

**Untersuchungen zur tumorbiologischen Relevanz  
von BMP-2 im Mammakarzinom**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen-Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

**von Susanne Steinert**

geboren am 02.06.1981 in Burgstädt

Gutachter:

1. Prof. Dr. K. Höffken
2. Prof. Dr. S. Reissmann
3. Prof. Dr. S. Wölfl

Tag der öffentlichen Verteidigung: 23.06.2008

# Abkürzungen

ActR	Activin Rezeptor
ALK	Activin like Kinase
BAMBI	BMP und Activin membrangebundener Inhibitor
BMP	Bone Morphogenetic Protein, Knochenmorphogenesefaktor
BMPR	Bone Morphogenetic Protein Rezeptor
bp	Basenpaare, Einheit der DNA-Länge
cDNA	complementary DNA
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dox	Doxycyclin
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECL	enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Receptor
ER	Östrogenrezeptor
FCS	fötale Kälberserum
GDF	growth and differentiation factor
GO	Gene Ontology
IHC	Immunhistochemie
ISR	integrated stress response
JAK	Januskinase
kb	Kilobasenpaare, Einheit der DNA-Länge
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
mA	Milliampère, Einheit der Stromstärke
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mRNA	messenger RNA, „Boten“-Ribonukleinsäure
nm	Nanometer, Einheit der Wellenlänge
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PR	Progesteronrezeptor
REM	Remmele Score
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RS	Remmele Score
RT	Raumtemperatur
rt-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction

SDS	Sodiumdodecylsulfat
Smad	Mother against decapentalegic
STAT	signal transducer and activator of transcription
TAE	Trisbase-Eisessig-EDTA-Puffer
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor Beta
UPR	unfolded protein response
V	Volt, Einheit der Stromspannung

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Zusammenfassung</b> .....	VII
	<b>Summary</b> .....	IX
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1.	Die TGF- $\beta$ Superfamilie.....	1
1.2.	Bone Morphogenetic Proteins (BMPs).....	2
1.3.	Signaltransduktion der BMPs.....	3
1.4.	Regulation des BMP-Signalweges.....	5
1.5.	Biologische Aktivitäten der BMPs.....	6
1.6.	BMPs im Tumorgeschehen.....	9
1.7.	BMPs im Mammakarzinom.....	10
1.8.	Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2).....	11
1.9.	Zielstellung der Arbeit.....	13
<b>2.</b>	<b>Methoden</b> .....	14
2.1.	Zellbiologische Methoden.....	14
	2.1.1. Zelllinien.....	14
	2.1.2. Zellkultivierung.....	14
	2.1.3. Auftauen der Zellen.....	14
	2.1.4. Passagieren der Zellen.....	15
	2.1.5. Kryokonservierung der Zellen.....	15
	2.1.6. Zellzahlbestimmung.....	15
2.2.	Molekularbiologische Methoden.....	16
	2.2.1. RNA-Isolierung.....	16
	2.2.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	16
	2.2.3. Reverse Transkription.....	17
	2.2.4. rt-PCR.....	18
	2.2.5. Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese...	19
	2.2.6. realtime-PCR.....	19

2.3.	cDNA Microarray.....	20
	2.3.1. Inkubationsversuche.....	20
	2.3.2. Probenpräparation und Hybridisierung.....	21
	2.3.3. Auswertung des Microarrays.....	22
2.4.	Das Tet-System.....	23
	2.4.1. Herstellung des Responseplasmids.....	24
	2.4.1.1. Ermittlung der Schnittstellen für die Umklonierung.....	24
	2.4.1.2. Restriktionsverdau und Gelextraktion.....	24
	2.4.1.3. Ligation.....	25
	2.4.1.4. Transformation.....	25
	2.4.1.5. Plasmidisolierung.....	26
	2.4.1.6. Differentieller Restriktionsverdau.....	26
	2.4.1.7. Sequenzierung.....	27
	2.4.2. Optimierung des Tet-Systems.....	28
	2.4.2.1. Bestimmung der zytotoxischen Konzentration von Hygromycin.....	28
	2.4.2.2. Ermittlung der optimalen Doxycyclin-Konzentration.....	29
	2.4.2.3. Luciferase Reporter Assay.....	29
	2.4.3. Transfektion des Response Vektors in MCF-7 Tet-On.....	29
	2.4.3.1. Transiente Transfektion von MCF-7 Tet-On.....	30
	2.4.3.2. Etablierung stabil transfizierter Klone.....	30
	2.4.4. Analyse der stabil transfizierten Klone.....	31
2.5.	Immunhistochemie.....	31
	2.5.1. Etablierung der BMP-2 Immunhistochemie.....	31
	2.5.1.1. Die Avidin-Biotin-Komplex Methode.....	31
	2.5.1.2. Durchführung der Immunhistochemie.....	32
	2.5.2. Multi Tissue Array.....	34
2.6.	Proteinanalytik mittels Western blot.....	35
	2.6.1. Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung.....	35
	2.6.2. Auftrennung des Proteingemisches mittels SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese.....	35
	2.6.3. Elektrotransfer und Immundetektion der Proteine.....	36

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
3.1.	Expressionsanalysen zur zeitabhängigen Wirkung von BMP-2.....	37
	3.1.1. Generelle funktionelle Analyse der differentiell exprimierten Gene..	37
	3.1.2. Assoziation der differentiell exprimierten Gene mit Tumorigenese..	40
	3.1.3. Verifizierung der Microarray-Daten mittels realtime-PCR.....	42
	3.1.3.1. Validierung der Microarray Daten in der Gruppe „Überexpression“.....	42
	3.1.3.2. Validierung der Microarray Daten der Apoptose- assoziierten Gene.....	43
	3.1.4. Funktionelle Untersuchungen von PKR und seinem Substrat eIF2alpha.....	48
3.2.	Das Tet-System für eine induzierbare Genexpression.....	49
	3.2.1 Herstellung und Charakterisierung des Response-Plasmids.....	50
	3.2.2. Bestimmung der optimalen Doxycyclin-Konzentration.....	51
	3.2.3. Transiente Transfektion.....	53
	3.2.4. Stabile Transfektion.....	59
3.3.	Immunhistochemische Untersuchung der BMP-2 Expression.....	63
	3.3.1. Etablierung der BMP-2 Immunhistochemie.....	63
	3.3.2. Multigewebearray „breast prognosis“.....	66
	3.3.2.1. Das Patientenkollektiv.....	66
	3.3.2.2. Histopathologie und Klassifikation des Mammakarzinoms..	66
	3.3.2.3. Immunhistochemisch bestimmte Parameter.....	70
	3.3.2.4. Statistische Überprüfung des Patientenkollektivs.....	71
	3.3.2.5. Häufigkeit und Verteilung der BMP-2 Expression.....	72
	3.3.2.6. Korrelationen von BMP-2.....	74
	3.3.2.7. Überlebensanalyse.....	78
	3.3.2.8. BMP-2 – ein unabhängiger Prognosefaktor?!.....	79
	3.3.3. Multitumor-Gewebearray.....	80
	3.3.3.1. Quantitative Auswertung der BMP-Expression.....	81
	3.3.3.2. Qualitative Auswertung der BMP-Expression.....	82
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>85</b>

<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	i
<b>6.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	xx
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	xxi
<b>8.</b>	<b>Material</b> .....	xxiv
<b>9.</b>	<b>Anhang</b> .....	xxxii
	Liste veränderter Gene	
	Vektorkarten	
	Sequenzen	
	Korrelationen von BMP-2	
	Cox-Regression	
	Statistische Untersuchungen des Multitumor-Gewebearrays	
	Lebenslauf	
	Kongressbeiträge	
	Publikationen	
	Ehrenwörtliche Erklärung	
	Danksagung	



## Zusammenfassung

Die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) bilden die größte Subgruppe der TGF- $\beta$  Superfamilie von Wachstumsfaktoren und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Knochenstoffwechsels und der Embryonalentwicklung. Der Nachweis von BMPs, ihren Rezeptoren und Signaltransduktionsmolekülen in verschiedenen Tumoren, unter anderem auch im Mammakarzinom, spiegelt ihre Beteiligung in der Tumorigenese wider. In der vorliegenden Arbeit wurde die tumorbiologische Bedeutung von BMP-2 im Mammakarzinom untersucht. BMP-2 wurde ursprünglich als Induktor der endochondralen Knochenbildung beschrieben. Mittlerweile wird es als multifunktionelles Zytokin betrachtet, welches die Differenzierung vieler verschiedener Zelltypen beeinflusst. Entscheidende Prozesse der Tumorigenese wie Migration und Invasivität, Neoangiogenese, Proliferation und Apoptose wurden als BMP-2 regulierte Prozesse beschrieben. Die Rolle von BMP-2 in der Tumorentstehung und -progression reicht vom Tumorpromotor bis hin zum Tumorsuppressor. Diese divergenten Effekte werden auf die Abhängigkeit der BMP-2 Wirkung von Konzentration, Expositionsdauer und Zelltyp zurückgeführt. Dieser Zusammenhang sollte in der vorliegenden Arbeit im tumorbiologischen Modell mit der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 eingehender untersucht werden. Zur Erforschung der zeitabhängigen Wirkung von BMP-2 im Mammakarzinom wurde die Kurzzeit- und Langzeitapplikation von BMP-2 mittels globaler Expressionsanalyse auf Basis der Microarray-Technologie verglichen. Für weitergehende Untersuchungen des Zusammenhanges zwischen BMP-2 Effekten und Expositionsdauer erfolgte die Etablierung einer Mammakarzinomzelllinie mit einer induzierbaren BMP-2 Expression basierend auf dem Tet-System. Schließlich erfolgte die immunhistochemische Bestimmung von BMP-2 an 52 Mammakarzinompräparaten und an einem großen Patientenkollektiv mittels Multi Tissue Array-Technologie. Diese Ergebnisse wurden auf signifikante Korrelationen zu histopathologischen Parametern und Überlebenszeiten geprüft.

Mit der Expressionsanalyse konnten jeweils circa 200 veränderte Gene infolge einer Kurzzeit- („Inkubation“) bzw. einer Langzeitapplikation („Überexpression“) von BMP-2, definiert als mindestens zweifache Hoch- bzw. Herunterregulation, identifiziert werden. Ein Vergleich der beiden experimentellen Gruppen zeigte eine Übereinstimmung von 1% der differentiell exprimierten Gene. Die funktionelle Klassifizierung basierend auf Gene Ontology deutet auf eine vorrangige Beteiligung der Gene in der Gruppe „Inkubation“ an Stoffwechselprozessen hin. Die veränderten Gene in der Gruppe „Überexpression“ wiesen vor allem eine Beteiligung

an Entwicklungsprozessen auf. In beiden Gruppen wurden Prozesse identifiziert, die mit Tumorigenese assoziiert sind wie Zellzyklus, Adhäsion, Apoptose, Migration und Proliferation. Dabei stellte sich besonders ein Zusammenhang zwischen der Kurzzeitapplikation von BMP-2 und dem Prozess Apoptose heraus. Die Apoptose-assoziierten Gene wurden mittels realtime-PCR genauer untersucht und die Microarray-Daten konnten größtenteils reproduziert werden. Als besonders interessant erwiesen sich die Veränderungen der Expression der Proteinkinase R (PKR), die mittels Western blot eingehender studiert wurden. Dabei zeigte sich eine Erhöhung der biologische aktiven, phosphorylierten Form von PKR und seinem Substrat, der alpha-Untereinheit des Translationsfaktors eIF2. Diese Stimulation der PKR-Aktivität und seines Substrats infolge einer Kurzzeitgabe von BMP-2 deuten auf eine Assoziation mit der zellulären Stressantwort hin.

Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten eine schwache bis mäßige Expression von BMP-2 in 60% der Gewebeproben von Brustkrebspatienten. Dabei war in gut differenzierten, kleinen Tumoren eine robuste BMP-2 Expression nachweisbar. Die BMP-2 Expression ist invers korreliert zum Östrogen-Rezeptorstatus ( $p = 0,001$ ) und der Proliferation ( $p = 0,001$ ). Eine positive Korrelation zeigt sich zum anti-apoptotischen Protein Bcl2 ( $p = 0,024$ ) und zum Gehalt des Tumorsuppressors p53 ( $p < 0,000$ ). Die Expression von BMP-2 ist positiv vergesellschaftet mit der Expression der Zellzyklusregulatoren Cyclin D1 ( $p = 0,001$ ), p27 ( $p = 0,029$ ) und p16 ( $p = 0,003$ ), die den G1/S-Phase-Übergang des Zellzyklus hemmen. Weiterhin ist BMP-2 positiv mit der Expression des Wnt-Antagonisten SFRP1 korreliert, der als Tumorsuppressor eingestuft wird. BMP-2 positive Tumoren wiesen ein signifikant höheres Gesamtüberleben auf ( $p = 0,001$ ). Darüber hinaus konnte die BMP-2 Expression als prognostisch unabhängiger Marker identifiziert werden. Eine Gruppierung der Proben nach klinischen und immunhistochemischen Aspekten zeigte, dass besonders nodal-negative invasiv-duktales Mammakarzinome einen prognostischen Vorteil aufgrund der BMP-2 Expression haben. Mittels Multi-Tumor Gewebearrays konnten weitere BMP-2 exprimierende Gewebe und Tumorentitäten ermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Abhängigkeit der BMP-2 Wirkung von der Expositionsdauer in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 aufgezeigt werden und ein Zusammenhang zu Prozessen der Tumorigenese wie Apoptose hergestellt werden. Des Weiteren konnte BMP-2 als unabhängiger prognostischer Marker für das Gesamtüberleben identifiziert werden. Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass BMP-2 eine duale Rolle ähnlich der von TGF- $\beta$  in der Tumorbologie einnimmt.

## Summary

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are members of the transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) superfamily of growth factors and important regulators of bone formation and during embryogenesis. BMPs, their receptors and signal transduction molecules could be detected in several tumors, e.g. breast cancer, indicating their importance in tumorigenesis. The aim of the present study was to investigate the relevance of BMP-2 in breast cancer. BMP-2 is well known as an inducer of endochondral bone formation. Now it is recognized as a multipurpose cytokine that influences the differentiation of various cell types. Crucial events in tumor development like invasion and migration, angiogenesis, apoptosis and proliferation are reported to be regulated by BMP-2. During tumor initiation and progression BMP-2 is supposed to act as a tumor suppressor as well as a tumor promoter. This contradiction might be due to the fact that almost all effects of BMP-2 are time limited and concentration dependent. Therefore we studied the influence of BMP-2 on the human breast cancer cell line MCF-7 in dependence of the duration of exposure time by global gene expression profiling. In order to study the connection of BMP-2 effects and exposure time in more detail, an inducible BMP-2 expression system was established based on the Tet-system. Finally the BMP-2 expression was determined in 52 breast cancer samples and a large patient cohort via immunohisto-chemistry. The results were tested for significant correlations to histopathological parameters and overall survival.

About 200 genes were found to be differentially expressed (defined as at least 2-fold up- or down-regulation) after short-time (“incubation”) or long-time exposure (“overexpression”). The sets of regulated genes showed only a 1% concordance. The functional interpretation of the affected biological processes indicate an involvement of the subset “incubation” predominantly in biological processes associated with metabolism in general. The long time-exposure to BMP-2 significantly influences biological processes linked to developmental processes. In both subsets tumor-associated processes like cell cycle, adhesion, apoptosis, migration and proliferation could be identified. The group of apoptosis-related genes was predominantly regulated after short-term application of BMP-2. These results could be confirmed for the majority of genes by realtime-PCR. The protein kinase R exhibited the most prominent BMP-2 dependant regulation. Further studies on the protein level showed activation of PKR followed by an enhanced phosphorylation of the PKR substrate eIF2 $\alpha$ . These results indicate a novel association between BMP-2 and cellular stress response.

The immunohistochemical investigations demonstrated a weak to moderate expression of BMP-2 in 60% of the analyzed breast cancer specimen. Small, low-grade tumors exhibited a pronounced BMP-2 expression. The BMP-2 content showed an inverse correlation to the estrogen-receptor ( $p = 0,001$ ) and to the proliferation ( $p = 0,001$ ). The BMP-2 expression is positively correlated to the anti-apoptotic protein bcl2 ( $p = 0,024$ ) and to the content of the tumor suppressor p53 ( $p < 0,000$ ). The cell cycle regulators cyclin D1 ( $p = 0,001$ ), p27 ( $p = 0,029$ ) and p16 ( $p = 0,003$ ), which inhibit the G1/S-phase transition, are significantly associated with BMP-2. In addition BMP-2 is positively correlated to the expression of SFRP1, a Wnt-antagonist which is supposed to be a tumor suppressor. The most prominent result was, that BMP-2 expressing tumors exhibited a significant increase in overall survival ( $p = 0,001$ ). Moreover BMP-2 could be identified as an independent prognostic marker. Grouping of the specimen according to clinical and immunohistochemical aspects showed a prognostic benefit of patients with a higher BMP-2 level especially for nodal-negative invasive-ductal breast carcinomas. Further BMP-2 expressing tissues and tumor entities could be identified using multi tissue array technology.

In conclusion, it could be shown that the effects of BMP-2 are dependant on the duration of the treatment. BMP-2 affects all cellular processes which are expected to be important for tumorigenesis, e.g. apoptosis. Furthermore, BMP-2 could be identified as an independent prognostic marker for overall survival. Regarding these results, a dual role for BMP-2 in tumor development could be supposed.

# 1. Einleitung

Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation von komplexen Vorgängen wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung, die essentiell für die Homöostase und Integrität von Zellen und Geweben und somit für den ganzen Organismus sind. Störungen in diesen Kontrollmechanismen haben schwerwiegende Folgen und können zu Erkrankungen wie Krebs führen. Vielen dieser Faktoren wird daher eine Rolle als Protoonkogen oder Tumorsuppressor zugeschrieben. Durch qualitative und quantitative Veränderungen dieser Gene kann es zur Aktivierung von Protoonkogenen respektive zur Inaktivierung von Tumorsuppressoren kommen. Dabei spielen sowohl genetische als auch epigenetische Veränderungen eine Rolle. Eine wichtige Gruppe dieser Wachstumsfaktoren ist die Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Superfamilie, die, abhängig von äußeren Bedingungen und dem Zustand der Zielzelle, ein breites Spektrum an Effekten auslösen kann (Massague 2000).

Die meisten Mitglieder der TGF-  $\beta$  Superfamilie werden den Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) oder Knochenmorphogenesefaktoren (Urist 1965) zugerechnet. Die Namensgebung erfolgte aufgrund ihres Potentials zur Induktion der Knorpel- und Knochenbildung. Darüber hinaus regulieren BMPs wichtige Prozesse während der Embryonalentwicklung verschiedener Spezies wie Differenzierung, Determinierung und Organogenese. Defekte führen zu schwerwiegenden Entwicklungsstörungen bis hin zu einem letalen Phänotyp. Auch im adulten Organismus beeinflussen die BMPs die Differenzierung einer Vielzahl von verschiedenen Zellen. Des Weiteren wird ihnen eine Rolle in der Tumorentwicklung zugeschrieben. Die Expression verschiedener BMPs im Mammakarzinom konnte bereits nachgewiesen werden. Für ein genaueres Verständnis der Vorgänge bei der Entstehung und Progression von Brustkrebs und die Erforschung möglicher Therapieansätze wurde in der vorliegenden Arbeit die tumorbiologische Relevanz von BMP-2 im Mammakarzinom untersucht.

## 1.1. Die TGF- $\beta$ Superfamilie

Die Mitglieder der TGF-  $\beta$  Superfamilie von Wachstumsfaktoren sind strukturell verwandte, sezernierte Zytokine, die in verschiedenen Spezies von der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) über den Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) bis hin zum Menschen (*Homo sapiens*) zu finden sind. Diese evolutionäre Konservierung der Faktoren verdeutlicht ihre

Bedeutung. Sie spielen eine wichtige Rolle in einem breiten Spektrum zellulärer Prozesse wie Zellproliferation, Zellzyklusprogression, Apoptose, Reproduktion, Motilität, Adhesion, Entwicklung und Differenzierung (Attisano und Wrana, 2002). Dabei sind die beobachteten Effekte mitunter gegensätzlich, was verdeutlicht, dass die Wirkung abhängig vom Zelltyp und dem momentanen Zustand der Zelle ist (ten Dijke et al., 2002). Die TGF- $\beta$  Superfamilie umfasst die TGF- $\beta$ s, die Activine und die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs).

## **1.2. Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)**

Die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs, Knochenmorphogenesefaktoren) sind mit über 20 Mitgliedern die größte Subfamilie der TGF- $\beta$  Wachstumsfaktoren (Chen et al., 2004). Sie erhielten ihren Namen aufgrund ihrer Fähigkeit nach ektopter Transplantation in Versuchstiere die Knochenbildung zu induzieren (Urist 1965). Die verantwortlichen Proteine waren damals noch nicht bekannt, aber im Laufe der Jahre bildete sich die Familie der BMPs heraus (Wozney et al., 1988, Luyten et al., 1989, Celeste et al., 1990).

Die BMP Proteine werden als lange, monomere Vorläuferproteine (Präproteine) mit einer Größe zwischen 400 und 450 Aminosäuren synthetisiert (Wozney 1989, Hogan 1996). Das Signalpeptid ist charakteristisch für sezernierte Proteine und verantwortlich für die Aufnahme und Prozessierung im endoplasmatischen Reticulum. Nach der Abspaltung im ER erfolgt die Bildung des charakteristischen Cysteinknotens mit sechs der sieben hochkonservierten Cysteinreste im maturen Teil der Proteine und die Glykosylierung. Der siebte Cysteinrest führt über die Bildung einer intermolekularen Disulfidbrücke zu einem weiteren Monomer zur Dimerisierung. Daraus resultiert ein für die BMPs typisches, kovalent verbundenes Homodimer (Jones et al., 1994, Hoodless und Wrana, 1998). Darüber hinaus können auch Heterodimere gebildet werden, sobald BMPs koexprimiert werden. Diese zeigen mitunter eine größere biologische Aktivität als die Homodimere (Aono et al., 1995, Israel et al., 1996, Kusumoto et al., 1997). Die dimeren Proproteine werden an einer konservierten, dibasischen Schnittstelle (RXXR), ca. 110 Aminosäuren vom carboxyterminalen Ende des Proproteins entfernt, proteolytisch gespalten. Die nun biologisch aktiven, maturen Dimere werden über Vesikel in den Extrazellularraum sezerniert, wo sie ihre Wirkung entfalten. Der Cysteinknoten und die Dimerisierung sind essentiell für die Stabilität und die Bildung der Sekundärstruktur. Die dreidimensionale Struktur kann mit einer Hand verglichen werden (Abb. 1.1.), wobei der Cysteinknoten die Handfläche, die vier Stränge eines antiparallelen  $\beta$ -

Faltblatts ( $\beta 1$ -  $\beta 8$ ) die Finger und die zentrale  $\alpha$ -Helix ( $\alpha 1$ ) das Handende darstellen (Daopin et al., 1992).

