteinmengen-Unterschiede der entscheidenden Proteine ausmachen, und diese sind mit dieser Methode nur schwer festzustellen. Zusätzlich kann es sein, dass zu den sensibel regulierten Unterschieden auf der Zelloberfläche, die nicht festzustellen waren, es natürlich auch in der Zelle zu Veränderungen kommt, die die Invasion fördern, z.B. Veränderungen, die das Zytoskelett betreffen, die eine erhöhte Motilität zur Folge hätten (Patel et al., 1998; Kiley et al., 1999; Turner, 2000). Auch solche Veränderungen sind mit der subtraktiven Immunisierung nicht festzustellen.

Als letzten Punkt möchte ich anmerken, dass man bei der Hybridomabildung keine hundertprozentige Ausbeute erreichen kann. Somit könnte es sein, dass die entscheidenden B-Zellen im Laufe der Prozedur verloren gegangen sind.

4.4.2 Die subtraktive Immunisierung mit dem Dunning Rattenprostatakarzinom-System

Nach erfolgreicher Immunisierung erhielt ich zwei Antikörper, die spezifisch an die hochmetastasierende AT 6.1 Zelllinie binden, aber nicht an die nichtmetastasierende G Zelllinie. Die beiden Antikörper erwiesen sich als wirksam im Tierexperiment, das AT 6.1 Tumorstadium erheblich zu reduzieren. Die Analyse der Expression der Antigene, die von den beiden Antikörpern in verschiedenen normalen Geweben gebunden werden, ergab eine Lokalisierung auf der Zelloberfläche als auch in der ECM. Die Identität der Antigene konnte bis jetzt noch nicht aufgeklärt werden.

Die Identifizierung spezifischer Moleküle, die in den vielschichtigen Prozess von Tumorprogression und Metastasierung involviert sind, erweist sich wegen der Komplexität der verschiedenen Schritte dieser Kaskade in vivo als schwierig. In meinen Versuchen hier habe ich die Technik der subtraktiven Immunisierung benutzt, um immunologisch spezifische Moleküle zu entdecken, die auf der Zelloberfläche von hochmetastasierenden Zellen oder ihren nichtmetastasierenden Verwandten zu finden sind. Hierbei wurde die Selektion dieser Moleküle durchgeführt, ohne eine bestimmte Gruppe von Antigenen, wie Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle oder ähnliches zu favorisieren. Allein die Relevanz der Moleküle im Prozess der Tumorprogression und Metastasierung, die durch die ausgewählte Methode diktiert wird, ist wichtig für die Auswahl.

Die subtraktive Methode wurde mit den Zellen des Dunning-Rattenprostatakarzinom-Systems durchgeführt, da diese verschiedene Vorteile bieten. Zum einen sind die Zelllinien etabliert und gut beschrieben (Isaacs et al, 1986). Desweiteren wurden Rattenkrebszellen ausgewählt, da die uns zur Verfügung stehenden Krebszell-Systeme wie humane Krebszellen über das Lymphsystem metastasieren, im Gegensatz zu Mauskrebszellen, die zumeist über die Blutbahn metastasieren. Ausserdem ergeben Rattenzellen eine bessere Immunantwort in Mäusen als Mauszellen. Zudem bieten sie den Vorteil, dass man nach erfolgreicher subtraktiver Immunisierung die Antikörper sofort in einem in vivo System auf Effekte in der Tumorprogression und Metastasierung testen kann.

Es wäre natürlich auch möglich gewesen, mit den Zellen direkt die Mäuse zu immunisieren, was auch schon erfolgreich durchgeführt wurde (Matzku et al., 1989). Aber dabei wäre es wahrscheinlich, dass die entstehende Immunantwort hauptsächlich gegen immundominante Antigene auf der Zelloberfläche gerichtet wäre, die nichts oder nur entfernt etwas mit dem Prozess der Tumorprogression und Metastasierung zu tun hätten. Dies wird auch durch Studien gestützt, die direkte Immunisierungen mit den Zielzellen durchgeführt haben (King et al., 1988; Williams et al, 1992). Die Methode der subtraktiven Immunisierung sollte eine Immunantwort gegen solche immundominanten Antigene nicht ermöglichen.

Die subtraktive Immunisierung erlaubt dagegen vielleicht eine Immunreaktion gegen seltene oder schwach immunogene Antigene auf der Zelloberfläche, die vielleicht eine Rolle in der Tumorprogression oder Metastasierung spielen. Dies wird erreicht durch die Tatsache, dass die Mäuse gegen die Epitope, die auf beiden Zelllinien zu finden sind, durch die Behandlung mit Cyclophosphamid, das aktivierte B-Zellen abtötet, tolerant werden. Die Effektivität dieser Cyclophosphamid-Behandlung wurde in einer Studie getestet und als das beste Mittel für subtraktive Immunisierungstechniken befunden (Williams et al., 1992). Ebenso wurden die optimalen Bedingungen für die Behandlung getestet (Brooks et al., 1993).

Die Hybridomabildung ergab zwei Antikörper, die nur auf der hochmetastasierenden Zelllinie AT 6.1 binden (Abb.15). Die Spezifität der Antikörperreaktion ist in diesem Falle sogar als absolut oder komplett zu bezeichnen, da die Antikörper ausschließlich an die eine Zelllinie binden.

Der Erfolg der subtraktiven Immunisierung, im Bezug zur Fragestellung, konnte festgestellt werden, da die Antikörper in Tumorexperimenten das Wachstum eines AT 6.1 Tumors in Kopenhagen-Ratten deutlich reduzierten (Abb.16). Somit scheinen die Antigene, die von den Antikörpern erkannt werden, eine Rolle im Prozess der Tumorprogression und Metastasierung zu spielen. Dieses reduzierte Tumorstadium ist nicht auf eine Komplementaktivierung oder Antikörper-abhängige Zell-Zytotoxizität, die durch spezifische T-Zellen vermittelt wird, zurückzuführen, da $F(ab')_2$ -Fragmente auch eine deutliche Reduzierung bewirken (Abb.18). Ähnliche Ergebnisse sind auch schon in anderen Studien erzielt worden (Brooks et al., 1993; Testa et al., 1999; Sleeman et al., 1999; Boukerche et al., 2000), die die subtraktive Immunisierung benutzt haben, um solche Antigene zu identifizieren.

Nach solchen Erfolgen will man natürlich mehr über die Identität und die Funktion des Antigens erfahren. Bei immunhistochemischen Untersuchungen auf verschiedenen Rattengeweben hat sich gezeigt, dass die Antigene in vielen verschiedenen Normalgeweben auf der Zelloberfläche oder in der ECM und Bindegewebe exprimiert sind (Tab.5, Abb.19). Die Expressionsmuster könnten auch auf ein gewisses Maß an unspezifischer Bindung hinweisen, hier müssen die Bedingungen für die IHC noch optimiert werden.

Auch in der Prostata ist keine Expression auf den epithelialen Zellen zu finden, sondern nur im Bindegewebe um die Kanälchen. Trotzdem scheinen die Antigene nicht spezifisch für Prostatakrebs zu sein. Zudem sind die Expressionsmuster der durch die beiden Antikörper erkannten Antigene in den Geweben fast gleich, was darauf hinweist, dass die beiden Antikörper wahrscheinlich zwei Epitope des gleichen Antigens erkennen.

Dies spricht erneut für die Wichtigkeit dieses Antigens bei der Tumorprogression und Metastasierung, da unabhängig zwei Antikörper anscheinend gegen das gleiche Antigen gebildet wurden.

Die Identifizierung des/der Antigens/Antigene war das nächste Ziel meiner Versuche. Dies erwies sich als äußerst schwierig und ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen. Der erste Versuch war, eine Immunpräzipitation mit radioaktiv markierten Zellen durchzuführen. Dies schien im ersten Moment auch erfolgversprechend zu sein, da ich Banden auf dem Radiogramm erkennen konnte, die nur bei der IP mit AT 6.1 Zellen zu sehen waren, aber nicht bei der IP mit G-Zellen. Um das Antigen zu identifizieren musste ich den Ansatz in größerem Maßstab und mit nicht radioaktiv markierten Zellen durchführen, um letztendlich die gefundenen Proteinbanden einer Proteinmassen-Spektroskopie Analyse zuzuführen. Trotz vielfachen Wiederholens, auch unter anderen Lysebedingungen der Zellen, konnte ich die Ergebnisse der radioaktiven IP nicht wiederholen.

Da die Immunfluoreszenz-Färbung gezeigt hatte, dass die Zellen keine starke Expression des Antigens aufweisen, überlegten wir uns eine Strategie, wie man die Expression verstärken und/oder das Antigen isolieren könnte. Ich erstellte eine cDNS-Bibliothek aus den AT 6.1 Zellen, um daraus das Antigen zu isolieren.

Leider war es mir nicht möglich, das Antigen anzureichern und auch der Versuch über das Antikörper-„panning“, bei dem der Antikörper auf Plastikschalen gebunden wird, um damit die transfizierten Zellen zu binden, schlug fehl. Diese Ergebnisse liessen den Schluss zu, dass es sich bei dem Antigen vielleicht gar nicht um ein Protein handelt, sondern um ein anderes Molekül, das auf oder in der Zellmembran zu finden ist. Es könnte sich um einen Kohlenhydratrest handeln, wie bei der subtraktiven Immunisierung, die von Dr. Sleeman durchgeführt wurde und bei der das M-N#1 Antigen isoliert wurde (Sleeman et al., 1999; Mengwasser & Sleeman, 2001); oder es handelt sich um eine Form von Lipid (Glykolipid, Phospholipid, Sphingolipid).

Um diese Hypothese zu testen, wurden von mir radioaktive IPs durchgeführt, die dann vor dem Laden auf das Gel mit verschiedenen Kohlenhydrat-spaltenden Enzymen behandelt wurden. Das Ergebnis war negativ, es konnten keine Unterschiede zu IPs festgestellt werden, bei denen keine Behandlung mit diesen Enzymen vorgenommen wurde (Daten nicht gezeigt).

Es wurde schon gezeigt, dass auch verschiedene Lipidmoleküle eine Rolle bei der Tumorprogression und Metastasierung spielen (Hakamori, 1997; Sliva et al., 2000; Ito et al., 2001). Um zu überprüfen, ob es sich bei den von den beiden Antikörpern erkannten Antigenen um Lipide handelt, habe ich die Lipidfraktionen von G und AT 6.1 Zellen isoliert und mittels seiner Dünnschichtchromatographie (DSC) aufgetrennt. Mit den Antikörpern kann man, ähnlich wie bei einem Western Blot, nachprüfen, ob das Antigen zu detektieren ist. Ich konnte bis jetzt keine spezifische Bindung des Antikörpers auf der DSC-Platte nachweisen. Ich kann aber keine endgültige Aussage über das Vorhandensein des Antigens in der Lipidfraktion machen (Daten nicht gezeigt).

Es bedarf weiterer Anstrengung und neuer Strategien um die Identität der Antigene aufzudecken. Da bis jetzt noch keine Aussage über die Natur des Antigens gemacht werden kann, sollten auch weiterhin Versuche zur Natur des Antigens durchgeführt werden. Da der Antikörper in der FACS-Analyse funktioniert, könnte man Zellen mit Proteasen oder Glycosidasen behandeln und anschliessend mit dem Antikörper inkubieren und dann überprüfen, ob das Antigen noch nachweisbar ist. Diese Versuche sind in Vorbereitung, es müssen noch die optimalen Bedingungen ausgetestet werden. Auch sollten bei den IPs weiterhin die Lyse- und Bindungsbedingungen variiert werden, um vielleicht doch bessere Bedingungen zu erzielen, die es ermöglichen, das Antigen zu isolieren (falls es ein Protein ist). Genauso sollten die DSC-Versuche wiederholt werden, um eine abschliessende Aussage treffen zu können.

Durch weiterführende Analysen im Tier, in der Zellkultur und in Gewebeschnitten sollte noch mehr über die Identität und die Funktion des Antigens in Erfahrung gebracht werden, um Ideen zu erhalten, welche Rolle das Antigen in der Tumorprogression spielt.

Es wäre vielleicht möglich, neue Antikörper, die gegen das Antigen gerichtet sind, zu produzieren, indem man Mäuse mit den Extrakten einer optimierten Immunpräzipitation mit den vorhandenen Antikörpern immunisiert, die sich besser dafür eignen, die Identität des Antigens zu lüften.

4.5 Serum-Immunsierung um neue Serum-Tumormarker zu entdecken

Wie schon in der Einleitung beschrieben, besteht ein eklatanter Mangel an zuverlässigen und spezifischen Tumormarkern. Die meisten der etablierten Marker zeigen oft eine Tendenz auch in Patienten erhöhte Werte zu zeigen, die keinen Tumor haben, sondern eine andere Erkrankung. Aber welche Möglichkeiten gibt es, neue, vielleicht spezifischere und sensiblere Tumormarker zu identifizieren? Ich möchte hier eine Methode vorstellen, mit der wir versucht haben neue Tumormarker zu entdecken. Das Ziel war, Serum-Tumormarker zu finden, die als prognostische Marker funktionieren können, vielleicht aber auch therapeutischen Nutzen haben oder es möglich machen, den Fortschritt einer Krebstherapie zu überwachen. Die Marker sollten von den Tumorzellen sezerniert oder abgespalten werden, um dann in einer Körperflüssigkeit zu finden zu sein, da dies den Nachweis bei späterer Anwendung erleichtert.

4.5.1 Erläuterung der Methode

Durch die Verwendung von Nacktmäusen ist es möglich, Tumore wachsen zu lassen, die von humanen Krebszelllinien gebildet werden. Wir wollten mit unserem Ansatz direkt in das menschliche System gehen, da die zu findenden Antigene nach erfolgreicher Charakterisierung direkt in klinischen Ansätzen Verwendung finden könnten.

Bei uns ergab sich das Problem, die Immunantwort möglichst spezifisch gegen die von Tumor sezernierten oder abgespaltenen Antigene zu richten. Um dieses Problem zu umgehen, wurden für die Tumors Serum-Gewinnung Nacktmäuse mit dem gleichen genetischen Hintergrund verwendet, wie anschließend für die Immunsierung. Dadurch sollte es möglich sein, die Immunantwort gegen Proteine, die normalerweise schon im Serum vorhanden sind, gering zu halten. Zusätzlich müsste dadurch die Immunantwort gegen die „fremden“ Tumorantigene verstärkt werden.

4.5.2 Etablierung der Immunisierungsmethode

Am Anfang stand die Wahl der Krebszelllinie, wir entschieden uns dann für die humane Kolonkarzinom-Zelllinie COLO320 DM. Der Grund warum diese Zelllinie gewählt wurde, ist dass Kolonkrebserkrankungen einen großen Prozentteil aller Krebserkrankungen ausmachen und dass die Zelllinie kein CEA (carcino-embryonic antigen) exprimiert, es sollten nicht nur Antikörper gegen bereits schon bekannte Serummarker entstehen.