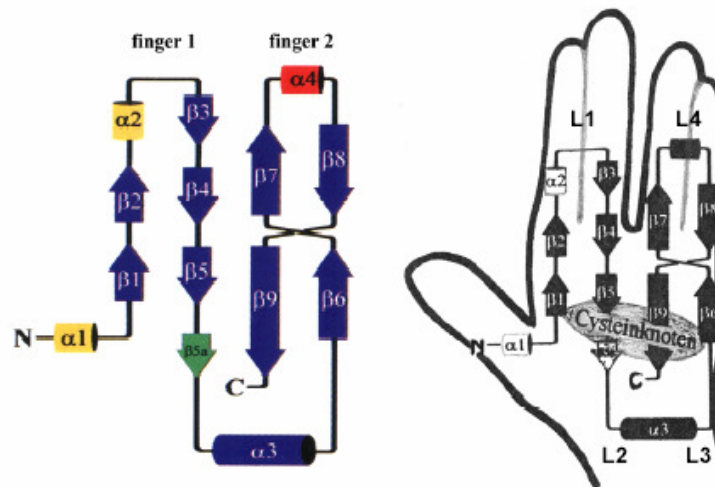


Abb 1.1. Sekundärstruktur des BMP-2 Monomers (Scheuffler et al., 1999)

### 1.3. Signaltransduktion der BMPs

BMPs entfalten ihre biologische Aktivität als extrazelluläre Signalmoleküle über Serin/Threonin Kinase Rezeptoren. Jeder Rezeptor setzt sich aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, der Transmembrandomäne und der zytosolischen Serin/Threonin Kinase zusammen (Massague, 2000). Die intrazelluläre Kinaseaktivität des Typ-I-Rezeptors ist konstitutiv, wohingegen die des Typ-II-Rezeptors ligandengesteuert ist. Bei TGF- $\beta$  und Aktivin findet man einen „sequentiellen Bindungsmodus“, d.h., der Ligand bindet zuerst an den Typ-II-Rezeptor und rekrutiert anschließend den Typ-I-Rezeptor (Massague, 1998). Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch für die Familie der BMPs gefunden, wobei diese zuerst den Typ-I-Rezeptor binden, um sich dann mit dem Typ-II-Rezeptor zu einem Heterotetramer zusammenzulagern (Shi und Massague, 2003). Unabhängig vom Bindungsmodus phosphoryliert der Typ-II-Rezeptor den Typ-I-Rezeptor in seiner Glycin-Serin-Domäne (GS). Diese Domäne ist eine ca. 30 Aminosäuren lange, hoch konservierte Region mit einer charakteristischen SGSGSG-Sequenz vor der eigentlichen Kinasedomäne. Die Phosphorylierung dieser Serinreste führt zur Aktivierung der intrinsischen Kinase (Wrana et al., 1994), die für die Signalweiterleitung essentiell ist. Die Rezeptoren binden ihre Liganden mit unterschiedlicher Affinität, so dass sich für jeden Liganden eine typische Kombination

von Rezeptoren ergibt (Tab.1.1.). Derzeit sind sieben humane Typ-I- (Activin like kinase (ALK) 1-7) und fünf humane Typ-II-Rezeptoren (ActR-II, ActR-IIB, BMPR-II, AMHR-II, T $\beta$ R-II) identifiziert (Shimasaki et al. 2004).

Ligand	Typ-II-Rezeptor	Typ-I-Rezeptor	Smad	Literatur
BMP-2	BMPR-II	ALK-3 (BMPR-IA)	Smad 1/5/8	Yamaji et al., 1994
BMP-4		ALK-6 (BMPR-IB)		Rosenzweig et al., 1995
GDF-5	BMPR-II	ALK-3 (BMPR-IA)	Smad 1/5/8	Nishito et al., 1996
	ActR-II	ALK-6 (BMPR-IB)		
	ActR-IIB			
BMP-6	BMPR-II	ALK-2 (ActR-IA)	Smad 1/5/8	Ebisawa et al., 1999
BMP-7	ActR-II	ALK-6 (BMPR-IB)		Macias-Silva et al., 1998
	ActR-IIB			
BMP-15	BMPR-II	ALK-6 (BMPR-IB)	Smad 1/5/8	Moore et al., 2003
GDF-9	BMPR-II	?	Smad 2	Vitt et al., 2002
MIS/AMH	AMHR-II	ALK-2 (ActR-IA)	Smad 1/5/8	Gouédard et al., 2000
		ALK-3 (BMPR-IA)		
		ALK-6 (BMPR-IB)		
Aktivin	ActR-II	ALK-4 (ActR-IB)	Smad 2/3	ten Dijke et al., 1994
	ActR-IIB			
TGF- $\beta$	T $\beta$ R-II	ALK-1	Smad 2/3	Lin et al., 1992
		ALK-5 (T $\beta$ R-I)		

Tab. 1.1. Beziehungen zwischen Liganden, Rezeptoren und Smads in der TGF- $\beta$  Superfamilie (nach Shimasaki et al., 2004)

Die intrazelluläre Signalweiterleitung wird über so genannte Smad-Moleküle vermittelt. Der aktivierte Typ-I-Rezeptor phosphoryliert die rezeptorregulierten Smads (R-Smad), die wiederum spezifische Affinitäten für die Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie aufweisen (siehe Tab. 1.1.) (Miyazono et al., 2000). Die so aktivierten R-Smads bilden mit Smad 4, einem allgemeinen Bindungspartner (Co-Smad = common Smad) für R-Smads, einen Komplex und translozieren in den Zellkern (Lagna et al., 1996). Dort interagieren sie mit spezifischen Transkriptionsfaktoren und regulieren die Expression bestimmter Zielgene zelltypabhängig



(Abb. 1.2.). Sowohl die Translokation in den Zellkern als auch der Export wird durch intrinsische Signaldomänen in den Smad-Proteinen reguliert (Xiao et al., 2001).

Neben dem klassischen Smad-Signalweg spielen auch andere Signalwege bei der Vermittlung der BMP-Wirkung eine Rolle bzw. modulieren den Smad-Signalweg (von Bubnoff und Cho, 2001). So konnte bereits ein „Cross-talk“ zwischen den Smad-Proteinen und Mitgliedern der MAPK-Familie (ERK1/2, p38) aufgezeigt werden (Nakamura et al. 1999).

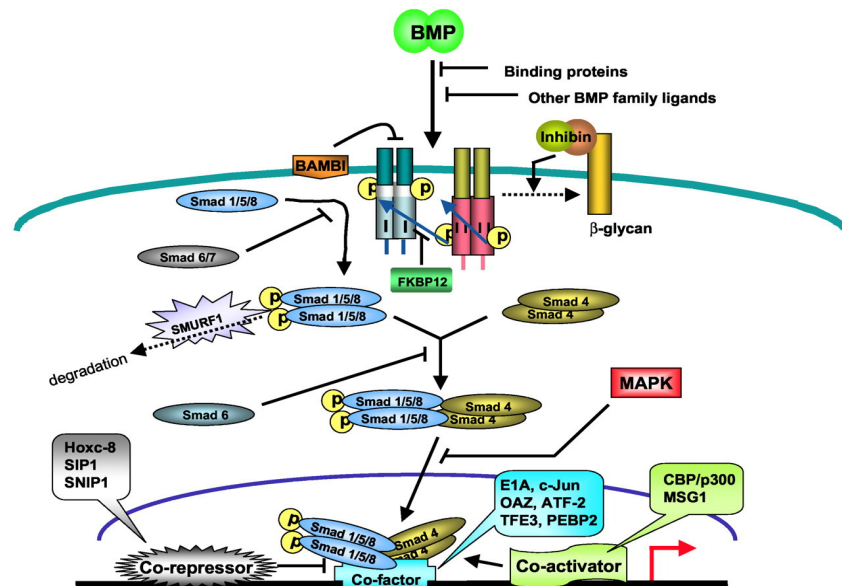


Abb. 1.2. Signaltransduktion der BMPs (Shimasaki et al., 2004)

## 1.4. Regulation des BMP-Signalweges

Die Regulation und Modulation der BMP-Wirkung geschieht auf verschiedenen Ebenen des Signalweges. Vom Extrazellulärraum über die Liganden-Rezeptor-Interaktion und die nachfolgenden Signalkaskade bis hin zum Zellkern können modifizierende Einflüsse auftreten (Abb. 1.2.).

Die extrazelluläre Regulation erfolgt vorrangig über BMP-bindende Proteine. Der Prototyp dieser spezifischen Proteine ist Noggin, das aufgrund seiner Funktion bei der korrekten Anlage der Körperachse in *Xenopus* Embryonen entdeckt wurde (Smith et al., 1992). Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass Noggin über die Bindung an BMPs deren Wirkung inhibiert. Dieses Ergebnis konnte durch die Aufklärung der Kristallstruktur des BMP-7/Noggin-Komplexes untermauert werden, wobei zu erkennen war, dass Noggin die

Epitope von BMP-7 blockiert, die für die Interaktion sowohl zum Typ-I- als auch zum Typ-II-Rezeptor verantwortlich sind (Groppe et al., 2002). Weitere BMP-bindende Proteine wie Follistatin, CTGF (connective-tissue growth factor), Chordin, Chordin like, Gremlin, DAN und Cerberus konnten bisher identifiziert werden. Jedes dieser Proteine weist eine spezifische Affinität für die jeweiligen BMPs auf (Picollo et al., 1996, Hsu et al., 1998, Pearce et al., 1999, Nakayama et al., 2001).

Eine weitere Modulation der Liganden-Rezeptor-Interaktion wird durch Inhibin vermittelt. Dieses entfernte Mitglied der TGF- $\beta$  Superfamilie bindet im Komplex mit membran-gebundenem  $\beta$ -Glycan an ActR-II, ActR-IIB oder BMPR-II und blockiert somit die Signalweiterleitung in die Zelle (Wiater et al., 2003). Das membranintegrale Protein BAMBI (BMP and Activin membran bound inhibitor) zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zum Typ-I-Rezeptor, jedoch fehlt ihm die intrazelluläre Serin/Threonin Kinasedomäne, und somit scheint es als dominant negativer Rezeptor zu fungieren (Onichtchouk et al., 1999).

Die intrazelluläre Signalkaskade kann durch inhibitorische Smads (I-Smads), wie Smad 6 und 7, moduliert werden. Dabei treten die I-Smads in einen kompetitiven Antagonismus mit den R-Smads am aktivierten Typ-I-Rezeptor (Imamura et al., 1997). Darüber hinaus ist Smad 6 in der Lage, die Komplexbildung zwischen Smad 1 und dem Co-Smad 4 zu inhibieren und damit das BMP-Signal zu hemmen (von Bubnoff und Cho, 2001).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation ist die Kontrolle der Proteinstabilität der R-Smads. Mittels der E3 Ubiquitin Ligase SMURF-1 (Smad ubiquitination regulatory factor-1) werden die R-Smads ubiquitinyliert und somit für die Degradation im Proteasomem markiert (Zhu et al., 1999). Die Regulation der BMP-Wirkung im Zellkern erfolgt mittels einer Vielzahl von Coaktivatoren wie MSG1 und Corepressoren wie SIP-1 (Smad interacting protein 1), die entscheidend die Induktion bzw. Repression der Zielgene beeinflussen (Miyazono et al., 2003). Des Weiteren ist die Expression der BMPs, ihrer Rezeptoren und Inhibitoren ein wichtiger Regulationsmechanismus für die gewebespezifische Wirkung der BMPs.

Die BMP-Wirkung kann ebenfalls durch den „Cross-talk“ mit anderen Signalwegen wie beispielsweise dem Wnt-, dem JAK-STAT- und MAPK-Signalweg moduliert werden, wobei die genauen Mechanismen noch wenig verstanden sind (von Bubnoff und Cho, 2001).

## **1.5. Biologische Aktivitäten der BMPs**

Die biologischen Aktivitäten der BMPs weisen eine große Diversität auf und sind bei weitem noch nicht im Detail verstanden. Ursprünglich wurden sie als potente Induktoren und

wichtige Regulatoren des Knochenmetabolismus entdeckt und benannt (Urist, 1965, Wozney et al., 1988). In ihrer Wirkung als Zytokine fördern sie die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zu Chondro- und Osteoblasten (Katagiri et al., 1990, Wang et al., 1993). Das osteoinduktive Potential der BMPs konnte ebenfalls bei der Implantation von rekombinant hergestellten BMPs in das Subkutangewebe von Mäusen nachgewiesen werden (Sampath et al., 1992). Dabei wird eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie mesenchymale Zellinfiltration, Knorpelbildung, Vaskularisierung und Knochenbildung ausgelöst (Wozney 2002). Somit kommt den BMPs eine entscheidende Rolle während der Embryonalentwicklung sowohl des Stamm- als auch des Extremitätenskeletts zu (Wan und Cao, 2004). Die genannten Vorgänge sind ebenfalls essentiell für Knochenwachstum und –reparatur, so dass BMPs bereits in präklinischen und klinischen Studien auf ihr Potential als Therapeutikum untersucht wurden (Cook 1999, Chen et al., 2002). Diese führten bereits zu einer Zulassung von BMP-2 und BMP-7 (OP-1) für verschiedene therapeutische Zwecke durch die amerikanische FDA (Food and Drug Administration) (Friedlaender et al., 2001, Burkus et al., 2002, Johnsson et al., 2002, Baskin et al., 2003).

Darüber hinaus kommen den BMPs eine Reihe von Funktionen während der Embryonalentwicklung zu. Die Embryogenese umfasst eine Vielzahl biologischer Prozesse wie Zellproliferation, -migration, -differenzierung, Determinierung, Organogenese und Apoptose, die durch differentielle Genexpression reguliert werden. Die Expression von BMPs konnte sowohl in Embryonen von Amphibien als auch Vertebraten nachgewiesen werden. Dabei vermitteln die BMPs epidermal-mesodermale Interaktionen, die bei der Organogenese einer Reihe von Organen wie Niere, Hirn, Lunge und Brust eine zentrale Rolle einnehmen.