Zuerst wurden Balb/C-Nacktmäusen 2×10^6 Colo320DM-Zellen dorsal subcutan injiziert. Dann wurde das Tumorwachstum beobachtet und wenn der Tumor die legale Maximalgröße erreicht hatte, wurden die Mäuse getötet und das Serum isoliert. Das Serum wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Der nächste Schritt war, Mäuse mit diesem Serum zu immunisieren. Da keine Immunantwort gegen Proteine des Serums gewollt war, immunisierten wir normale Balb/C-Mäuse. Durch den gleichen genetischen Hintergrund sollte die Immunantwort gegen Serumproteine minimiert und gegen die vom Tumor sezernierten oder abgespaltenen Proteine maximiert werden. Wir immunisierten die Mäuse lokal subcutan, weil dabei nur wenig Material zur Immunisierung nötig war.

Die Mäuse wurden gemäß dem Protokoll der Methode (3.6.5) immunisiert. Nach Abschluss der Immunisierung wurde eine Hybridoma-Bildung (3.7.2) durchgeführt.

4.5.3 Testen der Antikörper

Nachdem die Hybridoma-Bildung erfolgreich abgeschlossen wurde, wurden die entstehenden Klone auf zweifache Weise auf den Colo320 DM-Zellen getestet. Zum einen, wie bei den vorangegangenen subtraktiven Immunisierungen, durch einen Zell-ELISA und zusätzlich durch einen „Strip-Western“.

Dies geschah aus dem Grund, weil Antigene vom Tumor sezerniert werden können, die nicht auf der Zelloberfläche nachzuweisen sind. Dafür wurde Colo320DM-Lysat in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf der ganzen Gelbreite aufgetragen. Nach dem Lauf des Gels und anschließendem Übertragen auf eine PVDF-Membran (blotten), wurde die Membran in etwa 4-5mm breite Streifen geschnitten und die Antikörper-enthaltenden Überstände der Klone wie bei einer „Western“-Hybridisierung jeweils auf einem der erhaltenenen Streifen getestet.

Durch den „Strip-Western“ konnte ich nicht nur positive Klone erkennen. Zusätzlich wurde durch das Molekulargewicht der Bande ein erster Hinweis auf die Identität des Antigens gegeben. Die Abb.22B zeigt ein Beispiel eines solchen „Strip Western“. Zusammenfassend ist für diesen Teil der Immunisierung zu sagen, dass die Immunisierungsmethode von mir etabliert werden konnte, dass sie funktioniert hat und dass ich 8 Antikörper erhalten habe, die entweder in einem Zell-ELISA oder im „Strip-Western“ an Antigene der Colo320DM Zellen binden.

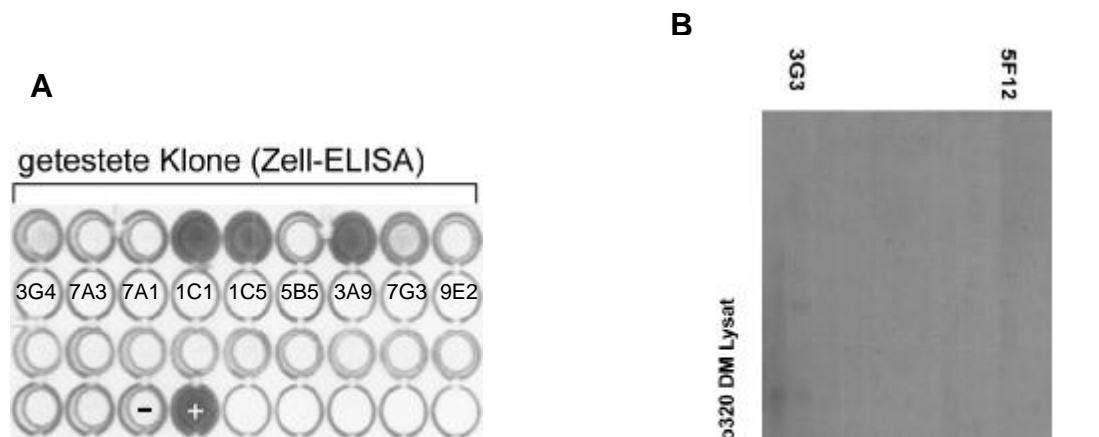


Abb.22: Test der erhaltenen Antikörper aus der Hybridomabildung mittels Zell-ELISA oder Strip-Western.

A: Überstände verschiedener AK. wurden auf Colo320 DM Zellen mittels Zell-ELISA getestet, Klonnummern sind unterhalb des jeweiligen wells angegeben, pos. Kontrolle (+), neg. Kontrolle (-)

B: Überstände verschiedener Ak. auf Colo320 DM Lysat getestet durch Strip Western, Pfeile markieren Proteinbanden, die durch Ak. erkannt wurden. Der Übersicht wegen, wurden nur die Klonnummern angegeben, die zu einer positiven Reaktion führten.

4.5.4 Identifizierung des Antigens, dass vom 1C1-Antikörper gebunden wird, mittels IP und Proteinanalyse

Im weiteren Verlauf der Antikörpertests stellte sich ein Antikörper als äußerst interessant heraus. Dieser Antikörper, genannt 1C1, wurde dann zum Mittelpunkt meiner weiteren Untersuchungen. Der Test mit einem Antikörper-Isotop-Kit ergab, dass der 1C1-Antikörper zur Klasse der IgM-Antikörper gehört.

Ein Ziel bei diesen Versuchen muss es sein, das Antigen zu identifizieren, das von einem Antikörper gebunden wird. Um dies zu bewerkstelligen, muss das Antigen in ausreichender Menge aufgereinigt werden, um es dann durch eine Proteinmassen-Spektralanalyse zu bestimmen.

Als erster Schritt dahin wurde eine IP mit biotinylierten Colo320DM Zellen durchgeführt, die nach der Lyse zum einen mit meinem 1C1-Antikörper inkubiert wurden, als auch mit einem IgM-Kontrollantikörper. Nach erfolgter Immunpräzipitation wurden die Proben auf ein Gel geladen und nach dem Lauf auf eine Membran übertragen. Diese Membran wurde dann mit Streptavidin-HRP inkubiert, das an die Biotingruppen der so markierten Proteine bindet und durch eine ECL-Entwicklung nachgewiesen wird. Wie in der Abb.21A zu sehen ist, erhalte ich mit meinem 1C1-Antikörper zwei Banden von etwa 32 und 37 kD, die nicht mit dem Kontrollantikörper zu präzipitieren sind.

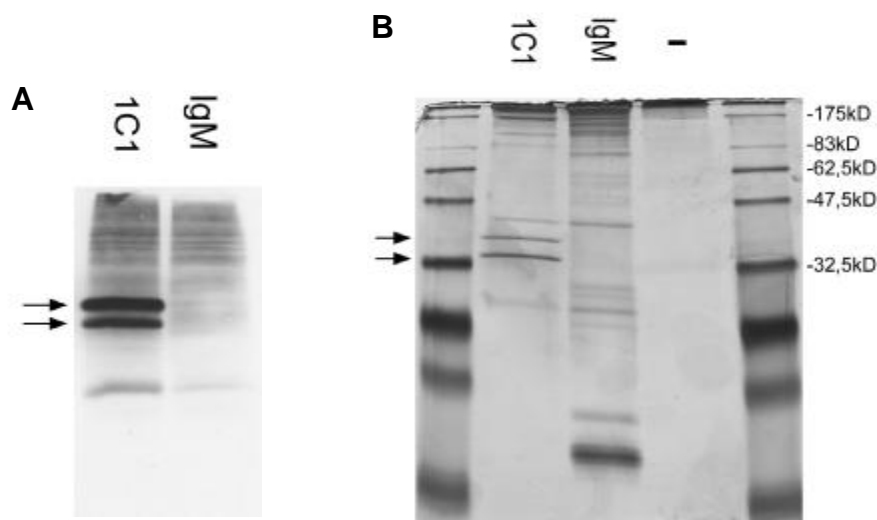


Abb.23: IP mit dem 1C1-Ak. und Colo320 DM Zellen

A: IP mit biotinylierten Colo320 DM Zellen: Pfeile markieren Proteinbanden die mit dem 1C1-Ak. präzipitiert wurden, IP mit IgM-Ak. als neg. Kontrolle

B: IP mit Colo320 DM Zellen. Silberfärbung des Gels. Pfeile markieren Proteinbanden die mit dem 1C1-Ak. präzipitiert wurden, IP mit IgM-Ak. als neg. Kontrolle, (-): kein Ak. für IP

Die Aufreinigung geschieht meist durch eine Immunpräzipitation (IP). Die IP wurde gemäß dem Protokoll 3.5.7 angefertigt. Dann wurden die Proben mit allen Kontrollen auf ein Proteingel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurde eine Silberfärbung des Gels durchgeführt. Bei dieser Silberfärbung war zu beachten, dass die Proteine nicht wie sonst durch Glutaraldehyd mit der Gelmatrix vernetzt werden, da sonst die Proteine für die Spektralanalyse nicht mehr aus dem Gel herausgelöst werden können. Die Abb.23B zeigt das silbergefärbte Gel, in dem man, durch die zwei Pfeile gekennzeichnet, die Proteinbanden erkennt, die spezifisch durch den 1C1-Antikörper präzipitiert worden sind. Diese Proteinbanden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und der Firma TopLab, München zugesandt, um eine Proteinmassen-Spektralanalyse durchführen zu lassen.

Das Ergebnis dieser Analyse ist folgend aufgelistet. Die untere Bande, von etwa 32kD Größe, wurde als Prohibitin identifiziert, die obere Bande, etwa 37 kD groß, als BAP37 (**B**-cell receptor **A**ssociated **P**rotein 37) (auch D-Prohibitin). Die Übereinstimmung der Proteinmassen lies, laut TopLab, keinen Zweifel an der Identität der Proteine.

Result Summary

Rank	MOWSE Score	# (%) Masses Matched	Protein MW (Da)/pI	Species	NCBI Inr.150501 Accession #	Protein Name
1	1.41e+008	14/21 (66%)	29804.2 / 5.57	HOMO SAPIENS	4505773	(S85655) prohibitin
2	3.34e+007	13/21 (61%)	29820.2 / 5.57	MUS MUSCULUS	6679299	(AK010619) putative
3	2.08e+006	11/21 (52%)	29273.4 / 5.74	HOMO SAPIENS	13652568	prohibitin
4	148	5/21 (23%)	56949.5 / 7.69	HOMO SAPIENS	731050	UDP-glucose pyrophosphorylase
5	76.3	6/21 (28%)	48616.4 / 5.69	HOMO SAPIENS	3170180	(AF039690) antigen NY-CO-8

Result Summary

Rank	MOWSE Score	# (%) Masses Matched	Protein MW (Da)/pI	Species	NCBI Inr.150501 Accession #	Protein Name
1	9.88e+007	19/28 (67%)	33273.5 / 9.83	MUS MUSCULUS	6671622	(X78683) IgM B-cell receptor associated protein (BAP) 37
2	9.88e+007	19/28 (67%)	33296.5 / 9.83	HOMO SAPIENS	6005854	(AF178980) D-prohibitin
3	9.87e+007	19/28 (67%)	33335.7 / 9.76	HOMO SAPIENS	13652316	B-cell associated protein
4	3.44e+006	16/28 (57%)	23635.2 / 9.57	HOMO SAPIENS	1673514	(U72511) B-cell receptor associated protein
5	225	5/28 (17%)	39285.4 / 7.61	RATTUS NORVEGICUS	11560057	(AB034634) tRNA-guanine transglycosylase

Tab.6: Ergebnisse der Proteinmassen-Spektroskopie-Analyse durch TopLab GmbH. Hier sieht man, dass die Proteine eindeutig identifiziert wurden. Speziell die hohen Werte bei den passenden Proteinmassen (mass matched) zeigen dies an.

4.5.5 Prohibitin und BAP37 – eine Einleitung

Prohibitin und BAP37 sind beides Proteine, die noch nicht sehr lange bekannt sind. Prohibitin wurde das erste Mal im Jahr 1991 (Nuell et al.) beschrieben, BAP37 erst im Jahr 1994 (Terashima et al.). Die beiden Proteine zeigen eine hohe Verwandtschaft zueinander. Die Homologie auf DNA und Proteinebene ist sehr hoch, besonders im Mittelteil, während das aminoternale Ende und das carboxyterminale Ende eine schwache Homologie aufweisen (Coates et al., 1997; Nijtmans et al., 2000). Zusätzlich sind die Proteine hoch konserviert in der Evolution mit Homologen in *C.elegans* und *S.cerevisiae*, sowie in *Drosophila melanogaster* und Nagetieren (Eveleth & Marsh, 1986; Coates et al., 1997).

Beide Proteine werden als intrazellulär lokalisiert und ubiquitinär exprimiert beschrieben (Coates et al., 1997; Nijtmans et al., 2000; Coates et al., 2001). Die Lokalisation der Proteine in der Zelle wird im Nukleus (für Prohibitin) beschrieben (Wang et al., 1999), als auch im Zytoplasma in der inneren Membran der Mitochondrien (für beide Proteine) (Ikonen et al., 1995; Coates et al., 1997; Nijtmans et al., 2000) und an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran der Zelle (für Prohibitin und BAP37) (Terashima et al., 1994).

Über die Funktionen der beiden Proteine ist nicht viel bekannt. Prohibitin wird eine mögliche Rolle als Tumorsupressor zugeschrieben (McClung et al, 1989; Nuell et al., 1991) und soll mit RB interagieren und dadurch die E2F Funktion und somit auch die Zellproliferation regulieren (Wang, 1999). Im Zytoplasma sind beide Proteine als Komplex beschrieben (Coates et al., 1997) und sollen als Mitochondrienmembran gebundenes Chaperon agieren, um mitochondriale Proteine zu stabilisieren (Nijtmans et al., 2000). Weiterhin reagieren sie auf mitochondrialen Stress und werden während der zellulären Seneszenz herunterreguliert (Coates et al., 1997; Coates et al., 2001), was durch einen Knockout in Hefezellen herausgefunden wurde. Ein früherer Report beschreibt beide Proteine als Bindungspartner des IgM-Rezeptors auf B-Zellen (Terashima et al, 1994). Kein Report beschrieb bis jetzt die Expression der beiden Proteine auf der Zelloberfläche noch deren Sezernierung.

4.5.6 Überprüfung des Immunisierungsprinzips: Expression des Antigens im Serum tumortragender Nacktmäuse

Nach der Etablierung des Immunisierungsprinzips ist es wichtig, das vordergründige Prinzip zu überprüfen. Es muss gezeigt werden, dass das Antigen wirklich von den Tumorzellen ins Serum der Nacktmäuse abgegeben wird. Um dies zu überprüfen, wurde von mir eine „Sandwich-ELISA“ benutzt. Das Prinzip hinter diesem Ansatz ist, dass man zuerst das Antigen mit einem „capturing“-Antikörper aus dem Proteingemisch des Serums „einfängt“ und dann mittels eines Detektierungsantikörpers nachweist.

Der Versuch wurde wie in 3.5.11 beschrieben durchgeführt. Ich benutzte eine Verdünnungsreihe des Serums von tumortragenden Nacktmäusen, daneben Kontroll-Serum von nichtbehandelten Nacktmäusen, Colo320DM Lysat als Positivkontrolle und ein Ansatz ohne Detektierungsantikörper als Negativkontrolle.

Auf der Abbildung 24 ist deutlich die Farbreaktion in den Ansätzen mit dem konditionierten Serum zu sehen, während das Serum der nichtbehandelten Nacktmäuse zu keiner Farbreaktion führte. Der Versuch wurde von mir dreimal unabhängig wiederholt, die Ergebnisse sind im Graph (Abb.25) dargestellt. Somit ist der Nachweis erbracht, dass das Antigen im Serum von tumortragenden Nacktmäusen vorhanden ist.

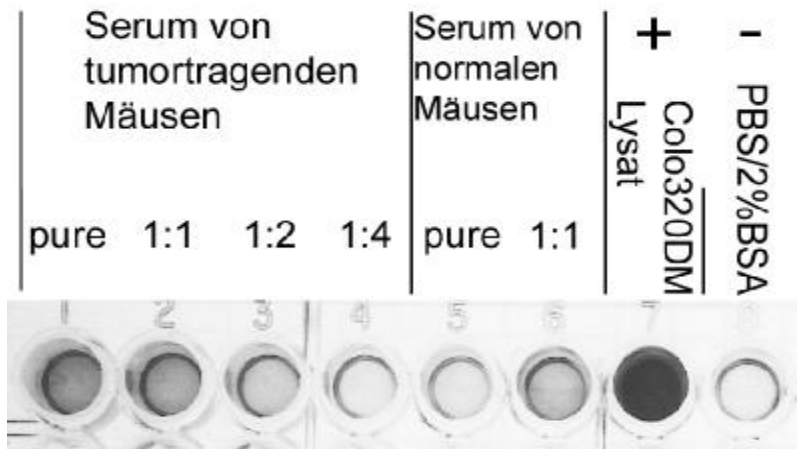


Abb.24: Sandwich-ELISA mit Serum von tumortragenden und normalen Mäusen zur Detektion von Prohibitin.

„capturing“-Ak.: 1C1.Ak.

Detektions-Ak.: polyklonaler Prohibitin-Ak.

Colo320 DM Lysat als pos. Kontrolle

Bei der neg. Kontrolle wurde anstatt Serum oder Lysat PBS mit 2% BSA verwendet. In der Verdünnungsreihe ist eindeutig ein absteigende Reaktivität zu beobachten, leichte Färbung im normalen Serum (1:1) wahrsch. durch Verunreinigung mit Lysat.

Antigenlevel im Serum tumortragender und nichtbehandelter Mäuse

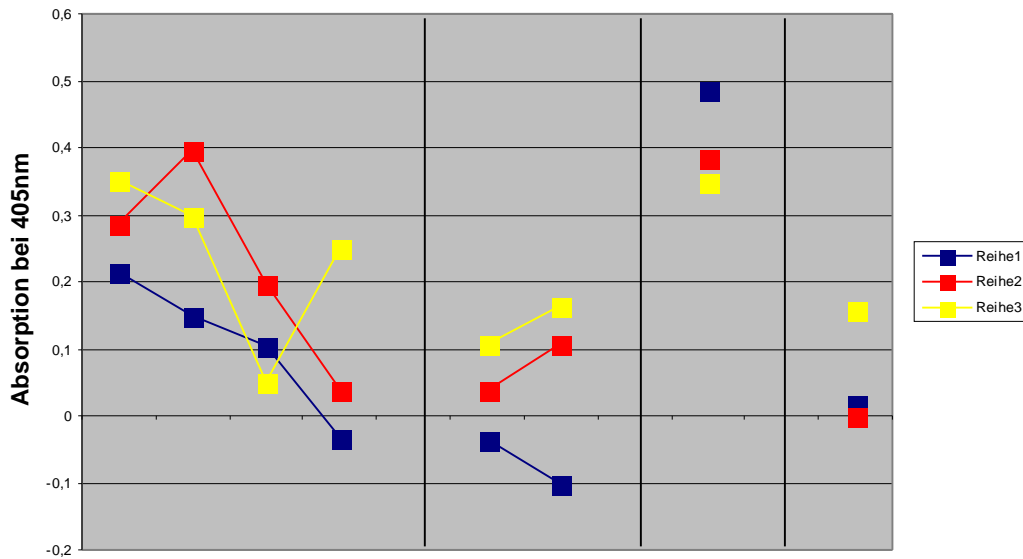


Abb.25: Wiederholung Sandwich-ELISA. Durchführung wie in vorher beschrieben (gleiche Reihenfolge der Proben wie in Abb.24). Linke Seite: Verdünnungsreihe Tumorsersum, Mitte: Normalserum, Colo320 DM Lysat, PBS/2%BSA Die Absoprions-Werte der ABTS-Reaktion bei 405 nm wurden hier graphisch dargestellt.

4.5.7 Analyse der Expression von Prohibitin in Kolonkarzinom-Zelllinien mittels RT-PCR

Natürlich wollte ich nun wissen, ob die Expression von Prohibitin nur in der Colo320 DM zu finden ist, oder ob auch andere Zelllinien es exprimieren. Um festzustellen, ob und in welchen Mengen Prohibitin in anderen humanen Kolonkarzinomzellen exprimiert ist, wurde aus verschiedenen humanen Zelllinien gesamt-RNS mit dem Macherey&Nagel RNA-Kit isoliert und wie in Methode 3.4.1 beschrieben in cDNS umgeschrieben. Anschliessend wurde eine semi quantitative PCR durchgeführt, um die Expression von Prohibitin in den Zelllinien zu untersuchen. Dabei wurden die einzusetzenden cDNS-Mengen mit einer Aktin-PCR bestimmt, normalisiert und dann mit den ermittelten Mengen die Prohibitin-PCR durchgeführt. Die erhaltene DNS wurde mit Probenpuffer versetzt, auf ein 0.9%iges Gel aufgetragen und elektrophoretisch bei 90V aufgetrennt. In der Abb.26 ist zu sehen, dass alle Kolonkarzinom-Zelllinien in etwa die gleichen Mengen an Prohibitin exprimieren.

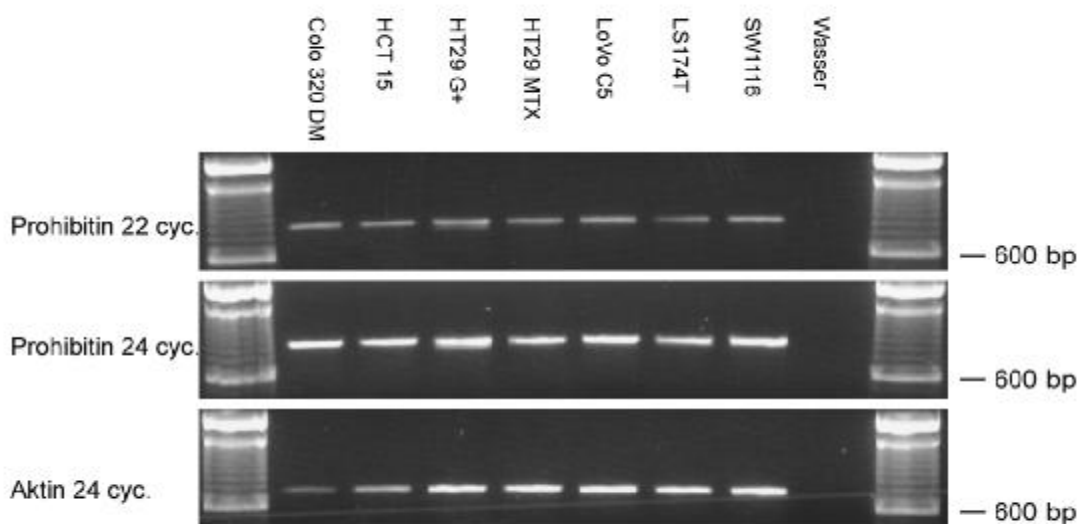


Abb.26: RT-PCR mit mRNS verschiedener humaner Kolonkarzinomlinien. Oben und Mitte: 22 bzw. 24 Zyklen mit einem Prohibitin-Primer, Unten: PCR mit β -Aktin-Primer für die quantitative Analyse, Wasser: neg. Kontrolle Wasser als Probe für die PCR-Reaktion, Marker: 100bp Marker

4.5.8 Analyse der Expression von BAP37 in Kolonkarzinom-Zelllinien mittels RT-PCR

Da ich anhand der IP-Ergebnisse nicht genau sagen kann, welches der beiden Proteine von meinem Antikörper erkannt wird, wollte ich nun noch quantitativ die Expressionmengen von BAP37 in den oben benutzten Kolonkrebs-Zelllinien bestimmen. Erneut wurde die isolierte RNS in cDNS mittels einer reversen Transkriptase Reaktion umgeschrieben und in einer PCR Reaktion eingesetzt. Wie oben schon beschrieben, wurde zuvor ein Normalisierungsschritt durchgeführt.

Die Bedingungen für die Aktin PCR sind die Gleichen, wie unter 4.3.7, mit dem Unterschied, dass nur 20 Zyklen gefahren wurden. In der Abb.27 ist zu sehen, dass in der Expression von BAP37 größere Unterschiede festzustellen sind als bei der Analyse der Prohibitin-Expression in den gleichen Zelllinien. So zeigen die Zelllinien Colo320DM, Lovo C5 und LS174T eine etwa doppelt so hohe Expression als die Zelllinien HT29 G+ und SW1116.

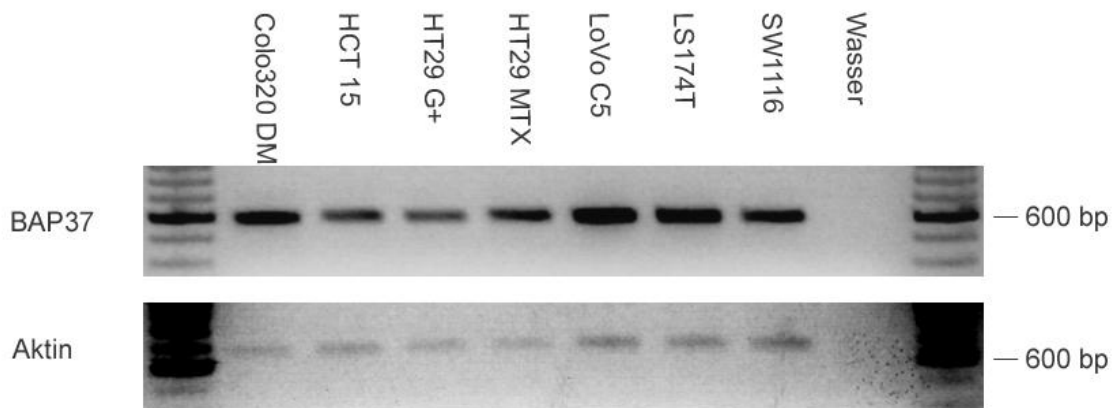


Abb.27: RT-PCR mit RNS verschiedener humaner Kolonkarzinomlinien. Oben: PCR mit einem BAP37-Primer, Unten: PCR mit β -Aktin-Primer zur quantitativen Analyse, Wasser: neg. Kontrolle Wasser als Probe für die PCR-Reaktion, zur besseren Übersicht wurde das Bild farblich invertiert. Marker: 100bp Marker

4.5.9 Analyse der Expression von Prohibitin in menschlichem Normal- und Tumorgewebe des Kolons mittels RT-PCR

Da der Antikörper durch die Immunisierung mit einer humanen Kolonkarzinom-Zelllinie entdeckt und gewonnen wurde, und ich Expression in verschiedenen kultivierten Kolonkarzinomlinien feststellen konnte, wollte ich wissen, ob es einen Unterschied in der Expression des Antigens in normalem gegenüber Tumorgewebe des Kolons gibt. Dazu wurde RNS aus Gewebeproben (freundl. Gabe v. Prof. Schlag, Berlin) isoliert und wie schon oben beschrieben, mit Hilfe einer RT-PCR auf die Expression von Prohibitin untersucht. Wie in der Abb.28 zu sehen ist, gibt es keine Unterschiede in der Expressionmenge von Prohibitin zwischen normalem und Tumorgewebe auf RNS Ebene.

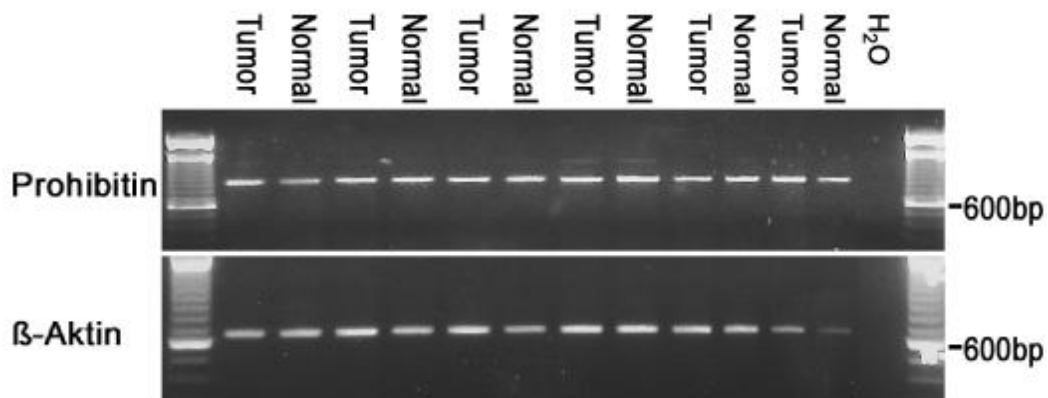


Abb.28: RT-PCR mit RNS von passenden Kolontumor und Kolon-Normalgewebe von sechs Krebspatienten. Oben: PCR mit einem Prohibitin-Primer, Unten: PCR mit β-Aktin-Primer zur quantitativen Analyse, Wasser: neg. Kontrolle Wasser als Probe für die PCR-Reaktion. Marker: 100bp Marker

4.5.10 Antigenexpression auf verschiedenen humanen Tumorzelllinien

Viele der schon beschriebenen Tumormarker sind zumeist nur für eine Tumorart spezifisch. Oft ist es auch so, dass sie anscheinend nur bei einer gewissen Untergruppe einer Tumorart spezifisch reagieren. Um zu testen, in wie weit die Reaktivität des Antikörpers spezifisch für bestimmte Tumorarten ist, testete ich mehrere humane Kolontumor-Zelllinien auf die Expressierung von Prohibitin / BAP37. Aber auch andere humane Tumorzelllinien, z.B. von Brusttumoren, von Pankreas-tumoren und von Leukämie-Zelllinien wurden von mir getestet. Dazu wurden die Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen und dann in einem FACS-Gerät analysiert. Die Zellen wurden nicht permeabilisiert, somit sind alle festgestellten Färbungen auf der Zelloberfläche. In der folgenden Liste sind alle von mir getesteten Zelllinien aufgeführt. Es zeigte sich, dass einige andere Kolonkarzinom-Zelllinien Prohibitin / BAP37 auf der Zelloberfläche exprimieren. Aber auch andere Tumorzelllinien erwiesen sich als positiv für die Expressierung des Antigens auf ihrer Zelloberfläche. Zudem wurde mit den Kolonkarzinom-Zelllinien eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. Die Zellen wurden auf „Chamber-Slides“ kultiviert und dann wie in 3.xx mit dem 1C1-Antikörper gefärbt.