BMP-2 und BMP-4 beispielsweise sind in der frühen Entwicklung des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* an der Musterbildung des ventralen Mesoderms beteiligt (Köster et al., 1991, Clement et al., 1995). Grundlage dieser Musterbildung ist der Aufbau eines räumlichen und zeitlichen Musters an Zellaktivitäten. Ein fein reguliertes Zusammenspiel der BMPs, ihrer Inhibitoren und weiterer Faktoren trägt entscheidend zum Aufbau von solchen Mustern und Konzentrationsgradienten bei, an denen sich die dorso-ventrale Körperachse ausbilden kann (Yamamoto und Oelgeschläger, 2004). Die Bedeutung dieser Regulationsmechanismen zeigt sich in Experimenten mit einer BMP-2 (Clement et al., 1995) und BMP-4 Überexpression (Dale et al., 1992), die zur Ventralisierung von *Xenopus laevis* Embryonen führt. Eine weitere Rolle bei der Musterbildung des mesodermalen und neuralen Gewebes wird BMP-11 zugeschrieben, welches für die Entstehung von dorsalen Strukturen von Bedeutung ist (Gamer et al., 1999).

Der bereits beschriebene Einfluss der BMPs auf die endochondrale Knochenbildung und die osteoblastische Differenzierung wird durch BMP-6 gefördert (Gitelmann et al., 1994, Yamaguchi et al., 1996). Darüber hinaus zeigt BMP-6 eine antiproliferative Wirkung durch Hemmung der Zellteilung (Drozdoiff et al., 1994).

Entwicklungsbiologisch betrachtet ist BMP-7 entscheidend an der Vermittlung von epidermal-mesodermalen Interaktionen während der Nieren- und Augenentwicklung beteiligt (Dudley et al., 1995, Godin et al., 1999). Auch im adulten Organismus ist BMP-7 für die korrekte Anlage der Niere notwendig, wobei es für die Stimulierung und Aufrechterhaltung der epithelialen Zellen von Bedeutung ist (Simon et al., 1999). Durch ein fein abgestimmtes Zusammenspiel und eine exakt lokalisierte Expression von BMP-7, BMP-2 und BMP-4 wird die erforderliche Apoptose im Mesoderm der Interdigitalen induziert, die für die Ausbildung der Finger erforderlich ist (Guha et al., 2002, Bastida et al., 2004).

Die Feinabstimmung der BMP-Expression und der Aufbau von zeitlichen und räumlichen Gradienten von einzelnen BMPs aber auch die Koordination verschiedener BMPs und deren lokale und temporale Verteilung sind im Fortpflanzungssystem von Säugern von mannigfaltiger Bedeutung (Shimasaki et al., 2004).

Des Weiteren konnte eine chemotaktische Wirkung von BMPs auf verschiedene Zellen, wie z.B. auf humane Monozyten, nachgewiesen werden (Cunningham et al., 1992, Kim et al., 1999, Fiedler et al., 2002). Die BMP-2 Expression glatter Gefäßmuskeln scheint eine chemotaktische Rolle bei der Reaktion der Zellen auf Verletzungen auszuüben (Willette et al., 1999).

Die aufgeführten biologischen Effekte der BMPs stellen nur eine kleine Auswahl dar und verdeutlichen die Vielfalt der BMP-Wirkung. Allen gemeinsam scheint die Abhängigkeit der biologischen Aktivität von Faktoren wie Konzentration, Dauer der Exposition, räumliche und zeitliche Verteilung, aber auch Zelltyp und dessen genetischer Ausstattung. Veränderungen oder Dysregulationen des BMP-Systems konnten als (Mit)Ursache für bestimmte Erkrankungen wie Fibrodysplasia ossificans progressiva, das Grebe Syndrom und die Hunter-Thompson Erkrankung identifiziert werden (Thomas et al., 1997, Kaplan et al., 2006). Aber auch Erkrankungen, die nicht mit Störungen des Knochenstoffwechsels assoziiert sind, wie beispielsweise Krebserkrankungen, konnten in Zusammenhang mit dem BMP-Signalnetzwerk gebracht werden.

## 1.6. BMPs im Tumorgeschehen

Betrachtet man die Vorgänge während der Tumorinitiation/-progression und der Embryonalentwicklung so finden sich viele Gemeinsamkeiten. Prozesse wie Migration, Proliferation, Apoptose und Vaskularisierung spielen in beiden Fällen eine entscheidende Rolle. Sieht man die Embryonalentwicklung als einen Prozess der Differenzierung, kann die Tumorigenese als eine Dedifferenzierung oder Umdifferenzierung (Transdifferenzierung) der Zellen hin zu einem embryonalen/fetalen Geno- und Phänotyp angesehen werden. Eine entscheidende Rolle der BMPs in der Embryogenese konnte bereits nachgewiesen werden. Die Frage nach einer ähnlichen Funktion in der Tumorbiologie ist somit nahe liegend.

Die Expression von BMPs, ihrer Rezeptoren und Molekülen der Signaltransduktion konnte bereits in verschiedenen Tumoren gezeigt werden. So werden BMPs in Mammakarzinomen (Clement et al., 1999, Arnold et al., 1999, Alarmo et al., 2007), in Ösophaguskarzinomen (Raida et al., 1999), in Prostatakarzinomen (Harris et al., 1994) und in Ovarialkarzinomen (Theriault et al., 2007) exprimiert. Aber auch in Tumoren des Magens, der Speicheldrüse, der Lunge, des Kolons und des Pankreas sowie Gliomen konnte eine BMP Expression detektiert werden (Yamada et al., 1996, Katoh et al., 1996, Kusafuka et al., 1998, Kleeff et al., 1999, Hardwick et al., 2004, Langenfeld et al., 2005). Die Ergebnisse beruhen auf Untersuchungen sowohl an Tumormaterial als auch an etablierten Zelllinien. Die Varianz der BMP Expression und deren Verteilung auf verschiedene Gewebe ist enorm. Ebenso vielfältig sind die beobachteten Effekte, und es steht fest, dass die BMP-Wirkung eine zelltypspezifische ist. Die mitunter gegensätzlichen Daten führen zu einer möglichen Rolle der BMPs in der Tumorigenese, die vom Tumorsuppressor bis hin zum Tumorpromoter reicht (Hsu et al., 2005). BMP-4 wird während der Progression des Kolonkarzinoms hochreguliert und fördert den invasiven Phänotyp im Zellkulturmodell (Deng et al., 2007). Beim Ovarialkarzinom scheint BMP-4 ebenfalls eine tumorfördernde Funktion einzunehmen, indem es die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) induziert (Theriault et al., 2007). Ein Einfluss von BMPs auf die Proliferation, einem zentralen Vorgang der Tumorigenese, konnte ebenfalls nachgewiesen werden, wobei die Daten widersprüchlich sind. BMP-2 stimuliert das Wachstum der humanen Lungenkrebszelllinie A549 (Langenfeld et al., 2003), wohingegen BMP-2 im Kolonkarzinom eine wachstumshemmende Wirkung hat (Beck et al., 2006). Eine mögliche Funktion der BMPs als Tumorsuppressor gründet sich auf Daten, die den Verlust von BMPs, deren Rezeptoren oder Signalmolekülen mit aggressiveren Tumoren in Zusammenhang bringen (Kim et al., 2004, 2004a). So fördert die Hemmung der BMP-3

Expression die Tumorentwicklung in der Lunge (Dai et al., 2004), und ein Funktionsverlust von Smad4 wurde im Pankreaskarzinom gefunden (Hahn et al., 1996).

Eine eindeutige Aussage zur Funktion der BMPs im Tumorgeschehen konnte bisher nicht getroffen werden. Die Vielzahl und die Divergenz der bisherigen Daten sprechen für eine diffizile Rolle der BMPs, die von einer Vielzahl von Faktoren, wie beispielsweise dem Zelltyp, abhängig scheinen. Neben dem Vorhandensein bestimmter BMPs in Tumoren kommt den Rezeptoren, Signalmolekülen und Inhibitoren zunehmend Bedeutung zu. Diese bedarf einer systematischen Untersuchung.

## **1.7. BMPs im Mammakarzinom**

Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts erkranken jährlich über 55.100 Frauen in Deutschland an Brustkrebs. Das Mammakarzinom stellt mit einem Anteil von 26,8% die häufigste Krebserkrankung bei Frauen dar. Laut Statistischem Bundesamt verstarben im Jahr 2005 in Deutschland 17.455 Frauen an Brustkrebs. Diese Zahlen verdeutlichen eindrucksvoll die Bedeutung und die Gefahr des Brustkrebses. Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist vielschichtig und nach wie vor nicht eindeutig geklärt. Viele Einzelfaktoren wurden bereits analysiert, doch man muss wahrscheinlich von einem multifaktoriellen Geschehen ausgehen. Die genetische Disposition des Mammakarzinoms liegt nur bei 5-10% (Chang-Claude, 1997), so dass der größere Teil der Karzinome durch andere Faktoren bedingt wird. Dabei werden vor allem reproduktive Einflüsse wie frühe Menarche, späte Menopause, geringe Anzahl an Schwangerschaften bzw. Nullipara und andere diskutiert. Aber auch der Lebensstil mit Aspekten wie Gewichtszunahme, Rauchen, Alkoholkonsum und geringe körperliche Aktivität scheint das Erkrankungsrisiko zu beeinflussen. Die Inzidenz des Mammakarzinoms steigt mit dem Alter, wobei der steilste Anstieg zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr zu verzeichnen ist. Die Einteilung des Mammakarzinoms erfolgt vorrangig nach histologischen Kriterien (Bässler, 1998). Aber auch biochemische, immunhistochemische und molekulargenetische Parameter werden zur Prognoseabschätzung und zur individuellen Therapieplanung herangezogen. Die Identifizierung und Charakterisierung weiterer Faktoren sind essentiell für eine patientenspezifische Diagnostik und Therapie und somit Gegenstand vieler Forschungsprojekte.

Einen potentiellen Beitrag zu diesem Gebiet leistet die Erforschung der Rolle der BMPs während der Tumorigenese und die Aufklärung zugrunde liegender Mechanismen, die als Ansatz für neue Therapien dienen können.

Charakteristisch für die Entwicklung der Brustdrüse sind epitheliale-mesenchymale Interaktionen (Thesleff et al., 1995), die auch von den Knochenmorphogenesefaktoren entscheidend beeinflusst werden. Während verschiedener Entwicklungsstadien der fetalen und postnatalen Brustdrüse konnte die Expression von BMP-2 und BMP-4 nachgewiesen werden (Phippard et al., 1996). Diese Ergebnisse deuten auf eine Rolle der BMPs während der Entstehung und Progression des Mammakarzinoms hin.

Die Expression verschiedener BMPs, ihrer Rezeptoren und intrazellulärer Signalmoleküle in Mammakarzinomen bzw. Mammakarzinomzelllinien konnte bereits belegt werden (Arnold et al., 1999, Clement et al., 1999, Alarmo et al., 2007). Die Daten weisen eine große Varianz und Heterogenität auf. In der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 scheint BMP-2 die östrogen-induzierte Proliferation zu hemmen (Ghosh-Choudhury et al., 2000). Dem gegenüber steht der Befund, das BMP-2 transfizierte MCF-7 im *Xenograft*-Modell ein hormonunabhängiges Tumorwachstum zeigen (Clement et al., 2005). Die Expression von BMP-6 im Mammakarzinom wurde in Zusammenhang mit dem EGFR gebracht (Clement et al., 1999), und BMP-7 zeigte eine positive Korrelation mit dem Progesteron- und Östrogenrezeptorstatus (Schwalbe et al., 2003). Transkripte für BMP-2 und BMP-3 sowie für verschiedene Rezeptoren konnten in den Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 nachgewiesen werden (Arnold et al., 1999). Diese Daten und die Beteiligung von BMP-2 an der Entwicklung der fötalen und postnatalen Brustdrüse führten zur Konzentration der vorliegenden Arbeit auf Untersuchungen zur tumorbiologischen Relevanz von BMP-2 im Mammakarzinom.

## **1.8. Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)**

BMP-2 ist ein 32 kDa großes Homodimer, das als 453 Aminosäuren langes Präproprotein synthetisiert wird. Durch Glykosylierung, proteolytische Spaltung und Dimerisierung entsteht das mature BMP-2, bestehend aus den 114 C-terminalen Aminosäuren (Scheufler et al., 1999). BMP-2 wurde ursprünglich als Induktor der endochondralen Knochenbildung beschrieben (Urist, 1965). Dabei zeigte sich BMP-2 als das potenteste BMP für die Induktion der osteoblastären Differenzierung von pluripotenten und mesenchymalen Stammzellen (Cheng et al., 2003). Aufgrund seiner entscheidenden Rolle für die Knochenbildung wurde BMP-2 als mögliches Therapeutikum bei Frakturen und Störungen des Knochenstoffwechsels identifiziert. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung von Endoprothesen mit rekombinant hergestelltem BMP-2 zu einer verbesserten Osteointegration führt (Thorey et

al., 2006). Aber auch bei der Behandlung schwieriger Frakturen und in der wiederherstellenden Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie sowie bei Zahnimplantaten konnte BMP-2 bereits erfolgreich eingesetzt werden (Kübler et al., 1998, Boyne et al., 2005, Wikesjö et al., 2007).

Des Weiteren wird BMP-2 eine entwicklungsbiologische Bedeutung zugeschrieben. So ist es entscheidend an der Musterbildung des ventralen Mesoderms in *Xenopus laevis*-Embryonen beteiligt (Köster et al., 1991, Clement et al., 1995), wobei die BMP-2 Expression auf bestimmte Zellen beschränkt ist.

Zusätzlich zu diesen „klassischen“ Funktionen von BMP-2 konnten noch viele weitere Wirkungsgebiete aufgedeckt werden, so dass man BMP-2 mittlerweile als multifunktionelles Zytokin betrachtet, welches die Differenzierung eine Vielzahl von Zelltypen beeinflusst. Fast alle der beschriebenen Effekte sind zeitlich begrenzt und konzentrations- sowie ortsabhängig. So bewirkt BMP-2 in Synergie mit LIF (leukemia inhibitory factor) die Differenzierung von primären fetalen Vorläuferzellen zu Astrozyten (Nakashima et al., 1999). Bei der myocardialen Musterbildung ist BMP-2 essentiell für die epithelial-mesenchymale Transition (Ma et al., 2005).

Darüber hinaus konnte, wie bereits ausgeführt, eine Expression von BMP-2 in Tumoren gezeigt werden. Zusätzlich zu dem Nachweis des Vorhandenseins von BMP-2 in Karzinomen konnten entscheidende Vorgänge in der Tumorigenese wie Migration und Invasivität (Clement et al., 2005), Neoangiogenese (Langenfeld et al., 2004, Raida et al., 2005) oder Apoptose (Clement et al., 2000, Kawamura et al., 2002) als BMP-2 regulierte Prozesse identifiziert werden. Diese Daten deuten sowohl auf eine pro-tumorigene als auch auf eine anti-tumorigene Rolle von BMP-2 während der Tumorigenese hin. Während eine Induktion der Apoptose (Kawamura et al., 2002) bzw. eine Wachstumshemmung (Beck et al., 2006) eine Funktion als Tumorsuppressor vermuten lassen, sprechen die BMP-2 stimulierte Angiogenese (Langenfeld et al., 2004), die erhöhte Migrations- und Invasionsneigung und die Stimulation des Tumorwachstums (Langenfeld et al., 2003) für eine tumorfördernde Wirkung. Diese scheinbare Diskrepanz kann nur anhand weitergehender Untersuchungen geklärt werden, zu denen die vorliegende Arbeit einen Beitrag leisten soll.



## 1.9. Zielstellung der Arbeit

Aus den vorangegangenen Ausführungen ist ein Zusammenhang zwischen BMP-2 und der Tumorigenese des Mammakarzinoms erkennbar, wobei BMP-2 sowohl als Tumorsuppressor als auch als Tumorpromotor fungieren kann. Mit Kenntnis der pro-tumorigenen Effekte von BMP-2 wie Erhöhung der Invasions- und Migrationsneigung *in vitro* (Clement et al., 2005) und gesteigertem Tumorwachstum *in vivo* (Langenfeld et al. 2003) sowie der anti-tumorigenen Wirkung wie beispielsweise die Hemmung der östrogen-induzierten Proliferation (Ghosh-Choudhury et al., 2000), stellt sich die Frage nach der Ursache dieser mitunter gegensätzlichen Rolle von BMP-2 in der Tumorigenese des Mammakarzinoms. Einflüsse wie Konzentration, Expositionsdauer und zellulärer Gesamtkontext sind denkbar und wurden bereits beschrieben (Clement et al., 1995, Shimasaki et al., 2004, Sjödal et al., 2007). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der Expositionsdauer von BMP-2 auf die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 untersucht und auf einen Zusammenhang mit Prozessen der Tumorigenese geprüft werden. Die BMP-2 induzierten Veränderungen infolge einer Kurzzeit- und Langzeitapplikation sollten mittels eines DNA-Microarrays bestimmt und die veränderten Gene hinsichtlich ihrer biologischen Funktion vergleichend analysiert werden. Dabei sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Gibt es Unterschiede in den differentiell exprimierten Genen infolge einer Kurzzeit- bzw. Langzeitapplikation von BMP-2?
2. Kann ein Zusammenhang zwischen den veränderten Genen und Prozessen der Tumorigenese hergestellt werden und zeigen diese eine Abhängigkeit von der Expositionsdauer von BMP-2?

Gleichzeitig sollte ein Zellsystem mit induzierbarer BMP-2 Expression auf Basis des Tet-Systems etabliert werden, um genauere Untersuchungen zur zeitabhängigen Wirkung von BMP-2, wie beispielsweise definierte Zeitreihen, zu ermöglichen.

Parallel zu den *in vitro*-Untersuchungen sollte die klinische Relevanz von BMP-2 genauer beleuchtet werden. Dazu erfolgte der Nachweis von BMP-2 an einem großen Kollektiv Brustkrebspatienten mittels Multigewebearray-Technologie. Dabei sollte zum einen die Expression in Tumorgewebe bestimmt und zum anderen die Verteilung von BMP-2 genauer untersucht werden. Die so gewonnenen Daten sollten anschließend mit statistischen Methoden auf Korrelationen zu histopathologischen Parametern und Überlebenszeiten geprüft werden.

## 2. Methoden

Alle verwendeten Chemikalien, Lösungen und Geräte sind im Kapitel „Material“ aufgeführt.

### 2.1. Zellbiologische Methoden

Für zellbiologische Experimente ist es von entscheidender Bedeutung stets auf absolute Keimfreiheit zu achten, um eine Kontamination der Zellen durch Mikroorganismen auszuschließen. Zu diesem Zwecke wurden alle Arbeiten unter sterilen Laminarboxen durchgeführt und alle verwendeten Geräte vor Gebrauch desinfiziert bzw. für 20 min bei 120°C autoklaviert. Die Kulturmedien lagen bereits steril vor und weitere benötigte Chemikalien und Lösungen wurden autoklaviert oder durch einen 0,2 µm-Filter steril filtriert.

#### 2.1.1. Zelllinien

Als Modellsystem für die geplanten Experimente wurde die humane Mammakarzinomzelllinie MCF-7 verwendet (ATCC, Manassas, USA), eine Östrogenrezeptor-positive Zelllinie, die als adhärente Monolayer wächst. Die stabil mit BMP-2 transfizierten MCF-7 (MCF-7/BMP-2) und die korrespondierende Kontrollzelllinie mit dem Leervektor pcDNA 3.1 (MCF-7/3.1) wurden in unserer Arbeitsgruppe hergestellt und liegen dementsprechend vor (Clement et al., 2005). Die für die induzierbare Überexpression benötigte Zelllinie MCF-7 Tet-On, die bereits mit dem Tet-On Vektor stabil transfiziert wurde, wurde bei der Firma BD Clontech erworben. Es erfolgte eine regelmäßige Testung auf Mycoplasmen.

#### 2.1.2. Zellkultivierung

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden an Sterilwerkbänken durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei konstant 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit in Brutschränken. Als Nährmedium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FCS). Für die Kultivierung der MCF-7 Tet-On wurde spezielles Serum verwendet, welches auf Verunreinigungen von Tetracyclin getestet wurde.

#### 2.1.3. Auftauen der Zellen

Die konservierten Zellen wurden in Flüssigstickstoff bei -196°C in Kryoröhrchen aufbewahrt. Das Auftauen erfolgte in einem handwarmen Wasserbad. Die Zellsuspension wurde in 10 ml

DMEM + 10% FCS bei einer Zugabe von 1 ml/min aufgenommen und anschließend in einem 15 ml Falconröhrchen für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert, und der DMSO-haltige Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 7 ml frischem DMEM + 10% FCS aufgenommen und in eine 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt.

#### 2.1.4. Passagieren der Zellen

Das Passagieren erfolgte bei einer zu ca. 80% konfluent bewachsenen Zellkulturfläche. Die Kultur wurde zunächst mikroskopisch begutachtet und auf eventuelle Kontaminationen geprüft. Anschließend wurde das verbrauchte Medium verworfen und die Zellkultur mit D-PBS gewaschen. Durch Zugabe von Trypsin wurden die adhärent wachsenden Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflaschen abgelöst. Nach einer Inkubation von 2-3 min wurde das Trypsin durch Zugabe von Zellkulturmedium und der darin enthaltenen Proteaseinhibitoren inaktiviert. Ein Teil dieser Zellsuspension wurde je nach Wachstum der Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit frischem Medium versetzt.

#### 2.1.5. Kryokonservierung der Zellen

Ein subkonfluent gewachsener Zellrasen wurde geerntet, und die Zellen in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml mit Einfriermedium versetzt (DMEM + 20% FCS+ 10% DMSO) und in Kryoröhrchen überführt. Nach einer Lagerung für 3-10 Tage bei -80°C wurden diese in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingelagert.

#### 2.1.6. Zellzahlbestimmung

Die Kryokonservierung, Inkubationsversuche und weitere Experimente machten eine genaue Zellzahlbestimmung notwendig, um definierte Versuchsbedingungen zu schaffen. Die Bestimmung der Zellzahl wurde am Beckmann Coulter Z1 vorgenommen. Die Zellen wurden geerntet, für 5 min bei 1000 U/min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen entsprechend der Pelletgröße in 2-10 ml Medium (Suspensionsvolumen) resuspendiert. 50 µl dieser Zellsuspension wurden mit 20 ml Isoton II versetzt und in der Zählkammer gemessen. Das Volumen, das zur Aussaat der benötigten Zellzahl erforderlich war, wurde mit folgender Formel berechnet:

$$V_z = V_s \left( \frac{C_s}{C_z} - 1 \right)$$

$V_z$  = Zusatzvolumen

$V_s$  = Suspensionsvolumen

$C_s$  = Zellkonzentration (ml<sup>-1</sup>)

$C_z$  = benötigte Zellkonzentration (ml<sup>-1</sup>)

## **2.2. Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.1. RNA-Isolierung**

Die Präparation der RNA erfolgte mit Hilfe des innuPREP RNA Mini Kits (AnalytikJena, Jena). Alle Arbeitsschritte und Zentrifugationen erfolgten bei Raumtemperatur. Das Medium wurde verworfen und die Zellen 3mal mit D-PBS gewaschen. Durch Zugabe von 400 µl Zellysepuffer RL wurden die Zellen aufgebrochen und mit einem Zellschabers von der Oberfläche der Zellkulturflasche gelöst. Anschließend wurden die Proben in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und über Nacht bei -80°C gelagert. Dieser Schritt verstärkte die denaturierende Wirkung des im Lysepuffer RL enthaltenen Guanidinisothiocyanat, und der Einfrier- und Auftauvorgang erhöhte die Effektivität der Zellyse. Nach dem Auftauen wurde die visköse Masse, bedingt durch hochmolekulare genomische DNA, durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren homogenisiert und auf den Spin Filter D gegeben. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 2 min bei 12000 U/min zur Entfernung der Zelltrümmer. Das Filtrat wurde mit 400 µl 70%igem Alkohol versetzt und durch Pipettieren gemischt bis keine Phasentrennung mehr sichtbar war. Das Gemisch wurde auf einen Silicagel enthaltenden Spin Filter R gegeben und bei 12000 U/min für 2 min zentrifugiert. Dieser entscheidende Schritt der RNA-Isolierung nutzt die Fähigkeit von auf Silicagel-basierenden Membranen, Nukleinsäuren unter hohen Konzentrationen chaotroper Salze reversibel zu binden. Der für die Zellyse verwendete Guanidinisothiocyanat-haltige Puffer und die Zugabe von Ethanol schaffen Bedingungen für die selektive Bindung von RNA. Die folgenden Waschschrte mit 500 µl Waschlösung HS und 700 µl Waschlösung LS und zwischengeschalteten Zentrifugationsschritten (je 1 min bei 10000 U/min) dienen der möglichst vollständigen Entfernung von anderen Zellbestandteilen. Eine abschließende Zentrifugation für 3 min bei 10000 U/min entfernt eventuelle Reste von Ethanol, die bei der Elution stören könnten. Abschließend wurde die RNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser für 1 min inkubiert und mit einer Zentrifugation (1min bei 10000U/min) von der Silicamembran eluiert. Die so erhaltene RNA-Lösung wurde auf Eis gestellt und sofort weiter verwendet oder bei -80°C gelagert.