Die Abb.29 zeigt, dass das Antigen in allen Zellen präsent ist. Man kann auf den Bildern erkennen, dass es im Zytoplasma lokalisiert ist, und bei manchen Zelllinien wahrscheinlich auch auf der Zelloberfläche exprimiert ist. Diese Ergebnisse stimmen mit denen aus der FACS-Analyse überein

Zelllinie	Antigenexpression	Zelllinie	Antigenexpression
Colo320 DM	++	BT549 (Brustkrebs)	++
HCT 15	-	MCF 7 (Brustkrebs)	+
HT29 G+	-	T47D (Brustkrebs)	-

HT29 MTX	-	SHP 77	-
Lovo	-	A-172	-
Lovo C5	++	NCI-M23 (Lunge)	+
LS174T	++	FADU	-
SW 1116	-	Capan1 (Pankreas)	++
HEL (Leukämie)	++	HNEpC (epithelial)	-
U937 (Leukämie)	++	NHDF (Fibroblasten)	-
WEHI 3D D+ (Leukämie)	++	HUVEC (endothelial)	++

Tab.7: FACS-Analyse mit dem 1C1-Antikörper auf verschiedenen humanen Krebszelllinien. (+): wenig Zellen gefärbt, (++): viele Zellen gefärbt. Die Zellen wurden nicht permeabilisiert, somit wurde nur Zelloberflächen-Exprimierung detektiert.

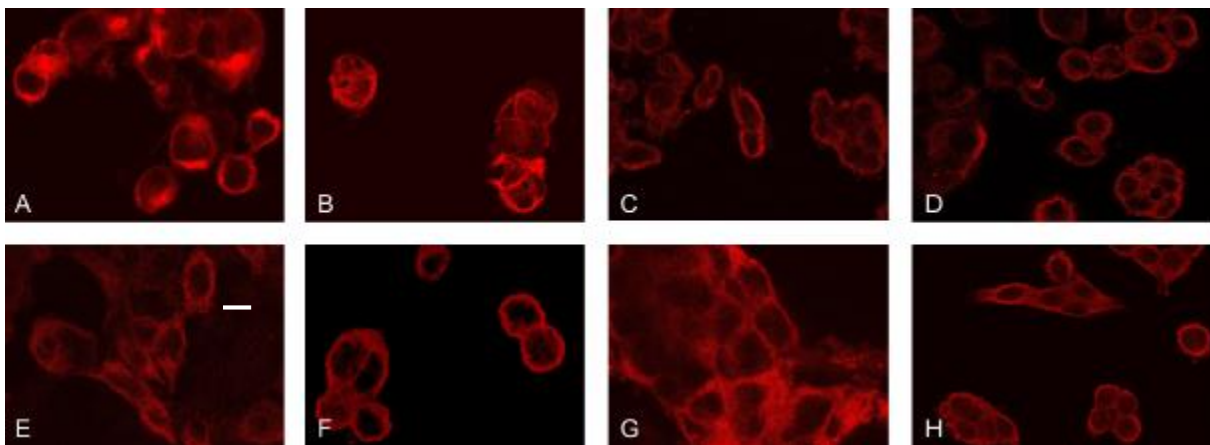


Abb.29: Immunfluoreszenz-Analyse mit dem 1C1-Antikörper auf verschiedenen humanen Kolonkarzinomlinien.

A: Colo320DM, B: Caco2, C: HCT15, D: HT29 G+, E: HT29 MTX, F: Lovo C5, G: LS174T, H: SW1116. Balken 25µm

4.5.11 Analyse der Proteinmenge auf der Zelloberfläche der Kolonkarzinomzellen durch IP

Da bei der RT-PCR Analyse alle Zelllinien etwa gleiche Mengen an Prohibitin aufwiesen, in der FACS-Analyse aber nicht alle Kolonkarzinom-Zelllinien eine Färbung nach 1C1-Antikörperbehandlung zeigten, wollte ich die Oberflächenexpression von Prohibitin durch eine Immunpräzipitation von Zellen, die zuvor biotinyliert wurden, nachweisen.

Die gleiche Anzahl von Zellen jeder Zelllinie wurde für eine Stunde mit Sulfo-NHS-LC-Biotin inkubiert, das aufgrund seiner Struktur nur an Proteine auf der Zelloberfläche bindet. Nach der Inkubationszeit wurde das überschüssige Biotin herausgewaschen, die Zellen mit Triton X-100 Lysispuffer versetzt und laut Protokoll eine IP durchgeführt. Nach dem Lauf des Gels wurden die Proteine auf eine Membran übertragen (blot) und mit Streptavidin-HRP Komplex, das an das Biotin bindet, für eine Stunde inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch die ECL-Methode. Wie auf der Abb.30 zu sehen ist, konnte auf den Colo320DM-Zellen viel Prohibitin / BAP37 nachgewiesen werden, während die anderen Zellen ein schwächeres Signal für beide Proteine zeigten. Dies legt nahe, dass die Verteilung der Proteine in den Zellen unterschiedlich sein muss, da ja die PCR-Ergebnisse gleiche Mengen an Prohibitin-RNS in den verschiedenen Zellen zeigt.

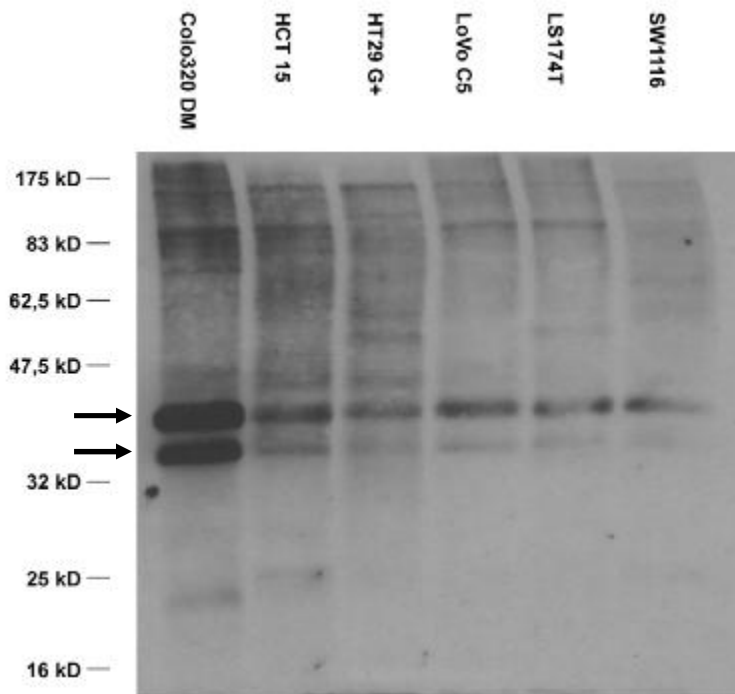


Abb.30: IP mit verschiedenen Kolonkarzinomlinien, die zuvor biotinyliert wurden
 IP wurde mit dem 1C1-Ak durchgeführt. Die gleiche Anzahl von Zellen wurde für jede Zelllinie für die IP benutzt. Pfeile weisen auf BAP37 und Prohibitin hin.

4.5.12 Analyse der Lokalisierung des Antigens in Zellen mit dem 1C1-Antikörper und einem kommerziell erworbenen Prohibitin-Antikörper

Aufgrund der Diskrepanz der Ergebnisse der RT-PCRs und der FACS-Analysen, bzw. der IP-Ergebnisse, wollte ich durch Immunfluoreszenz-Analysen die genaue Lokalisierung meines Antigens feststellen. Um eine differenzierte Aussage machen zu können, wurde für die Analysen ein kommerziell erworbener monoklonaler Prohibitin-Antikörper hinzugezogen. Colo320DM Zellen und SW1116 Zellen wurden, nachdem sie auf „Chamber-slides“ kultiviert wurden, fixiert und permeabilisiert und anschließend einer Doppelfärbung mit dem 1C1-Antikörper und dem Prohibitin-Antikörper unterzogen. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden dann mit einem konfokalen Mikroskop analysiert.

In der Abb.31 ist zu sehen, dass mein Antikörper ein Antigen bindet, das in den Colo320DM Zellen eine Lokalisierung im Zytoplasma und an der Plasma-/Zellmembran aufweist (grüne Färbung). Im Gegensatz dazu steht die ausschliesslich nukleäre Färbung mit dem monoklonalen Prohibitin-Antikörper (rote Färbung). In den SW1116 Zellen findet sich das gleiche Färbemuster, mit der Ausnahme, dass es keine oder kaum Antikörperbindung auf der Zelloberfläche gibt. Diese Ergebnisse sind konform mit den Ergebnissen der FACS-Analyse und der Immunpräzipitation.

Somit scheint der 1C1-Antikörper, obwohl er, wie vorher gezeigt, Prohibitin und BAP37 präzipitiert, ein anderes Epitop oder einen anderen Konformationszustand des Proteins/der Proteine zu erkennen, welches mit einer unterschiedlichen Lokalisierung in den Zellen einhergeht.

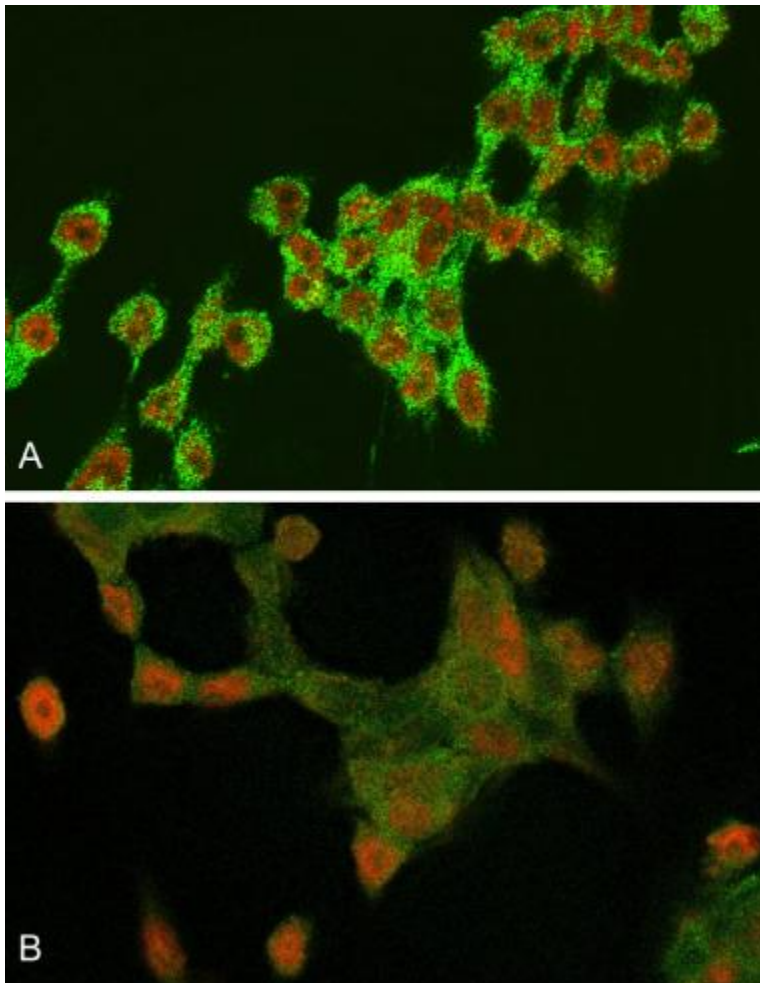


Abb.31: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit dem 1C1-Ak. und einem monoklonalen Prohibitin-Ak.
A: Colo320 DM-Zellen
B: SW1116-Zellen
1C1-Ak.: grüne Färbung
mProhibitin: rote Färbung
Das keine gelbe Färbung zu sehen ist, heisst, dass die beiden Antikörper Antigene erkennen, die getrennt lokalisiert sind.

4.5.13 Analyse der Lokalisierung des Antigens durch Fraktionierung von Zytoplasma und Nukleus

Um zusätzliche Informationen über die Lokalisierung des Antigens zu bekommen, wurden von mir Colo320 Zellen fraktioniert. Die zytoplasmatischen Anteile wurden von den nukleären getrennt, in Probenpuffer aufgenommen und aufs Gel geladen. Nach dem Gellauf wurden die Proteine auf eine Membran übertragen (Blot) und dann mit den verschiedenen Antikörpern getestet. Als erstes ist in der Abb.32 zu sehen, dass die Fraktionierung funktioniert hat. Lamin ist nur im Nukleus vorhanden und der Lamin-Antikörper bindet auch nur an der nukleären Fraktion. Bei Paxilin ist es genau umgekehrt, es ist nur im Zytoplasma lokalisiert, was durch das Testen mit dem Paxilin Antikörper auch gezeigt werden kann.

Sowohl der monoklonale Prohibitin-Antikörper als auch der polyklonale Prohibitin-Antikörper binden in beiden Fraktionen etwa gleich stark. Somit sind beide Proteine in beiden Fraktionen vorhanden. Da mein Antikörper auf einem Western-Blot nicht funktioniert, habe ich mit beiden Fraktionen zuerst eine Immunpräzipitation durchgeführt und dann die Membran mit dem polyklonalen Prohibitin-Antikörper getestet. Auch hier zeigt sich, dass mein Antikörper in beiden Fraktionen das Antigen präzipitieren kann. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit den Immunfluoreszenz-Ergebnissen überein, in der ich mit meinem Antikörper keine nukleäre Expression feststellen kann. Da in den beiden Systemen verschiedene Bedingungen herrschen, bei der IF eine eher native und bei der Fraktionierung liegen die Proteine denaturiert vor, kann man die Ergebnisse als weiteren Hinweis für die wahrscheinliche Konformationsänderung des Antigens in der nativen Form, die speziell von meinem 1C1-Antikörper erkannt wird, interpretieren.