### **2.2.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte photometrisch am NanoDrop-1000. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, basierend auf dem aromatischen Ringsystem der Basen. Proteine hingegen werden aufgrund ihrer

aromatischen Aminosäurereste bei 280 nm detektiert. Mit Hilfe des NanoDrops wird ein Absorptionsspektrum von 220-350 nm aufgenommen und dargestellt. Des Weiteren wird der Quotient 260/280 nm bestimmt, der eine Aussage über die Reinheit der vorliegenden RNA ermöglicht. Für eine reine RNA-Lösung sollte der Wert bei 2,0 liegen. Verunreinigungen etwa durch Proteine werden durch ein Absinken dieses Quotienten deutlich. Ein weiterer Indikator der Reinheit ist der Quotient 260/230, der zwischen 1,8-2,2 liegen sollte und andernfalls auf co-aufgereinigte Kontaminationen hinweist. Für die Konzentrationsberechnung aus den Absorptionswerten gilt das Lambert Beer'sche Gesetz:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

A = Absorption

$\varepsilon$  = elementspezifischer Extinktionskoeffizient in  $\text{m}^2/\text{mol}$

c = Konzentration der Lösung in  $\text{mol}/\text{m}^3$

d = Schichtdicke der durchstrahlten Probe

1  $\mu\text{l}$  der RNA-Lösung wurde für die Konzentrationsbestimmung auf die Messsonde pipettiert und die Messung gestartet. Die erhaltenen Konzentrationen wurden in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  angegeben.

### 2.2.3. Reverse Transkription

Für weitergehende Untersuchungen wurde die für Degradation sensible RNA in die stabilere cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Für die Untersuchung des Expressionsniveaus ist hauptsächlich die mRNA von Interesse. Durch die Verwendung des Oligodesoxynukleotids Oligo-dT als Primer, der das mRNA spezifische 3'-Poly-Adenosin erkennt, wird vornehmlich mRNA in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe der Random Hexamerprimer, Hexanukleotide verschiedener Sequenz, werden unterschiedliche RNA-Abschnitte (mRNA, tRNA, rRNA) erkannt und es wird ein Pool verschieden langer cDNA-Moleküle synthetisiert. Für eine effektive Umsetzung der mRNA wurde die retrovirale Reverse Transkriptase aus dem Moloney Leukemia Virus (MLV) eingesetzt.

Zunächst wurde 1  $\mu\text{g}$  der isolierten RNA auf ein Gesamtvolumen von 8,5  $\mu\text{l}$  mit RNase-freiem Wasser verdünnt und für 5 min bei 65°C inkubiert, um eventuelle Sekundärstrukturen zu reduzieren. Anschließend wurden 11,5  $\mu\text{l}$  des folgenden Reaktionsgemisches zugegeben:

- 4  $\mu\text{l}$  5x M-MLV Reaktionspuffer
- 2  $\mu\text{l}$  Dithiothreitol (DTT) (0,1 M)
- 1  $\mu\text{l}$  Oligo-(dT)<sub>15</sub>-Primer (0,2 mg/ml)
- 1  $\mu\text{l}$  Random-Hexamerprimer (0,2 mg/ml)
- 1  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 0,5  $\mu\text{l}$  RNaseOUT™-Ribonuklease (40U/ $\mu\text{l}$ )
- 1  $\mu\text{l}$  M-MLV Reverse Transkriptase (200U/ $\mu\text{l}$ )

Nach einer zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben für 60 min bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde die Reverse Transkriptase für 8 min bei 95°C inaktiviert. Die Lagerung der synthetisierten cDNA erfolgte bei -20°C.

#### **2.2.4. rt-PCR**

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode zur spezifischen Amplifikation von DNA-Abschnitten einer Matrize. Durch den Einsatz spezifischer Primer, die auf einem Strang zu beiden Seiten des zu amplifizierenden Gen-Segments hybridisieren, kann ein Gen von Interesse nachgewiesen werden. Eine spezielle Form der PCR ist die rt-PCR (Reverse Transkriptions-PCR), bei der in cDNA umgeschriebene mRNA als Template fungiert. Diese Methode dient dem Nachweis der Expression eines bestimmten Gens. Der Prozess der PCR setzt sich aus verschiedenen sich wiederholenden Temperaturstufen zusammen. Zunächst wird der Ansatz auf 95°C erhitzt, um die DNA in Einzelstränge zu trennen (Denaturieren). Anschließend erfolgt die Abkühlung auf eine Temperatur, die die Hybridisierung der Primer begünstigt (Annealing-Temperatur). Durch die Anlagerung der Primer wird ein freies 3'-OH-Ende bereitgestellt, welches im folgenden Schritt verlängert wird. Dazu wird das Reaktionsgemisch auf 74°C erwärmt, welches das Aktivitätsoptimum der Taq-DNA-Polymerase darstellt und eine schnelle Verlängerung der Primer gewährleistet (Elongation). Dieser Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird 30-40mal durchlaufen, wobei die Menge des spezifisch amplifizierten Genabschnittes exponentiell zunimmt. Eine initiale Denaturierung wird diesen Zyklen vorgeschaltet, um die komplexen, hochmolekularen Strukturen der DNA aufzulösen. Des Weiteren ist eine terminale Elongation bei 74°C nachgeschaltet, um eine vollständige Verlängerung der synthetisierten Stränge zu gewährleisten.

Der PCR-Ansatz für jede Reaktion (Gesamtvolumen 25 µl) bestand aus folgenden Komponenten:

- 1 µl cDNA-Matrize
- 2,5 µl 10x PCR-Puffer (enthält 15 mM MgCl<sub>2</sub>)
- 1 µl Primergemisch aus sense und antisense-Primer (je 10 µM)
- 2 µl dNTP-Mix (je 2,3 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 0,2 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)
- 18,3 µl Aqua dest.

Der Ansatz wurde gemischt und anschließend kurz abzentrifugiert. Die Reaktion wurde im Thermocycler Trio Thermoblock durchgeführt. Es wurde jeweils eine Negativkontrolle ohne

cDNA-Matrize mitgeführt. Die Primersequenzen für die jeweiligen amplifizierten Gene sind im Kapitel „Material“ aufgeführt.

### **2.2.5. Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese**

Die PCR-Produkte wurden anhand ihrer Größe in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppen wandert die DNA im elektrischen Feld von der Kathode in Richtung Anode. Dabei besteht ein empirisch beobachteter Zusammenhang zwischen der relativen Wanderungsdistanz (in cm, bezogen auf die gesamte Wanderungsstrecke) im Agarosegel und dem Logarithmus der Länge des Fragments (in bp). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit einem 1%igen analytischen TAE-Agarosegel versetzt mit Ethidiumbromid (1µg/ml). 15 µl der PCR-Reaktion wurden mit 5 µl DNA-Ladungspuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Für den Fragmentlängenvergleich wurden 10 µl eines 1 kb DNA-Längenstandards mitgeführt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA durchgeführt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die PCR-Produkte durch Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht. Die Visualisierung beruht auf der Eigenschaft von Ethidiumbromid, sequenzunspezifisch in doppelsträngige Nukleinsäuren zu interkalieren und unter Anregung ein detektierbares Fluoreszenzsignal abzustrahlen.

### **2.2.6. realtime-PCR**

Die realtime-PCR basiert auf den Grundlagen der konventionellen PCR Methode (Kapitel 2.2.4.). Aber im Gegensatz zu der rt-PCR, bei der man den Endpunkt der Reaktion betrachtet, wird bei der realtime-PCR der exponentielle Zuwachs des zu amplifizierenden Genabschnittes nach jedem Zyklus in Echtzeit detektiert. Dabei wird die Eigenschaft von SYBR Green<sup>®</sup>, einem Fluoreszenzfarbstoff genutzt, der sequenzunspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert. Die Intensität des gemessenen Fluoreszenzsignals korreliert direkt mit der Menge des amplifizierten Genabschnittes. Mit dieser Methodik und der zugehörigen Software ist es möglich, den Verlauf der PCR-Reaktion direkt zu verfolgen. Die Länge der exponentiellen Phase und der Übergang in die Sättigung sind genauso erkennbar wie die momentane Produktmenge. Anhand einer Schmelzpunktanalyse erfolgt die Identifizierung der Produkte, wobei die Größe und der GC-Gehalt positiv mit der Schmelztemperatur korrelieren. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels einer Regressionskurve von bekannten Standardkonzentrationen. Die Reaktion wurde in einem Mastercycler<sup>®</sup> ep *realplex* durchgeführt. Dabei

handelt es sich um ein realtime-PCR System im 96 well-Format mit extrem hohen Temperiergeschwindigkeiten und kurzen Detektionszeiten.

Die Probenvorbereitung wurde in einem Kühlblock (4°C) durchgeführt. Die 96 well-PCR-Platte wurde auf diesem Block platziert und jeweils 1 µl der zu untersuchenden Probe bzw. des Standards in ein well pipettiert. Die Standards für beta-Aktin wurden in unserem Labor hergestellt und lagen dementsprechend vor. Zu den vorgelegten Proben wurden 19 µl Mastermix, bestehend aus folgenden Komponenten, zugegeben:

- 1 µl Primergemisch (sense und antisense, 1:1)
- 10 µl SYBR Green Mastermix ready-to-use
- 8 µl PCR-grade Wasser

Das Reaktionsgemisch wurde mit CapStrips verschlossen oder mit dem HeatSealer hermetisch heißversiegelt, gemischt und abschließend kurz abzentrifugiert. Die Platte wurde in der Apparatur platziert und das benötigte Programm gestartet. Alle PCR-Parameter (Temperatur und Länge von Denaturierung, Annealing und Elongation, Anzahl der Zyklen) sowie das Programm zur Schmelzpunktanalyse wurden in der zugehörigen Software eingestellt und variiert.

## **2.3. cDNA Microarray**

Die Untersuchungen zur Wirkung von Kurzzeit- und Langzeitapplikation von BMP-2 wurden mit Hilfe von cDNA-Microarray Experimenten durchgeführt. Diese Methodik ermöglicht einen globalen Vergleich der Expressionsmuster verschiedenen Versuchsansätze. Als Modell für eine Langzeitapplikation von BMP-2 diente die BMP-2 überexprimierende Mammakarzinomzelllinie MCF-7/BMP-2. Die Kurzzeitgabe von BMP-2 wurde mit Inkubationsversuchen mit MCF-7 simuliert.

### **2.3.1. Inkubationsversuche**

Um die Kurzzeiteffekte von BMP-2 zu untersuchen, wurden subkonfluent gewachsene MCF-7 nach 24 h Serumfreiheit für 4h mit 100 ng/ml rhBMP-2 (Dr. P. Hortschansky, HKI Jena) inkubiert. Eine serumfreie Kontrolle wurde mitgeführt. Die BMP-2 überexprimierende Zelllinie MCF-7/BMP-2 und die korrespondierende Kontrollzelllinie MCF-7/3.1 wurden für 24 h serumfrei kultiviert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit D-PBS gewaschen und die RNA mittels innuPREP RNA Mini Kit (siehe 2.2.1.) isoliert.



### 2.3.2. Probenpräparation und Hybridisierung

Die Hybridisierungsproben für die Affymetrix HG-U133A Microarrays wurden nach der Vorschrift des Produzenten hergestellt. Die isolierte Gesamt-RNA wurde als Matrize zur Synthese einer cDNA (Erststrangsynthese) verwendet. Die eingesetzten T7-(dT)<sub>24</sub> Primer erkennen das 3'-Oligo-dT-Ende der mRNA-Moleküle und amplifizieren diese spezifisch. Im nächsten Schritt erfolgte die DNA-Zweitstrangsynthese, indem die vorliegende Heteroduplex aus mRNA und cDNA mittels der RNase H in Stücke geschnitten wurde, die im Folgenden als Primer für die DNA Polymerase I dienen. Die Polymerase besitzt eine 5'-3'-Exonucleaseaktivität und baut vor ihr liegende DNA- und RNA-Fragmente ab (Nick-Translation). Bei vorzeitiger Dissoziation der Polymerase verbindet die DNA-Ligase die Zweitstrang-Fragmente. Die T4-DNA-Polymerase stellt sicher, dass der Zweitstrang bis zum 5'-Ende des Erststrangs verlängert wird. Die gewonnene Doppelstrang-cDNA diente als Vorlage zur Herstellung einer biotin-markierten cRNA (*in vitro* Transkription). Dabei nutzt man den 3'-terminalen Teil des Zweitstranges als Promotor für die T7-RNA Polymerase. Die einzelnen Schritte sollen nachfolgend kurz dargestellt werden:

#### 1. Erststrangsynthese (SuperScript Choice System)

##### Hybridisierung der Primer

- 5 µg Gesamt-RNA
- 1 µl T7-(dT)<sub>24</sub>-Primer (100µM)
- 7 µl RNase-freies Wasser

→ Inkubation für 10 min bei 70°C  
5 min bei 0°C

##### Synthese

- Zugabe von 4µl 5x First Strand cDNA Buffer
- 2 µl 0,1M DTT
- 1 µl 10mM dNTP-Mix

→ Inkubation für 2 min bei 42°C  
- Zugabe von 1µl 200U/µl Superscript II  
→ 1h bei 42°C

#### 2. Zweitstrangsynthese

zur synthetisierten cDNA werden folgende Komponenten zugegeben

- 91µl H<sub>2</sub>O
- 30µl Second Strand Reaction Buffer
- 3µl dNTP-Mix (10mM/Base)
- 1µl DNA Ligase (10U/µl)
- 4µl DNA Polymerase I (10U/µl)
- 1µl RNase H (2U/µl)

→ Inkubation für 2h bei 16°C  
- 2µl T4 DNA-Polymerase (5U/µl)  
→ 5 min bei 16°C

- Reaktionsstop durch Zugabe von 10µl EDTA (0,5M)

---

Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung der hergestellten cDNA.

3. Synthese der Biotin-markierten cRNA (BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kit)

- 1µg cDNA
- 1µl Aqua dest.
- 2µl 10x HY Reaction Buffer
- 2µl 10x Biotin-Labeled Ribonucleotides
- 2µl 10x DTT
- 2µl 10x RNase Inhibitor Mix
- 1µl 20x T7 RNA Polymerase

→ Inkubation für 5h bei 37°C, halbstündig kurz mischen

Die markierte cRNA wurde mit dem innuPREP RNA Mini Kit (siehe 2.2.1.) nochmals aufgereinigt. In Vorbereitung der Hybridisierung wurden die cRNA fragmentiert und die Hybridisierungslösungen hergestellt. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte für 16h in einer speziellen Apparatur (Fluidics Station). Nach mehreren Waschschriften erfolgte die Färbung mit einem Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat und das abschließende Scannen des Arrays mit einem speziellen Mikroarray-Chip-Lesegerät (Gene Chip Instrument System). Diese Experimente wurden von Dr. Larissa Pusch und dem IZKF in Leipzig unterstützt.

### 2.3.3. Auswertung des Microarrays

Die Ergebnisse wurden quantilnormalisiert und in MS EXCEL<sup>TM</sup> transferriert. Die Datensätze wurden hinsichtlich ihrer Validität beurteilt und nur Daten, die in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt werden konnten, wurden in die weitere Analyse eingeschlossen. Anschließend erfolgte die Normalisierung auf die Negativkontrollen mittels Quotientenbildung. Die Daten der BMP-2 inkubierten Zellen (MCF-7/BMP-2 inc. 4h) wurden mit den serumfrei kultivierten Zellen (MCF-7/sf) abgeglichen und die BMP-2 überexprimierenden Zellen (MCF-7/BMP-2) mit der Kontrollzelllinie MCF-7/3.1 normalisiert. Die so erhaltenen Quotienten geben Auskunft über die Herunter- bzw. Hochregulation des jeweiligen Gens. Für weitere Betrachtungen wurden nur zweifache Veränderungen berücksichtigt. Dabei steht ein Quotient kleiner 0,5 für eine mindestens zweifache Herunterregulation des Gens im Vergleich zur Kontrolle und ein Quotient größer 2,0 für mindestens eine Verdopplung im Expressionsniveau. Die so erhaltenen Sätze veränderter Gene in den beiden Versuchsgruppen wurden hinsichtlich ihrer Beteiligung an biologischen Prozessen analysiert. Dazu wurde das auf GeneOntology basierende Webtool FatiGo+ verwendet, welches Gruppen von Genen hinsichtlich ihrer Beteiligung an biologischen Prozessen einordnet. Genaue Erläuterungen zu diesem System und den verwendeten statistischen Mitteln werden zum besseren Verständnis im Ergebnisteil vorangestellt. Ausgewählte Gene wurden mit realtime-PCR untersucht.

## 2.4. Das Tet-System

Das Tetracyclin-kontrollierte Genregulationssystem (Tet-System) bietet die Möglichkeit einer induzierbaren und somit kontrollierbaren Genexpression. Es wurde erstmals von Gossen und Bujard (1992) beschrieben und basiert auf den Kontrollelementen des Tetracyclin-Resistenzoperons des Transposons *Tn10* aus *E.coli*. Das Tet Repressorprotein (TetR) blockt die Transkription des *Tn10* Transposons durch die Bindung an die Tet-Operatorsequenz (tetO) in der Abwesenheit von Tetracyclin. TetR reguliert durch die Bindung an tetO seine eigene und die Transkription von *tetA*, einem membranintegralen Protonen-Antiporter für metallkomplexiertes Tetracyclin, der durch den Export des Antibiotikums aus der Zelle die Resistenz vermittelt (Hillen & Berens, 1994).

Das Tet-Repressorprotein und die Tet-Operatorsequenz bilden die Grundlage der Regulation und Induktion für den Gebrauch im experimentellen Säugersystem. Das regulatorische Protein des Tet-Systems basiert auf dem TetR-Protein. Im Tet-Off System wurden die Aminosäuren 1-207 des TetR und 127 C-terminale Aminosäuren der Aktivierungsdomäne des Herpes Simplex Virus VP16 fusioniert. Die VP16-Domäne konvertiert TetR von einem transkriptionellen Repressor zu einem transkriptionellen Aktivator und wird als Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator (tTA) bezeichnet. Das Tet-On System ähnelt dem Tet-Off System, aber das regulatorische Protein basiert auf einem „reversen“ Tet-Repressor (rtTA) und wurde durch einen Austausch von 4 Aminosäuren in TetR erzeugt. Das entstandene Protein wird als reverser transkriptioneller Transaktivator (rtTA) bezeichnet.

Das experimentelle Tet-System setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: einem regulatorischen und einem so genannten Responseplasmid. In der vorliegenden Arbeit kam das Tet-On System zum Einsatz bei dem die Aktivierung der Genexpression durch Zugabe von Tetracyclin erreicht wird. Bei diesem System wird ein rtTA auf dem regulatorische Plasmid pTet-On kodiert. Das Responseplasmid enthält das Gen von Interesse unter der Kontrolle eines Tetracyclin-Response Elements (TRE), welches sich aus sieben direkten Wiederholungen einer 42 bp Sequenz des Tet-Operators gefolgt von einem minimalen CMV-Promotor zusammensetzt. Durch Zugabe von Tetracyclin bindet rtTA an das TRE und aktiviert die Transkription des nachgeschalteten Gens.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine bereits stabil mit dem pTet-On Vektor transfizierte MCF-7 Zelllinie verwendet (MCF-7 Tet-On).

### **2.4.1. Herstellung des Responseplasmids**

Im ersten Schritt wurde BMP-2 in den Responsevektor eingebracht. Das Volllänge-BMP-2 lag inkloniert im Vektor pcDNA 3.1 vor.

#### **2.4.1.1. Ermittlung der Schnittstellen für die Umklonierung**

Als Responsevektor wurde pTRE2hyg ausgewählt, der alle notwendigen Elemente für eine Induktion mit dem Tet-System sowie eine Hygromycin-Resistenz für die Etablierung von stabilen Klonen trägt. Für die Umklonierung machte man sich die Eigenschaft von Restriktionsenzymen, Endonukleasen bakteriellen Ursprungs, zunutze, sequenzspezifische Schnittstellen zu erzeugen. Anhand der angegebenen Restriktionsenzym-Schnittstellen in der Multiple Cloning Site (MCS) des pTRE2hyg Vektors wurden korrespondierende Schnittstellen im pcDNA 3.1 Vektor mit Hilfe des Programms „webcutter gesucht, um das BMP-2 vollständig herauszuschneiden. Die Restriktionsendonuklease EcoRV erwies sich als geeignet für die Umklonierung, wobei glatte Schnittenden (blunt ends) entstehen.

#### **2.4.1.2. Restriktionsverdau und Gelextraktion**

Die Vektoren pTRE2hyg und pcDNA 3.1 wurden mit dem Restriktionsenzym EcoRV verdaut. Dabei wird pTRE2hyg linearisiert (5325 bp) und aus pcDNA 3.1 wird das BMP-2 herausgeschnitten (1272 bp). Die Reaktion erfolgte bei 37°C für 2h. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 10µl Plasmid-DNA
- 3µl EcoRV
- 3µl Reaktionspuffer
- 14µl Wasser

Der Restriktionsverdau wurde mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.5) analysiert und der linearisierte pTRE2hyg Vektor (5325 bp) und der BMP-2 Genabschnitt (1272 bp) wurden mit einem Skalpell exakt aus dem Gel geschnitten. Anschließend erfolgte die Gewinnung der DNA mittels des Gelextraktionskits QIAEX<sup>®</sup> II. Diese Methode beruht auf der Fähigkeit von Nukleinsäuren in der Anwesenheit von chaotropen Salzen an Silicamaterial zu binden. Dazu wurden die Gelstücke mit 3 Volumen QX1 und 10µl QIAEX II versetzt und für 10 min schüttelnd bei 50°C inkubiert. Es folgte eine 30sekündige Zentrifugation, und der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Das Pellet aus Silicabeads mit gebundener DNA wurde mit 500µl QX1 resuspendiert und nochmals für 30 Sekunden zentrifugiert. Es folgte ein zweimaliges

Waschen mit PE Puffer, und nach abschließender Zentrifugation und vollständigem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet für ca. 10 min luftgetrocknet. Die DNA wurde durch Zugabe von 20µl Aqua dest. von den Silicabeads gelöst. Die Beads wurden abzentrifugiert, und der Überstand enthielt die gelöste DNA. Dieser wurde in ein neues Gefäß überführt und die Konzentration am NanoDrop bestimmt.

#### 2.4.1.3. Ligation

Der isolierte und linearisierte pTRE2hyg Vektor und das BMP-2 wurden nun mittels einer T4 DNA-Ligase zusammengefügt. Das Enzym katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den freiliegenden 3'- und 5'-Enden der DNA-Fragmente, und es entsteht ein ringförmiges Plasmid. Für die Reaktion ist es notwendig, den Vektor und das Insert (BMP-2) in definierten molaren Verhältnissen einzusetzen. Es wurde mit einem molaren Verhältnis Insert:Vektor von 3:1 begonnen, wobei es sich hier um die Stoffmenge (mol) der Vektor- bzw. Insertenden handelt. Diese wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Menge DNA } [\mu\text{g}] / \text{Größe der DNA } [\text{kb}] \times 3,04 = \text{Enden } [\text{pmol}]$$

Auf Grundlage dieser Formel wurden die einzusetzenden Volumina ermittelt. Das Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

- x µl Vektor
- x µl Insert
- 1 µl T4 DNA-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe)
- 4 µl 5fach Ligationspuffer (Invitrogen, Karlsruhe)
- mit Aqua dest. auf 20 µl aufgefüllt

Es wurde eine Kontrolle ohne Insert mitgeführt, und der Ligationsansatz für 24 h bei 14°C inkubiert. Die hergestellten Plasmide wurden anschließend in E.coli transformiert und analysiert. Das hergestellte Konstrukt wird im Folgenden als pTRE2hyg + BMP-2 bezeichnet.