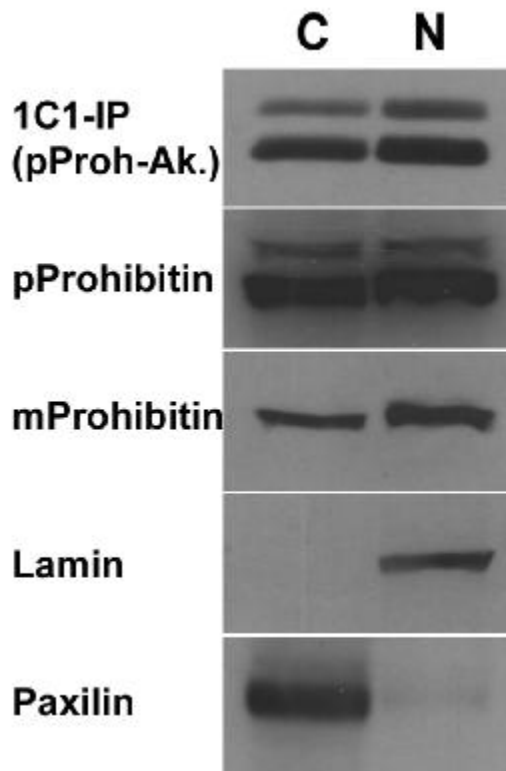


Abb.32: Fraktionierung von Zytoplasma und Nucleus von Colo320 DM-Zellen mit anschließendem Gellauf und Western Blot der fraktionierten Proteine.

1C1-IP: Immunpräzipitation beider Fraktionen mit dem 1C1-Ak. Getestet mit dem polyklonalen Prohibitin-Ak.

pProhibitin: Western Blot beider Fraktionen mit polyklonalem Prohibitin-Ak. getestet.

mProhibitin: Western Blot beider Fraktionen mit monoklonalem Prohibitin-Ak. getestet.

Lamin + Paxilin: Überprüfung der Fraktionierung, Lamin ist nur im Nucleus lokalisiert, Paxilin nur im Zytoplasma.

4.5.14 Immunhistochemische Analyse der Expression von Prohibitin/Bap37 in verschiedenen humanen Tumorgeweben

Erst seit wenigen Jahren gibt es die Möglichkeit die Expression eines Antigens in vielen verschiedenen Geweben in einem Versuch zu analysieren. Dazu werden die Gewebe in einen Paraffin-Block gegossen, die man dann als Dünnschnitte auf Objektträger bringt. Diese Schnitte bezeichnet man als Gewebe-„Micro-Arrays“.

Ein solches Gewebe-„Micro-Array“ mit 59 verschiedenen Tumorgeweben und den entsprechenden Normalgeweben der gleichen Patienten wurde von mir immunhistochemisch mit dem polyklonalen Prohibitin-Antikörper auf die Expression des Antigens untersucht. Wie die Tab.8 und die Abb.33 zeigen, ist das Antigen in vielen Tumoren exprimiert. Es gibt zwar auch eine Expression in einigen der Normalgewebe, aber die Bilder zeigen deutlich, dass die Expression in vielen Tumorgeweben stark erhöht ist. Die Lokalisierung des Antigens scheint zumeist zytoplasmatisch, bei einigen Schnitten ist die Färbung aber so stark, dass man nicht sagen kann, ob das Antigen nicht auch auf der Zelloberfläche exprimiert ist.

Krebsart/Gewebe	Expr. im Tumor	Expr. im Normalgewebe	Höhere Expr. Tumor > entspr. Normalgewebe	Niedrigere Expr. Tumor > entspr. Normalgewebe
Magenkrebs	4/10	4/10	2/10	1/10
Ösophagus-Krebs	9/10	3/10	5/10	0/10
Lungenkrebs	8/10	2/10	8/10	0/10
Kolorektaler Krebs	6/10	4/10	5/10	0/10
Thyroider Krebs	9/10	4/10	7/10	0/10
Renales Zell-Karzinom	7/9	9/9	2/9	2/9

Tab.8: IHC-Analyse der Prohibitin/BAP37 Expression in passenden Tumor/Normal-Geweben auf einem Gewebe-„Microarray“.

Expr. Im Tumor: Gesamtanzahl der Tumorgewebe, die die Antigene exprimieren.

Expr. im Normalgewebe: Gesamtanzahl der Normalgewebe, die die Antigene exprimieren.

Höhere Expr. Tumor > entspr. Normalgewebe: Anzahl der passenden Tumor/Normalgewebe, die eine erhöhte Expression der Antigene im Tumor aufweisen.

Niedrigere Expr. Tumor > entspr. Normalgewebe: Anzahl der passenden Tumor/Normalgewebe, die eine niedrigere Expression der Antigene im Tumor als im passenden Normalgewebe aufweisen.

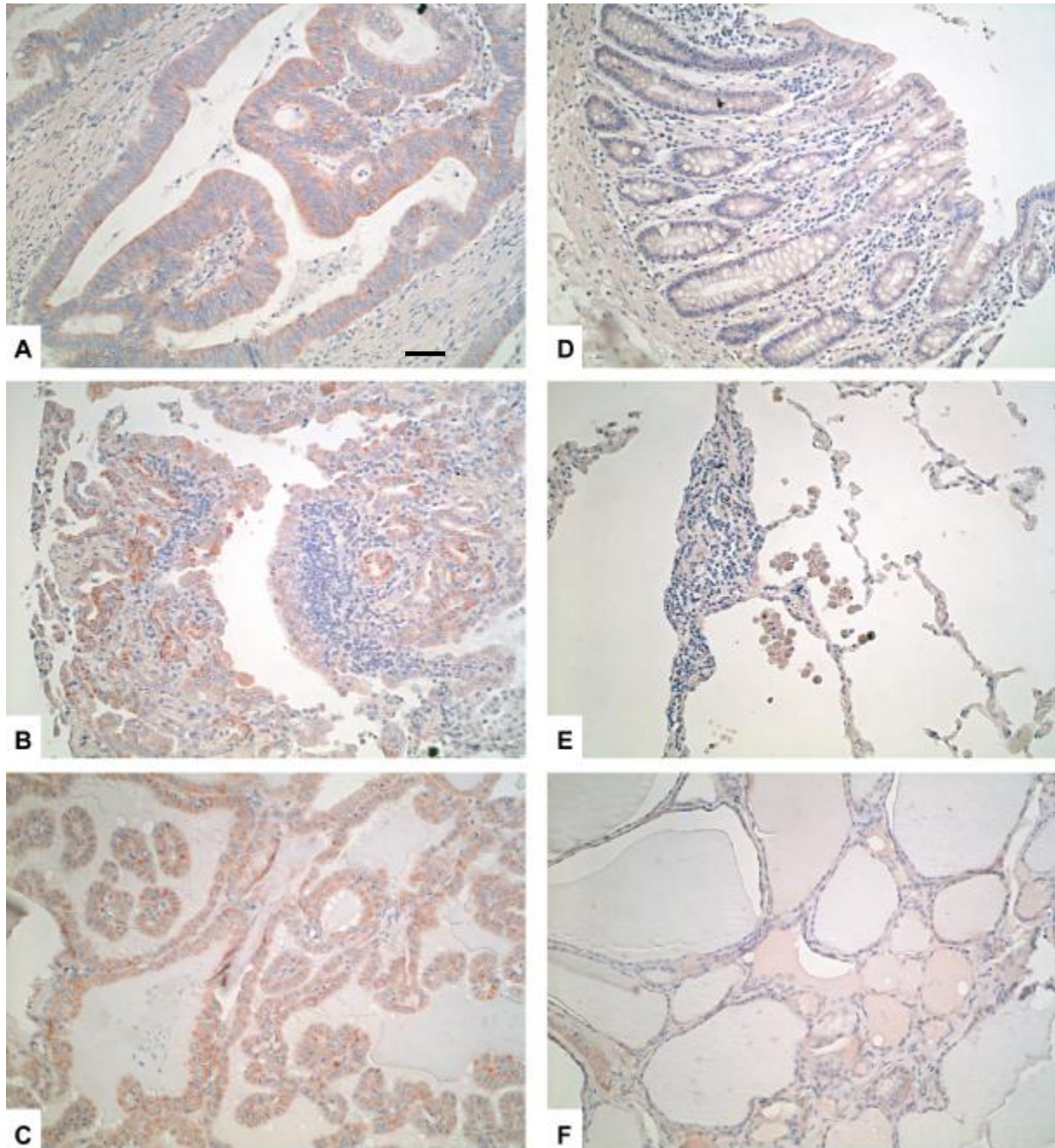


Abb.33: Immunhistochemische Analyse der Prohibitin/BAP37 Expression in passenden Tumor/Normal-Geweben auf einem Gewebe-„Microarray“.

A-C: Tumorgewebe, D-F: entspr. Normalgewebe

A+D: Kolon, B+E: Lunge, C+F: Thyroidgewebe

Prohibitin/BAP37-Expression: rote Färbung

Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blaue Färbung), Balken: 100µm

4.6 Diskussion der Ergebnisse der Serum-Immunisierung

In der hier vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass die Immunisierungsmethode von mir etabliert werden konnte. Es gelang mir Antikörper zu isolieren, die entweder auf der Colo320 DM Zelllinie binden oder in einem Western Blot reaktiv gegen Proteine eines Colo320 DM Lysats sind. Desweiteren konnte ich die Antigene isolieren, die von einem der Antikörper erkannt werden und beginnen, diese zu charakterisieren.

Es gibt in der Literatur verschiedene Möglichkeiten, Antigene zu identifizieren, die von Tumorzellen sezerniert oder abgespalten werden, die dann als Serum-Tumormarker für die Diagnose, Überwachung des Krankheitsverlaufs oder die Therapie von Krebserkrankungen benutzt werden können. Man kann durch subtraktive Methoden, die nicht auf spezifische Gruppen von Molekülen zielen (z.B. SSH), erst einmal Unterschiede zwischen Normalgewebe und Tumor feststellen, um dann in diesem Pool gezielt nach Antigenen zu suchen, die eine Zelloberflächen-Lokalisierung aufweisen, oder sezerniert werden (Buckhaults et al., 2001; Goldenberg et al., 2002), oder man stösst bei der Auswertung und Charakterisierung der Ergebnisse auf solche Antigene (Ismail et al., 2000).

Wir haben hier ganz gezielt unsere Methode darauf ausgerichtet, Antigene zu finden, die vom einem humanen Tumor sezerniert werden und im Serum nachzuweisen sind. Um dies zu bewerkstelligen, haben wir uns überlegt, wie wir die Immunantwort gezielt gegen solche Antigene generieren können. Durch den Einsatz von Nacktmäusen ist es möglich, mit humanen Tumorzellen einen Tumor in diesen Mäusen wachsen zu lassen, deren Serum dann die Quelle der vom Tumor sezernierten Proteine darstellt. Um die Immunantwort in den normalen Mäusen gegen die normalen Serumproteine möglichst gering zu halten und dadurch die Immunantwort gegen die sezernierten Proteine des Tumor möglichst zu verstärken, benutzten wir für die Immunisierung normale Balb/C-Mäuse, die den gleichen genetischen Hintergrund wie die Balb/C-Nacktmäuse haben, die zur Tumorsерum-Produktion eingesetzt wurden.

Wie die anschließende Hybridomabildung und das Testen der Antikörper ergab, war unsere Strategie erfolgreich. Ich erhielt acht Antikörper, die eine Reaktion mit den Colo320 DM Zellen zeigten. In der weiteren Analyse erwies sich einer der Antikörper als besonders interessant, da das Antigen auf mehreren humanen Tumorzelllinien, die von mir getestet wurden, exprimiert ist. Da diese Zelllinien nicht alle Kolonkarzinom-Linien sind, das Antigen unter anderem auf drei humanen Leukämie-Zelllinien, einer Brustkrebslinie und einer Pankreaskrebslinie, sowie in geringerer Menge auf einer weiteren Brustkrebslinie und einer Lungenkrebslinie exprimiert ist, schien dieses Antigen doch von großem Interesse für eine weitere Charakterisierung. Dieses Antigen ist anscheinend nicht für eine Krebsart spezifisch, es könnte für die Diagnose und Therapie von verschiedenen Krebserkrankungen dienen.

Es war mir möglich, durch eine Immunpräzipitation das Antigen zu isolieren. Die Identität der Antigene stellte sich als Prohibitin und BAP37 heraus.

Wie schon einleitend im Ergebnisteil beschrieben, sind diese beiden Gene noch nicht lange bekannt (Prohibitin: 1991 (Nuell et al.); BAP37: 1994 (Terashima et al.)). Beiden Proteinen wurden in mehreren Studien verschiedene Funktionen zugewiesen.

So interagiert Prohibitin mit RB und reguliert dadurch die Funktion von E2F (Wang et al., 1999a; 1999b). Prohibitin und BAP37 bilden laut mehrerer Studien einen Komplex, der in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und dort als Chaperon für die Stabilisierung von mitochondrialen Proteinen fungiert (Nijtmans et al., 1994), auf mitochondrialen Stress reagieren und während der Seneszenz herabreguliert werden und somit Einfluss auf die replikative Lebensspanne von Zellen nehmen (Coates et al., 1997; 2001). Dem BAP37 Protein wird unter dem Namen REA (repressor of estrogen receptor activity) eine Repression der transkriptionellen Aktivität des ER durch Bindung an den ER, und indem er kompetitiv das Binden von Koaktivatoren hemmt, zugesprochen (Montano et al., 1999; Delage-Mourroux et al., 2000). Beide Proteine sollen mit dem IgM-Rezeptor auf B-Zellen assoziiert sein (Terashima et al., 1994). Aber es wurde kein direkter Beweis erbracht, dass sie auf der Zelloberfläche zu finden sind.

Ich konnte in meinen Versuchen zeigen, dass Prohibitin und BAP37 auf der Zelloberfläche verschiedener humaner Tumorzelllinien zu finden sind, dass Prohibitin und/oder BAP37 im Serum tumortragender Mäuse zu finden ist und somit entweder sezerniert oder von den Tumorzellen abgespalten wird. Mit diesem Ergebnis ist die Überprüfung des Immunisierungsprinzips erfolgreich durchgeführt worden. Die Tatsache der Oberflächenexprimierung und der Sezernierung/Abspaltung wurde noch von keiner Studie belegt. Ich konnte mittels PCR-Analyse zeigen, dass Prohibitin und BAP37 in vielen Kolonkarzinomlinien exprimiert werden, dass aber Prohibitin in gleicher Menge in Tumor- und Normalgeweben des von Kolonkrebpatienten exprimiert wird (Abb.28). Auch andere Studien befassten sich mit der Expression der beiden Gene in Tumoren und Tumorzelllinien, die sowohl eine Überexpression fanden (Asamoto et al., 1994) als auch keine Veränderung der Expression im Tumor im Vergleich zu passenden Normalgeweben (Murphy et al., 2000). Die immunhistochemischen Untersuchungen von mir mit einem polyklonalen Antikörper, der beide Proteine erkennt, auf zusammengehörigen Tumor- und Normalgeweben, ergab für einige Tumorarten eine höhere Expression im Tumor als im Normalgewebe (Tab.8).

Wenn man diese Ergebnisse zusammenfasst, dann kann es sein, dass entweder BAP37 oder ein Komplex aus beiden Proteinen mit einer veränderten Konformation für die verstärkte Erkennung durch den Antikörper verantwortlich ist. Diese Annahme wird durch meine Immunfluoreszenz-Untersuchungen gestützt, die zeigen, dass der 1C1-Antikörper das Antigen nur im Zytoplasma erkennt, obwohl Prohibitin als auch BAP37 im Nukleus vorkommen und zumindest Prohibitin im Nukleus von einem monoklonalen Prohibitin-Antikörper erkannt wird, der aber in der IF kein Prohibitin im Zytoplasma erkennt (Abb.31). Auf einem Western Blot kann dieser monoklonale Antikörper aber sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus Prohibitin nachweisen. Solche Konformationsänderungen, die z.B mit einer veränderten Phosphorylierung einhergehen, die einen Einfluss auf die Lokalisierung und somit auch auf die Funktion des Proteins haben, sind auch von anderen Proteinen/Proteinkomplexen bekannt. So wird durch die Phosphorylierung von PTEN, einem Tumor-Suppressor, die Rekrutierung von PTEN in einen Protein-Komplex inhibiert (Vazquez et al., 2001).

Ein anderes Beispiel für solche funktionellen Veränderungen durch Konformationsänderungen: Für den Tumorsuppressor p53 wird in mehreren Studien beschrieben, dass erhöhte Stickstoffmonoxyd (NO) Freisetzung in Tumorzellen zu einer Konformationsänderung führt, die die Funktion von p53 beeinträchtigt oder verändert (Calmels et al., 1997; Chazotte-Aubert et al., 2001)

Den beiden Proteinen werden Funktionen im Nukleus und im Zytoplasma zugewiesen. Welche Funktion könnte das Antigen in der Tumorzelle haben, das durch den 1C1-Antikörper erkannt wird? Die beiden Proteine werden während der Seneszenz herunterreguliert (Coates et al., 2001). Der Knockout der beiden Gene in Hefe führte zu einer sehr früh einsetzenden Seneszenz der Hefezellen. Dadurch dass sie in den Tumorzellen stetig exprimiert sind, könnten sie die Tumorzellen vor der Seneszenz schützen. Zusätzlich erklärt Coates in dieser Veröffentlichung, dass die beiden Proteine auf veränderten Metabolismus reagieren: wenn Zellen mit Thiamphenikol, einem spezifischen Inhibitor für mitochondriale Proteinsynthese, behandelt werden, werden beide Proteine hochreguliert. Weiter schreibt er, dass es diese Metabolismusveränderungen auch bei Tumorzellen gibt, die trotz vorhandenen Sauerstoffs die Energie durch Glykolyse gewinnen („Warburg-Effekt“, Dang & Semenza, 1999), und Primärtumore konsistent hohe Expression von Prohibitin und BAP37 zeigen. Diese Funktionen könnten ebenfalls in den von mir untersuchten Tumorzellen angesprochen werden.

Warum sie auf der Zelloberfläche von Tumorzellen exprimiert werden und von Tumorzellen sezerniert oder abgespalten werden, ist eine Frage, die noch zu klären ist. Möglich wäre, dass die beiden Proteine über den IgM-Rezeptor, an den sie kovalent binden (Terashima et al., 1994) ein Signal kaskadieren, das die Tumorzellen proliferieren lässt. Es ist bekannt, dass der IgM-Rezeptor die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen steuert (Hombach et al., 1990; Clark & Shu, 1987). Da bis heute, ausser bei Leukämie-Zellen, keine IgM-Rezeptor-Expression auf Tumorzellen gefunden wurde, könnte es sein, dass andere Rezeptoren mit den beiden Proteinen eine Einheit bilden, um diese Funktion auszuüben.

Desweiteren ist in einer neuen Studie gezeigt worden, dass Prohibitin in Hefezellen mit den Proteinen Emp24p, Erv25, Erp1 und Erp2 einen Komplex bildet (Gavin et al., 2002). Die genannten Proteine sind an der Vesikelbildung beteiligt und dafür verantwortlich, dass Proteine vom ER zum Golgi-Apparat transportiert werden oder sezerniert werden (Belden & Barlowe, 1996; 2001; Marzioch et al., 1999). Wenn in humanen Zellen Prohibitin in einem ähnlichen Komplex zu finden ist, könnte das auch der Grund sein, warum Prohibitin und/oder BAP37 auf der Zelloberfläche zu finden sind oder sezerniert werden.

Diese Erklärungen sind Hypothesen oder Ansätze einer Aufklärung der Funktion der Proteine im Tumor.

Damit der Antikörper als Marker in der Diagnose und Therapie genutzt werden kann, müsste erst einmal überprüft werden, ob das Antigen im Serum von Patienten nachweisbar ist. Eine Möglichkeit wäre, den Sandwich-ELISA zu nutzen, um humane Seren zu testen. Aber auch andere Nachweismethoden könnten Anwendung finden, wie z.B. eine IP mit den Seren mit anschließender Detektion des Antigens durch einen Western Blot. Auch sollte überprüft werden, ob die anderen humanen Krebszelllinien, die das Antigen auf der Oberfläche exprimieren, dieses sezernieren. Dazu könnte man ebenfalls den Sandwich-ELISA oder eine IP einsetzen, um Zellkulturüberstände der entsprechenden Zelllinien zu testen.

Um die Expressionstudien zu komplettieren, sollte die BAP37-Expression in Tumor-/Normal-Gewebe mittels PCR auf RNS-Ebene und immunhistochemisch auf Proteinebene untersucht werden.

Um mehr über die Funktion zu erfahren, sollte die Hypothese überprüft werden, ob der 1C1-Antikörper einen Zustand des Antigens erkennt, der durch eine Konformationsänderung charakterisiert ist. Wenn die Veränderung durch eine Phosphorylierung hervorgerufen wird, könnte man COLO320 DM Zellen mit radioaktiven Phosphor markieren und dann mit dem 1C1-Antikörper eine IP durchführen, um zu sehen, ob das Antigen phosphoryliert ist.

Um die Frage zu beantworten, welche Funktion das Antigen auf der Zelloberfläche hat, könnte man nach Interaktionspartnern suchen, die vielleicht eine genauere Hypothese zulassen. Der IgM-Rezeptor könnte zumindest auf den Leukämie-Zelllinien ein Bindungs- und Funktionspartner sein. Zu überprüfen ist, ob auch auf normalen B-Zellen Prohibitin und BAP37 zu finden sind, oder ob diese Expression nur auf Krebszellen auftritt.

Ob der Antikörper ein funktionelles Werkzeug darstellt, kann in Tumorexperimenten in Nacktmäusen getestet werden. Dabei wird den Mäusen die COLO320 DM Zelllinie gespritzt und dann über 4 Wochen mit dem 1C1-Antikörper behandelt. Damit wird überprüft, ob der Antikörper einen Einfluss auf die Tumorprogression hat.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass meine Versuche ein interessantes Antigen aufgedeckt haben, das vielleicht als Tumormarker in der Diagnose, der Therapie und zur Verlaufsüberwachung von Krebserkrankungen eingesetzt werden kann. Es scheint aber auch eine Rolle in Tumorprogression oder Metastasierung zu spielen. Dadurch wird es auch für die Grundlagenforschung interessant, um weitere funktionelle Bausteine dieser Prozesse zu identifizieren. Es bleibt noch viel zu tun, um die Funktion des Antigens in der Tumorzelle, aber auch in normalen Zellen aufzuklären.

5 Referenzliste

- Ahlquist,D.A., Skoletsy,J.E., Boynton,K.A., Harrington,J.J., Mahoney,D.W., Pierceall,W.E., Thibodeau,S.N., and Shuber,A.P. (2000). Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* 119, 1219-1227.
- Akahani,S., Nangia-Makker,P., Inohara,H., Kim,H.R., and Raz,A. (1997). Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res.* 57, 5272-5276.
- Akiba,J., Yano,H., Ogasawara,S., Higaki,K., and Kojiro,M. (2001). Expression and function of interleukin-8 in human hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* 18, 257-264.
- Alitalo,K., Kurkinen,M., Vaheri,A., Virtanen,I., Rohde,H., and Timpl,R. (1980). Basal lamina glycoproteins are produced by neuroblastoma cells. *Nature* 287, 465-466.
- Alizadeh,A.A., Eisen,M.B., Davis,R.E., Ma,C., Lossos,I.S., Rosenwald,A., Boldrick,J.C., Sabet,H., Tran,T., Yu,X., Powell,J.I., Yang,L., Marti,G.E., Moore,T., Hudson,J., Jr., Lu,L., Lewis,D.B., Tibshirani,R., Sherlock,G., Chan,W.C., Greiner,T.C., Weisenburger,D.D., Armitage,J.O., Warnke,R., Staudt,L.M., and . (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503-511.
- Alsabti,E. (1979). Carcinoembryonic antigen (CEA) as prognostic marker in colonic cancer. *J. Surg. Oncol.* 12, 127-129.
- Asamoto,M. and Cohen,S.M. (1994). Prohibitin gene is overexpressed but not mutated in rat bladder carcinomas and cell lines. *Cancer Lett.* 83, 201-207.
- Asgeirsson,K.S., Jnverted question markonasson,J.G., Tryggvadinverted question,m.L., Olafsdinverted question,m.K., Sigurgeirsdinverted,q.m., Jr., Ingvarsson,S., and Ogmundsdinverted question markottir,H.M. (2000). Altered expression of E-cadherin in breast cancer. patterns, mechanisms and clinical significance. *Eur. J. Cancer* 36, 1098-1106.
- Aznavoorian,S., Murphy,A.N., Stetler-Stevenson,W.G., and Liotta,L.A. (1993). Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* 71, 1368-1383.
- Ballesta,A.M., Molina,R., Filella,X., Jo,J., and Gimenez,N. (1995). Carcinoembryonic antigen in staging and follow-up of patients with solid tumors. *Tumour. Biol.* 16, 32-41.
- Bar-Eli,M. (1999). Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma. *Pathobiology* 67, 12-18.
- Barak,M., Mecz,Y., Lurie,A., and Gruener,N. (1989). Evaluation of prostate-specific antigen as a marker for adenocarcinoma of the prostate. *J. Lab Clin. Med.* 113, 598-603.
- Barondes,S.H., Castronovo,V., Cooper,D.N., Cummings,R.D., Drickamer,K., Feizi,T., Gitt,M.A., Hirabayashi,J., Hughes,C., Kasai,K., and . (1994). Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 76, 597-598.
- Belden,W.J. and Barlowe,C. (1996). Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J. Biol. Chem.* 271, 26939-26946.
- Belden,W.J. and Barlowe,C. (2001). Distinct roles for the cytoplasmic tail sequences of Emp24p and Erv25p in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *J. Biol. Chem.* 276, 43040-43048.

- Bidon,N., Brichory,F., Bourguet,P., Le Pennec,J.P., and Dazord,L. (2001). Galectin-8: a complex sub-family of galectins (Review). *Int. J. Mol. Med.* 8, 245-250.
- Boland,C.R., Sato,J., Saito,K., Carethers,J.M., Marra,G., Laghi,L., and Chauhan,D.P. (1998). Genetic instability and chromosomal aberrations in colorectal cancer: a review of the current models. *Cancer Detect. Prev.* 22, 377-382.
- Bos,J.L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49, 4682-4689.
- Boukerche,H., Baril,P., Tabone,E., Berard,F., Sanhadji,K., Balme,B., Wolf,F., Perrot,H., and Thomas,L. (2000). A new Mr 55,000 surface protein implicated in melanoma progression: association with a metastatic phenotype. *Cancer Res.* 60, 5848-5856.
- Bresalier,R.S., Mazurek,N., Sternberg,L.R., Byrd,J.C., Yunker,C.K., Nangia-Makker,P., and Raz,A. (1998). Metastasis of human colon cancer is altered by modifying expression of the beta-galactoside-binding protein galectin 3. *Gastroenterology* 115, 287-296.
- Brooks,P.C., Lin,J.M., French,D.L., and Quigley,J.P. (1993). Subtractive immunization yields monoclonal antibodies that specifically inhibit metastasis. *J. Cell Biol.* 122, 1351-1359.
- Buckhaults,P., Rago,C., St Croix,B., Romans,K.E., Saha,S., Zhang,L., Vogelstein,B., and Kinzler,K.W. (2001). Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors. *Cancer Res.* 61, 6996-7001.
- Bukowski,R.M. (2000). Cytokine combinations: therapeutic use in patients with advanced renal cell carcinoma. *Semin. Oncol.* 27, 204-212.
- Buley,I.D. and Roskell,D.E. (2000). Fine-needle aspiration cytology in tumour diagnosis: uses and limitations. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)* 12, 166-171.
- Bullock,S.L., Johnson,T.M., Bao,Q., Hughes,R.C., Winyard,P.J., and Woolf,A.S. (2001). Galectin-3 modulates ureteric bud branching in organ culture of the developing mouse kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 515-523.
- Calmels,S., Hainaut,P., and Ohshima,H. (1997). Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res.* 57, 3365-3369.
- Chazotte-Aubert,L., Pluquet,O., Hainaut,P., and Ohshima,H. (2001). Nitric oxide prevents gamma-radiation-induced cell cycle arrest by impairing p53 function in MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 766-771.
- Choufani,G., Nagy,N., Saussez,S., Marchant,H., Bisschop,P., Burchert,M., Danguy,A., Louryan,S., Salmon,I., Gabius,H.J., Kiss,R., and Hassid,S. (1999). The levels of expression of galectin-1, galectin-3, and the Thomsen-Friedenreich antigen and their binding sites decrease as clinical aggressiveness increases in head and neck cancers. *Cancer* 86, 2353-2363.
- Chung,S., Kim,M., Choi,W., Chung,J., and Lee,K. (2000). Expression of translationally controlled tumor protein mRNA in human colon cancer. *Cancer Lett.* 156, 185-190.
- Clark,E.A. and Shu,G. (1987). Activation of human B cell proliferation through surface Bp35 (CD20) polypeptides or immunoglobulin receptors. *J. Immunol.* 138, 720-725.
- Coates,P.J., Jamieson,D.J., Smart,K., Prescott,A.R., and Hall,P.A. (1997). The prohibitin family of mitochondrial proteins regulate replicative lifespan. *Curr. Biol.* 7, 607-610.
- Coates,P.J., Nenutil,R., McGregor,A., Picksley,S.M., Crouch,D.H., Hall,P.A., and Wright,E.G. (2001). Mammalian prohibitin proteins respond to mitochondrial stress and decrease during cellular senescence. *Exp. Cell Res.* 265, 262-273.

Cohen,L.S., Escobar,P.F., Scharm,C., Glimco,B., and Fishman,D.A. (2001). Three-dimensional power Doppler ultrasound improves the diagnostic accuracy for ovarian cancer prediction. *Gynecol. Oncol.* **82**, 40-48.

Colnot,C., Ripoche,M.A., Milon,G., Montagutelli,X., Crocker,P.R., and Poirier,F. (1998). Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice. *Immunology* **94**, 290-296.

Cooke,T., Reeves,J., Lannigan,A., and Stanton,P. (2001). The value of the human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) as a prognostic marker. *Eur. J. Cancer* **37 Suppl 1**, S3-10.

Cooper,G.M. (1982). Cellular transforming genes. *Science* **217**, 801-806.

Daneker,G.W., Lund,S.A., Caughman,S.W., Staley,C.A., and Wood,W.C. (1996). Anti-metastatic prostacyclins inhibit the adhesion of colon carcinoma to endothelial cells by blocking E-selectin expression. *Clin. Exp. Metastasis* **14**, 230-238.

Dang,C.V. and Semenza,G.L. (1999). Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 68-72.

de Bruijn,H.W., Duk,J.M., van der Zee,A.G., Pras,E., Willemse,P.H., Boonstra,H., Hollema,H., Mourits,M.J., de Vries,E.G., and Aalders,J.G. (1998). The clinical value of squamous cell carcinoma antigen in cancer of the uterine cervix. *Tumour. Biol.* **19**, 505-516.

Delage-Mourroux,R., Martini,P.G., Choi,I., Kraichely,D.M., Hoeksema,J., and Katzenellenbogen,B.S. (2000). Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA) and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA. *J. Biol. Chem.* **275**, 35848-35856.

Dunn,S.E., Ehrlich,M., Sharp,N.J., Reiss,K., Solomon,G., Hawkins,R., Baserga,R., and Barrett,J.C. (1998). A dominant negative mutant of the insulin-like growth factor-I receptor inhibits the adhesion, invasion, and metastasis of breast cancer. *Cancer Res.* **58**, 3353-3361.

Eveleth,D.D., Jr. and Marsh,J.L. (1986). Sequence and expression of the Cc gene, a member of the dopa decarboxylase gene cluster of *Drosophila*: possible translational regulation. *Nucleic Acids Res.* **14**, 6169-6183.

Fearon,E.R. and Vogelstein,B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767.

Ferrero-Pous,M., Hacene,K., Bouchet,C., Le,D., V, Tubiana-Hulin,M., and Spyrtos,F. (2000). Relationship between c-erbB-2 and other tumor characteristics in breast cancer prognosis. *Clin. Cancer Res.* **6**, 4745-4754.

Fidler,I.J., Gersten,D.M., and Hart,I.R. (1978). The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv. Cancer Res.* **28**, 149-250.

Folkman,J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1**, 27-31.

Frisch,S.M. and Francis,H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* **124**, 619-626.

Gavin,A.C., Bosche,M., Krause,R., Grandi,P., Marzioch,M., Bauer,A., Schultz,J., Rick,J.M., Michon,A.M., Cruciat,C.M., Remor,M., Hofert,C., Schelder,M., Brajenovic,M., Ruffner,H., Merino,A., Klein,K., Hudak,M., Dickson,D., Rudi,T., Gnau,V., Bauch,A., Bastuck,S., Huhse,B., Leutwein,C., Heurtier,M.A., Copley,R.R., Edlmann,A., Querfurth,E., Rybin,V., Drewes,G., Raida,M., Bouwmeester,T., Bork,P., Seraphin,B., Kuster,B., Neubauer,G., and Superti-Furga,G. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-147.

- Gebauer,G. and Muller-Ruchholtz,W. (1997). Tumor marker concentrations in normal and malignant tissues of colorectal cancer patients and their prognostic relevance. *Anticancer Res.* 17, 2939-2942.
- Goldenberg,D., Ayesh,S., Schneider,T., Pappo,O., Jurim,O., Eid,A., Fellig,Y., Dadon,T., Ariel,I., de Groot,N., Hochberg,A., and Galun,E. (2002). Analysis of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma using cDNA arrays. *Mol. Carcinog.* 33, 113-124.
- Gonzalez,M.A., Pinder,S.E., Wencyk,P.M., Bell,J.A., Elston,C.W., Nicholson,R.I., Robertson,J.F., Blamey,R.W., and Ellis,I.O. (1999). An immunohistochemical examination of the expression of E-cadherin, alpha- and beta/gamma-catenins, and alpha2- and beta1-integrins in invasive breast cancer. *J. Pathol.* 187, 523-529.
- Goslin,R.H., Skarin,A.T., and Zamcheck,N. (1981). Carcinoembryonic antigen. A useful monitor of therapy of small cell lung cancer. *JAMA* 246, 2173-2176.
- Gu,Z., Thomas,G., Yamashiro,J., Shintaku,I.P., Dorey,F., Raitano,A., Witte,O.N., Said,J.W., Loda,M., and Reiter,R.E. (2000). Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. *Oncogene* 19, 1288-1296.
- Guarini,A., Riera,L., Cignetti,A., Montacchini,L., Massaia,M., and Foa,R. (1997). Transfer of the interleukin-2 gene into human cancer cells induces specific antitumor recognition and restores the expression of CD3/T- cell receptor associated signal transduction molecules. *Blood* 89, 212-218.
- Gutierrez,L.S., Schulman,A., Brito-Robinson,T., Noria,F., Ploplis,V.A., and Castellino,F.J. (2000). Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase- type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1. *Cancer Res.* 60, 5839-5847.
- Hakomori,S. and Zhang,Y. (1997). Glycosphingolipid antigens and cancer therapy. *Chem. Biol.* 4, 97-104.
- Hanahan,D. and Folkman,J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.
- Hedenfalk,I., Duggan,D., Chen,Y., Radmacher,M., Bittner,M., Simon,R., Meltzer,P., Gusterson,B., Esteller,M., Kallioniemi,O.P., Wilfond,B., Borg,A., and Trent,J. (2001). Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 344, 539-548.
- Hegde,P., Qi,R., Gaspard,R., Abernathy,K., Dharap,S., Earle-Hughes,J., Gay,C., Nwokekeh,N.U., Chen,T., Saeed,A.I., Sharov,V., Lee,N.H., Yeatman,T.J., and Quackenbush,J. (2001). Identification of tumor markers in models of human colorectal cancer using a 19,200-element complementary DNA microarray. *Cancer Res.* 61, 7792-7797.
- Hippo,Y., Taniguchi,H., Tsutsumi,S., Machida,N., Chong,J.M., Fukayama,M., Kodama,T., and Aburatani,H. (2002). Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. *Cancer Res.* 62, 233-240.
- Hollstein,M., Sidransky,D., Vogelstein,B., and Harris,C.C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.
- Hombach,J., Tsubata,T., Leclercq,L., Stappert,H., and Reth,M. (1990). Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature* 343, 760-762.
- Honjo,Y., Inohara,H., Akahani,S., Yoshii,T., Takenaka,Y., Yoshida,J., Hattori,K., Tomiyama,Y., Raz,A., and Kubo,T. (2000). Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 6, 4635-4640.
- Honjo,Y., Nangia-Makker,P., Inohara,H., and Raz,A. (2001). Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* 7, 661-668.

- Hsu,D.K., Yang,R.Y., Pan,Z., Yu,L., Salomon,D.R., Fung-Leung,W.P., and Liu,F.T. (2000). Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am. J. Pathol.* 156, 1073-1083.
- Hughes,R.C. (1997). The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 1194-1198.
- Hughes,R.C. (1999). Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1473, 172-185.
- Hughes,R.C. (2001). Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 83, 667-676.
- Hunter,T. (1991). Cooperation between oncogenes. *Cell* 64, 249-270.
- Ikonen,E., Fiedler,K., Parton,R.G., and Simons,K. (1995). Prohibitin, an antiproliferative protein, is localized to mitochondria. *FEBS Lett.* 358, 273-277.
- Ingber,D.E. and Folkman,J. (1989). Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 109, 317-330.
- Inohara,H. and Raz,A. (1995). Functional evidence that cell surface galectin-3 mediates homotypic cell adhesion. *Cancer Res.* 55, 3267-3271.
- Isaacs,J.T., Isaacs,W.B., Feitz,W.F., and Scheres,J. (1986). Establishment and characterization of seven Dunning rat prostatic cancer cell lines and their use in developing methods for predicting metastatic abilities of prostatic cancers. *Prostate* 9, 261-281.
- Ismail,R.S., Baldwin,R.L., Fang,J., Browning,D., Karlan,B.Y., Gasson,J.C., and Chang,D.D. (2000). Differential gene expression between normal and tumor-derived ovarian epithelial cells. *Cancer Res.* 60, 6744-6749.
- Ito,A., Lavery,S.B., Saito,S., Satoh,M., and Hakomori,S. (2001). A novel ganglioside isolated from renal cell carcinoma. *J. Biol. Chem.* 276, 16695-16703.
- Johansen,P., Arffmann,E., and Pallesen,G. (1979). Evaluation of smears obtained by cervical scraping and an endocervical swab in the diagnosis of neoplastic disease of the uterine cervix. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 58, 265-270.
- Kahari,V.M. and Saarialho-Kere,U. (1999). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann. Med.* 31, 34-45.
- Kang,D.C., LaFrance,R., Su,Z.Z., and Fisher,P.B. (1998). Reciprocal subtraction differential RNA display: an efficient and rapid procedure for isolating differentially expressed gene sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 13788-13793.
- Khokha,R. and Denhardt,D.T. (1987). On the use of anti-sense RNA: down-regulation of mRNA encoding a metalloproteinase inhibitor. *Anticancer Res.* 7, 653-660.
- Khokha,R., Waterhouse,P., Yagel,S., Lala,P.K., Overall,C.M., Norton,G., and Denhardt,D.T. (1989). Antisense RNA-induced reduction in murine TIMP levels confers oncogenicity on Swiss 3T3 cells. *Science* 243, 947-950.
- Kiley,S.C., Clark,K.J., Duddy,S.K., Welch,D.R., and Jaken,S. (1999). Increased protein kinase C delta in mammary tumor cells: relationship to transformation and metastatic progression. *Oncogene* 18, 6748-6757.
- Kim,D.Y., Kim,H.R., Shim,J.H., Park,C.S., Kim,S.K., and Kim,Y.J. (2000). Significance of serum and tissue carcinoembryonic antigen for the prognosis of gastric carcinoma patients. *J. Surg. Oncol.* 74, 185-192.

- King, S.W. and Morrow, K.J., Jr. (1988). Monoclonal antibodies produced against antigenic determinants present in complex mixtures of proteins. *Biotechniques* 6, 856-861.
- Kinzler, K.W., Nilbert, M.C., Vogelstein, B., Bryan, T.M., Levy, D.B., Smith, K.J., Preisinger, A.C., Hamilton, S.R., Hedge, P., Markham, A., and . (1991). Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 251, 1366-1370.
- Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1998). Landscaping the cancer terrain. *Science* 280, 1036-1037.
- Kubota, K. (2001). From tumor biology to clinical Pet: a review of positron emission tomography (PET) in oncology. *Ann. Nucl. Med.* 15, 471-486.
- Kuwabara, I. and Liu, F.T. (1996). Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J. Immunol.* 156, 3939-3944.
- Laferriere, J., Houle, F., Taher, M.M., Valerie, K., and Huot, J. (2001). Transendothelial migration of colon carcinoma cells requires expression of E-selectin by endothelial cells and activation of stress-activated protein kinase-2 (SAPK2/p38) in the tumor cells. *J. Biol. Chem.* 276, 33762-33772.
- Lavie, Y., Fiucci, G., and Liscovitch, M. (1998). Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells. *J. Biol. Chem.* 273, 32380-32383.
- Le Marer, N. and Hughes, R.C. (1996). Effects of the carbohydrate-binding protein galectin-3 on the invasiveness of human breast carcinoma cells. *J. Cell Physiol* 168, 51-58.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.
- Li, L., Yang, G., Ebara, S., Satoh, T., Nasu, Y., Timme, T.L., Ren, C., Wang, J., Tahir, S.A., and Thompson, T.C. (2001). Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 61, 4386-4392.
- Li, M., Liu, X., Robinson, G., Bar-Peled, U., Wagner, K.U., Young, W.S., Hennighausen, L., and Furth, P.A. (1997). Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 3425-3430.
- Linder, E., Vaheri, A., Ruoslahti, E., and Wartiovaara, J. (1975). Distribution of fibroblast surface antigen in the developing chick embryo. *J. Exp. Med.* 142, 41-49.
- Liotta, L.A., Mandler, R., Murano, G., Katz, D.A., Gordon, R.K., Chiang, P.K., and Schiffmann, E. (1986). Tumor cell autocrine motility factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 3302-3306.
- Lund, L.R., Romer, J., Thomasset, N., Solberg, H., Pyke, C., Bissell, M.J., Dano, K., and Werb, Z. (1996). Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development* 122, 181-193.
- Marzioch, M., Henthorn, D.C., Herrmann, J.M., Wilson, R., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J., Solari, R.C., and Rowley, A. (1999). Erp1p and Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex. *Mol. Biol. Cell* 10, 1923-1938.
- Matzku, S., Komitowski, D., Mildenerger, M., and Zoller, M. (1983). Characterization of BSp73, a spontaneous rat tumor and its in vivo selected variants showing different metastasizing capacities. *Invasion Metastasis* 3, 109-123.
- Matzku, S., Wenzel, A., Liu, S., and Zoller, M. (1989). Antigenic differences between metastatic and nonmetastatic BSp73 rat tumor variants characterized by monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 49, 1294-1299.
- McClung, J.K., Danner, D.B., Stewart, D.A., Smith, J.R., Schneider, E.L., Lumpkin, C.K., Dell'Orco, R.T., and Nuell, M.J. (1989). Isolation of a cDNA that hybrid selects antiproliferative mRNA from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 1316-1322.

- McDonnell,T.J., Nunez,G., Platt,F.M., Hockenberry,D., London,L., McKearn,J.P., and Korsmeyer,S.J. (1990). Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population. *Mol. Cell Biol.* *10*, 1901-1907.
- McLaughlin,R., McGrath,J., Grimes,H., and Given,H.F. (2000). The prognostic value of the tumor marker CA 15-3 at initial diagnosis of patients with breast cancer. *Int. J. Biol. Markers* *15*, 340-342.
- Mengwasser,J. and Sleeman,J.P. (2001). Expression of M-N#1, a histo-blood group B-like antigen, is strongly up- regulated in nonapoptosing mammary epithelial cells during rat mammary gland involution. *Glycobiology* *11* , 441-449.
- Mizejewski,G.J. (2001). Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* *226*, 377-408.
- Mok,S.C., Chao,J., Skates,S., Wong,K., Yiu,G.K., Muto,M.G., Berkowitz,R.S., and Cramer,D.W. (2001). Prostatein, a potential serum marker for ovarian cancer: identification through microarray technology. *J. Natl. Cancer Inst.* *93*, 1458-1464.
- Montano,M.M., Ekena,K., Delage-Mourroux,R., Chang,W., Martini,P., and Katzenellenbogen,B.S. (1999). An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 6947-6952.
- Mozo,L., Gayo,A., Suarez,A., Rivas,D., Zamorano,J., and Gutierrez,C. (1998). Glucocorticoids inhibit IL-4 and mitogen-induced IL-4R alpha chain expression by different posttranscriptional mechanisms. *J. Allergy Clin. Immunol.* *102*, 968-976.
- Muller,A., Homey,B., Soto,H., Ge,N., Catron,D., Buchanan,M.E., McClanahan,T., Murphy,E., Yuan,W., Wagner,S.N., Barrera,J.L., Mohar,A., Verastegui,E., and Zlotnik,A. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* *410*, 50-56.
- Murphy,L.C., Simon,S.L., Parkes,A., Leygue,E., Dotzlaw,H., Snell,L., Troup,S., Adeyinka,A., and Watson,P.H. (2000). Altered expression of estrogen receptor coregulators during human breast tumorigenesis. *Cancer Res.* *60*, 6266-6271.
- Murphy,P.M. (2001). Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N. Engl. J. Med.* *345*, 833-835.
- Naik,P., Karrim,J., and Hanahan,D. (1996). The rise and fall of apoptosis during multistage tumorigenesis: down- modulation contributes to tumor progression from angiogenic progenitors. *Genes Dev.* *10*, 2105-2116.
- Nakamura,M., Inufusa,H., Adachi,T., Aga,M., Kurimoto,M., Nakatani,Y., Wakano,T., Nakajima,A., Hida,J.I., Miyake,M., Shindo,K., and Yasutomi,M. (1999). Involvement of galectin-3 expression in colorectal cancer progression and metastasis. *Int. J. Oncol.* *15*, 143-148.
- Nestl,A., von Stein,O.D., Zatloukal,K., Thies,W.G., Herrlich,P., Hofmann,M., and Sleeman,J.P. (2001). Gene expression patterns associated with the metastatic phenotype in rodent and human tumors. *Cancer Res.* *61*, 1569-1577.
- Nicolson,G.L. (1982). Cancer metastasis. Organ colonization and the cell-surface properties of malignant cells. *Biochim. Biophys. Acta* *695*, 113-176.
- Nijtmans,L.G., de Jong,L., Artal,S.M., Coates,P.J., Berden,J.A., Back,J.W., Muijsers,A.O., van der,S.H., and Grivell,L.A. (2000). Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO J.* *19*, 2444-2451.
- Nuell,M.J., Stewart,D.A., Walker,L., Friedman,V., Wood,C.M., Owens,G.A., Smith,J.R., Schneider,E.L., Dell' Orco,R., Lumpkin,C.K., and . (1991). Prohibitin, an evolutionarily conserved intracellular protein that blocks DNA synthesis in normal fibroblasts and HeLa cells. *Mol. Cell Biol.* *11*, 1372-1381.

- Ochieng,J., Leite-Browning,M.L., and Warfield,P. (1998). Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 788-791.
- Orlandi,F., Saggiorato,E., Pivano,G., Puligheddu,B., Termine,A., Cappia,S., De Giuli,P., and Angeli,A. (1998). Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 58, 3015-3020.
- Parker,C., Rampaul,R.S., Pinder,S.E., Bell,J.A., Wencyk,P.M., Blamey,R.W., Nicholson,R.I., and Robertson,J.F. (2001). E-cadherin as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Br. J. Cancer* 85, 1958-1963.
- Patel,A.S., Schechter,G.L., Wasilenko,W.J., and Somers,K.D. (1998). Overexpression of EMS1/cortactin in NIH3T3 fibroblasts causes increased cell motility and invasion in vitro. *Oncogene* 16, 3227-3232.
- Poirier,F. and Robertson,E.J. (1993). Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin. *Development* 119, 1229-1236.
- Robledo,M.M., Bartolome,R.A., Longo,N., Rodriguez-Frade,J.M., Mellado,M., Longo,I., van Muijen,G.N., Sanchez-Mateos,P., and Teixido,J. (2001). Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 276, 45098-45105.
- Rofstad,E.K. and Halsor,E.F. (2000). Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts. *Cancer Res.* 60, 4932-4938.
- Ross,J.S. and Fletcher,J.A. (1998). The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells* 16, 413-428.
- Ruf,W., Fischer,E.G., Huang,H.Y., Miyagi,Y., Ott,I., Riewald,M., and Mueller,B.M. (2000). Diverse functions of protease receptor tissue factor in inflammation and metastasis. *Immunol. Res.* 21, 289-292.
- Sano,H., Hsu,D.K., Yu,L., Apgar,J.R., Kuwabara,I., Yamanaka,T., Hirashima,M., and Liu,F.T. (2000). Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J. Immunol.* 165, 2156-2164.
- Sato,S. and Hughes,R.C. (1992). Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylectosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. *J. Biol. Chem.* 267, 6983-6990.
- Sedelaar,J.P., van Roermund,J.G., van Leenders,G.L., Hulsbergen-van de Kaa CA, Wijkstra,H., and de la Rosette,J.J. (2001). Three-dimensional grayscale ultrasound: evaluation of prostate cancer compared with benign prostatic hyperplasia. *Urology* 57, 914-920.
- Shah,O.J., Kimball,S.R., and Jefferson,L.S. (2000). Acute attenuation of translation initiation and protein synthesis by glucocorticoids in skeletal muscle. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 278, E76-E82.
- Shah,O.J., Kimball,S.R., and Jefferson,L.S. (2000). Among translational effectors, p70S6k is uniquely sensitive to inhibition by glucocorticoids. *Biochem. J.* 347, 389-397.
- Shah,O.J., Kimball,S.R., and Jefferson,L.S. (2000). Glucocorticoids abate p70(S6k) and eIF4E function in L6 skeletal myoblasts. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 279, E74-E82.
- Shen,R., Su,Z.Z., Olsson,C.A., Goldstein,N.I., and Fisher,P.B. (1994). Surface-epitope masking: a strategy for the development of monoclonal antibodies specific for molecules expressed on the cell surface. *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 91-98.
- Sidransky,D., Tokino,T., Hamilton,S.R., Kinzler,K.W., Levin,B., Frost,P., and Vogelstein,B. (1992). Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 256, 102-105.

- Sivak, M.V., Jr. and Fleischer, D.E. (1984). Colonoscopy with a VideoEndoscope: preliminary experience. *Gastrointest. Endosc.* 30, 1-5.
- Sleeman, J.P., Kim, U., LePendou, J., Howells, N., Coquerelle, T., Ponta, H., and Herrlich, P. (1999). Inhibition of MT-450 rat mammary tumour growth by antibodies recognising subtypes of blood group antigen B. *Oncogene* 18, 4485-4494.
- Sleeman, J.P. (2000). The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Recent Results Cancer Res.* 157, 55-81.
- Sliva, D., Mason, R., Xiao, H., and English, D. (2000). Enhancement of the migration of metastatic human breast cancer cells by phosphatidic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 471-479.
- Stetler-Stevenson, W.G., Liotta, L.A., and Kleiner, D.E., Jr. (1993). Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J.* 7, 1434-1441.
- Stetler-Stevenson, W.G., Aznavoorian, S., and Liotta, L.A. (1993). Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 541-573.
- Stoler, D.L., Chen, N., Basik, M., Kahlenberg, M.S., Rodriguez-Bigas, M.A., Petrelli, N.J., and Anderson, G.R. (1999). The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 15121-15126.
- Su, Z.Z., Lin, J., Shen, R., Fisher, P.E., Goldstein, N.I., and Fisher, P.B. (1996). Surface-epitope masking and expression cloning identifies the human prostate carcinoma tumor antigen gene PCTA-1 a member of the galectin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 7252-7257.
- Sugarbaker, E.V. (1979). Cancer metastasis: a product of tumor-host interactions. *Curr. Probl. Cancer* 3, 1-59.
- Symonds, H., Krall, L., Remington, L., Saenz-Robles, M., Lowe, S., Jacks, T., and Van Dyke, T. (1994). p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* 78, 703-711.
- Takaoka, A., Adachi, M., Okuda, H., Sato, S., Yawata, A., Hinoda, Y., Takayama, S., Reed, J.C., and Imai, K. (1997). Anti-cell death activity promotes pulmonary metastasis of melanoma cells. *Oncogene* 14, 2971-2977.
- Terashima, M., Kim, K.M., Adachi, T., Nielsen, P.J., Reth, M., Kohler, G., and Lamers, M.C. (1994). The IgM antigen receptor of B lymphocytes is associated with prohibitin and a prohibitin-related protein. *EMBO J.* 13, 3782-3792.
- Terranova, V.P., Maslow, D., and Markus, G. (1989). Directed migration of murine and human tumor cells to collagenases and other proteases. *Cancer Res.* 49, 4835-4841.
- Testa, J.E., Brooks, P.C., Lin, J.M., and Quigley, J.P. (1999). Eukaryotic expression cloning with an antimetastatic monoclonal antibody identifies a tetraspanin (PETA-3/CD151) as an effector of human tumor cell migration and metastasis. *Cancer Res.* 59, 3812-3820.
- Thompson, M.G., Thom, A., Partridge, K., Garden, K., Campbell, G.P., Calder, G., and Palmer, R.M. (1999). Stimulation of myofibrillar protein degradation and expression of mRNA encoding the ubiquitin-proteasome system in C(2)C(12) myotubes by dexamethasone: effect of the proteasome inhibitor MG-132. *J. Cell Physiol* 181, 455-461.
- Turley, E.A. (1992). Hyaluronan and cell locomotion. *Cancer Metastasis Rev.* 11, 21-30.
- Turner, C.E. (2000). Paxillin interactions. *J. Cell Sci.* 113 Pt 23, 4139-4140.
- Varani, J. (1982). Chemotaxis of metastatic tumor cells. *Cancer Metastasis Rev.* 1, 17-28.

- Vazquez,F., Grossman,S.R., Takahashi,Y., Rokas,M.V., Nakamura,N., and Sellers,W.R. (2001). Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J. Biol. Chem.* *276*, 48627-48630.
- Voigt,W. and Dunning,W.F. (1974). In vivo metabolism of testosterone-3H in R-3327, an androgen-sensitive rat prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* *34*, 1447-1450.
- von Stein,O.D., Thies,W.G., and Hofmann,M. (1997). A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res.* *25*, 2598-2602.
- Wang,L., Luo,G.J., Wang,J.J., and Hasselgren,P.O. (1998). Dexamethasone stimulates proteasome- and calcium-dependent proteolysis in cultured L6 myotubes. *Shock* *10*, 298-306.
- Wang,S., Nath,N., Adlam,M., and Chellappan,S. (1999). Prohibitin, a potential tumor suppressor, interacts with RB and regulates E2F function. *Oncogene* *18*, 3501-3510.
- Wang,S., Nath,N., Fusaro,G., and Chellappan,S. (1999). Rb and prohibitin target distinct regions of E2F1 for repression and respond to different upstream signals. *Mol. Cell Biol.* *19*, 7447-7460.
- Wang,Y., Liang,X., Wu,S., Murrell,G.A., and Doe,W.F. (2001). Inhibition of colon cancer metastasis by a 3'- end antisense urokinase receptor mRNA in a nude mouse model. *Int. J. Cancer* *92*, 257-262.
- Warfield,P.R., Makker,P.N., Raz,A., and Ochieng,J. (1997). Adhesion of human breast carcinoma to extracellular matrix proteins is modulated by galectin-3. *Invasion Metastasis* *17*, 101-112.
- Weiss,L. and Ward,P.M. (1983). Cell detachment and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* *2*, 111-127.
- Williams,C.V., Stechmann,C.L., and McLoon,S.C. (1992). Subtractive immunization techniques for the production of monoclonal antibodies to rare antigens. *Biotechniques* *12*, 842-847.
- Wolf,B.S. (1965). Roentgen features of benign tumors of the colon. *Surg. Clin. North Am.* *45*, 1141-1155.
- Yamauchi,T., Watanabe,M., Kubota,T., Hasegawa,H., Ishii,Y., Endo,T., Kabeshima,Y., Yorozya,K., Yamamoto,K., Mukai,M., and Kitajima,M. (2002). Cyclooxygenase-2 expression as a new marker for patients with colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum* *45*, 98-103.
- Yang,G., Truong,L.D., Wheeler,T.M., and Thompson,T.C. (1999). Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: a novel prognostic marker. *Cancer Res.* *59*, 5719-5723.
- Yang,J.L., Seetoo,D., Wang,Y., Ranson,M., Berney,C.R., Ham,J.M., Russell,P.J., and Crowe,P.J. (2000). Urokinase-type plasminogen activator and its receptor in colorectal cancer: independent prognostic factors of metastasis and cancer- specific survival and potential therapeutic targets. *Int. J. Cancer* *89*, 431-439.
- Yang,R.Y., Hsu,D.K., and Liu,F.T. (1996). Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 6737-6742.
- Yokota,J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* *21*, 497-503.
- Yonemura,Y., Ninomiya,I., Yamaguchi,A., Fushida,S., Kimura,H., Ohoyama,S., Miyazaki,I., Endou,Y., Tanaka,M., and Sasaki,T. (1991). Evaluation of immunoreactivity for erbB-2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. *Cancer Res.* *51*, 1034-1038.
- Yoshii,T., Inohara,H., Takenaka,Y., Honjo,Y., Akahani,S., Nomura,T., Raz,A., and Kubo,T. (2001). Galectin-3 maintains the transformed phenotype of thyroid papillary carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* *18*, 787-792.
- Yu,D., Wang,S.S., Dulski,K.M., Tsai,C.M., Nicolson,G.L., and Hung,M.C. (1994). c-erbB-2/neu overexpression enhances metastatic potential of human lung cancer cells by induction of metastasis-associated properties. *Cancer Res.* *54*, 3260-3266.