#### 2.4.1.4. Transformation

Das Einschleusen von Fremd-DNA in E.coli und dessen stabile Weitergabe wird als Transformation bezeichnet. Da das Bakterium keine natürliche Fähigkeit (Kompetenz) zur Aufnahme von DNA besitzt, wurde dieser Zustand künstlich durch Behandlung mit Calciumchlorid hergestellt werden. Zu diesen kompetenten E.coli-Zellen wurden 2 µl des Ligationsansatzes zugesetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dieser Schritt dient der Adhäsion der

DNA an die Zellmembran. Mit dem folgenden Hitzeschock (42°C für 30 sec) wurde die Zellmembran permeabilisiert und die DNA in die Zelle aufgenommen. Anschließend erfolgte ein Regenerationsschritt durch Inkubation der Zellen mit 250 µl SOC-Medium für 30 min bei 37°C im Schüttler. 50 µl der E.coli-Suspension wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien ausgewählt und in eine 5 ml Schüttelkultur (5 µl LB-Medium + 5 µl Ampicillin [100µg/ml]) überführt und für 16 h bei 37°C im Schüttler bei 200 U/min kultiviert. Aus den gewonnenen Suspensionskulturen wurden anschließend die Plasmide isoliert.

#### **2.4.1.5. Plasmidisolierung**

Das Prinzip der Plasmidisolierung beruht auf der alkalischen Lyse durch einen NaOH/SDS-haltigen Puffer in Gegenwart von RNase A. Das SDS löst die Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellmembran und führt zur Freisetzung des Zellinhaltes. NaOH bewirkt die Denaturierung der chromosomalen und Plasmid-DNA sowie der Proteine. Eine anschließende Neutralisierung mit einem Hochsalzpuffer führt zur Präzipitation der denaturierten Proteine, der chromosomalen DNA, zellulärer Bruchstücke und des SDS. Die wesentlich kleinere Plasmid-DNA bleibt in Lösung und befindet sich nach einem Zentrifugationsschritt im Überstand. Anschließend kann die Plasmid-DNA mittels Isopropanolfällung isoliert und aufgereinigt werden.

Es wurden 2 ml der Übernachtskultur für 10 min bei 3500 U/min sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Isolierung erfolgte mit dem QIAGEN Plasmid-Aufreinigungskit. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl Puffer P1 resuspendiert, anschließend 200 µl Puffer P2 zugegeben, geschwenkt und für 1 min inkubiert (Lyse). Zur Neutralisation wurden 200 µl Puffer P3 zupipettiert, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen. Das Gemisch wurde für 10 min bei 13000 U/min abzentrifugiert und der Überstand mit der gelösten Plasmid-DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die Fällung wurde die Plasmidlösung mit 600 µl Isopropanol versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Die DNA wurde durch eine Zentrifugation bei 10000 U/min für 10 min sedimentiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Alkohol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl Aqua dest. resuspendiert.

#### **2.4.1.6. Differentieller Restriktionsverdau**

Die isolierten Plasmide wurden auf den richtigen Einbau des Inserts untersucht. Zum einen erfolgte ein Verdau mit EcoRV um das einklonierte BMP-2 nachzuweisen. Des Weiteren

wurde ein differentiellen Restriktionsverdau durchgeführt, da es sich um eine Klonierung mit glatten („blunt“) Enden handelt, und das Insert sowohl in der richtigen Orientierung (sense) als auch in der gegensätzlichen Richtung (antisense) in den Vektor eingebaut werden kann. Dazu wurde mit dem Programm „webcutter“ nach Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen gesucht, die je nach der Orientierung des Inserts verschiedene (differentielle) Fragmente ergeben. Es wurde BamHI ausgewählt, das bei einem Einbau des BMP-2 in sense-Richtung Fragmente von 1319 und 5278 bp ergibt, während bei der antisense-Orientierung Bruchstücke mit 6538 und 69 bp entstehen. Das Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

- 1 µl Plasmid
  - 1 µl Restriktionsendonuklease
  - 1 µl Restriktionsendonukleasepuffer
  - 7 µl Aqua dest.
- Inkubation für 2h bei 37°C

Die Analyse des Verdau erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.5.).

#### **2.4.1.7. Sequenzierung**

Die Sequenzierung erfolgte mit der Didesoxymethode (Kettenabbruchmethode) nach Sanger (Sanger et al., 1977). Die zu sequenzierende DNA wird als Matrize für eine PCR-Reaktion (siehe 2.2.4.) eingesetzt, wobei der Reaktion zusätzlich ein Gemisch Didesoxyribonukleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) zugefügt wird. Diese besitzen keine 3'-Hydroxygruppe, die für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids essentiell ist, und somit kommt es zum Abbruch der Strangsynthese nach Einbau. In der Folge entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. In der vorliegenden Arbeit kamen fluoreszenzmarkierte ddNTPs zum Einsatz, wobei jedes der vier Nukleotide mit einem anderen Farbstoff gekoppelt wurde. Das Gemisch verschieden langer DNA-Fragmente kann anschließend in einer Kapillargelelektrophorese analysiert werden. Diese Methode beruht auf dem bereits in Kapitel 2.2.5. beschriebenen Wanderungsverhalten im elektrischen Feld und findet im Gel in dünnen Kapillarrohren statt. Somit erfolgt eine Trennung nach der Größe der Fragmente, und zum anderen wird durch Laseranregung die Fluoreszenz der endständigen Nukleotide detektiert. Das Chromatogramm (Abfolge der detektierten Farbsignale) gibt direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder.

Für die Sequenzierung wurden Primer ausgewählt, die die mature BMP-2 Region flankieren (siehe Anhang). Die PCR-Reaktion (Reamplifikation) für die Sequenzierung wurde in sense

und antisense Richtung und unter der Verwendung des DTCS (Dye terminator cycle sequencing) Kits durchgeführt.

- 4 µl DNA (1:10 Vorverdünnung)
- 6 µl Primer/DTCS-Gemisch
  - 3 µl Sequ\_2\_A (sense Primer) + 6 µl DTCS
  - oder
  - 3 µl Sequ\_2\_B (antisense Primer) + 6 µl DTCS
- 10 µl Aqua dest.

Das Reaktionsgemisch wurde für 5 min auf 96°C erhitzt und anschließend die PCR-Reaktion im Thermocycler Trio Thermoblock gestartet. Die Isolierung und Aufreinigung der DNA erfolgte mittels einer Ethanol-fällung. Dazu wurde die fertige PCR-Reaktion mit 5 µl Stop-Lösung (2 µl Natriumacetat, 2 µl EDTA und 1 µl Glycerol) und 60 µl 90%igem, eiskaltem Ethanol versetzt und für 30 min bei 15000 U/min und 4°C zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol wurde das Pellet vakuumgetrocknet (SpeedVac) und in 30 µl SLS (Sample Loading Solution) resuspendiert. Die Proben wurden in den Sequenzierer CEQ 8000 überführt und mit Mineralöl überschichtet. Mittels der zugehörigen Software wurden die Sequenzierungsparameter eingestellt und die Analyse gestartet. Die erhaltene Sequenz wurde mit der Originalsequenz von BMP-2 abgeglichen.

## **2.4.2. Optimierung des Tet-Systems**

Für die Etablierung und Verwendung des Tet-Systems waren einige Voruntersuchungen notwendig, die im Folgenden dargestellt werden.

### **2.4.2.1. Bestimmung der zytotoxischen Konzentration von Hygromycin**

Für die Etablierung von stabilen Klonen machte man sich Antibiotika-Resistenzen zu nutze. Um das Response Plasmid stabil in die Zellen einzubringen, verwendete man die Hygromycinresistenz des pTRE2hyg Vektors. Dazu wurde die ideale Hygromycin-Konzentration für die Selektion von stabilen Klonen bestimmt. Es wurden  $4 \times 10^4$  Zellen pro well in einer 6-well Platte ausgesät und mit verschiedenen Hygromycin-Konzentrationen inkubiert (50, 100, 200, 400 und 800 µg/ml). Zweitägig erfolgte eine mikroskopische Begutachtung, und viertägig wurde das Medium gewechselt. Die ideale Konzentration von Hygromycin für die Selektion definiert sich als die Hygromycin-Konzentration, die einen massiven Zelltod innerhalb von fünf Tagen induziert und nach zwei Wochen alle Zellen abtötet. Für weitere Experimente wurden 100 µg/ml Hygromycin eingesetzt.



### 2.4.2.2. Ermittlung der optimalen Doxycyclin-Konzentration

Für die Induktion der Genexpression im Tet-On System wurde das Tetracyclin-Derivat Doxycyclin verwendet, welches eine längere Halbwertszeit (24h) besitzt. Die Bestimmung einer Dosis-Wirkungs-Kurve erfolgte mit der Kontrollzelllinie U2-OS Luc Tet-On, einer doppelt stabil transfizierten Osteosarkomzelllinie mit induzierbarer Luciferaseaktivität. Es wurden  $5 \times 10^4$  Zellen pro well im 6-well Format ausgesät und verschiedene Konzentrationen Doxycyclin (0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 600 ng/ml, 800 ng/ml, 1  $\mu$ g/ml) zugegeben. Nach 48 h wurde die Inkubation beendet und das Ansprechen auf die Induktion mit einem Luciferase Reporter Assay bestimmt.

### 2.4.2.3. Luciferase Reporter Assay

Die aus *Photinus pyralis* isolierte Luciferase katalysiert die oxidative Carboxylierung von Luciferin und ist eine Biolumineszenzreaktion mit der höchsten bekannten Effektivität. Aufgrund dieser Eigenschaft wird die Luciferase eingesetzt, um die Aktivität von Promotoren und somit die Regulation der Genexpression zu charakterisieren. In der Kontrollzelllinie U2-OS Luc Tet-On wurde das Luciferase-Gen downstream des Tetracyclin Response Elements (TRE) inkloniert und die Expression steht somit unter der Kontrolle des Tet-Systems. Durch die Zugabe von Doxycyclin wird die Expression der Luciferase induziert und das daraus resultierende Protein wird aufgrund seiner enzymatischen Aktivität mittels eines Luciferase Reporter Assay Kits nachgewiesen. Die mit Doxycyclin induzierten Zellen wurden zweimal mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen und mit 200  $\mu$ l 1x Lysepuffer für 15-20 min bei RT inkubiert. Das Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und Zelltrümmer bei 14000 U/min für 1 min abzentrifugiert. 20  $\mu$ l des Zelllysats wurden in eine 96-well Platte pipettiert und jeweils 100  $\mu$ l Substrat A und B, die ATP,  $\text{Mg}^{2+}$ , Coenzym-A (Co-A) und das Substrat Luciferin enthalten, wurden zugesetzt. Die Umsetzung von Luciferin durch die im Lysat enthaltene Luciferase wurde in einem Luminometer gemessen. Die Luciferase-Aktivität wird in relativen Lichteinheiten (relative light units, RLU) angegeben.

### 2.4.3. Transfektion des Response Vektors in MCF-7 Tet-On

Die Transfektion – das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen – wurde mittels Nucleofektion durchgeführt. Bei dieser, von der Firma amaxa entwickelten Methode, handelt es sich um eine spezielle Form der Elektroporation. Im Gegensatz zur konventionellen Elektroporation, bei der nur ein Spannungsimpuls gegeben wird, werden bei der

Nucleofektion eine Reihe komplexer Spannungsmuster erzeugt. Durch diese Technik wird die DNA direkt in den Zellkern transloziert.

#### **2.4.3.1. Transiente Transfektion von MCF-7 Tet-On**

Im ersten Schritt wurde die Induzierbarkeit der MCF-7 Tet-On mit einer transienten Transfektion, dem zeitweiligen Einbringen von DNA, getestet. Dazu erfolgte eine transiente Transfektion mit dem Kontrollvektor pTRE2hyg Luc, der Luciferase kodiert. Die MCF-7 Tet-On Zellen wurden 4 Tage vor der Transfektion passagiert. Am Versuchstag erfolgte die Zellernte, und  $2 \times 10^6$  Zellen wurden pelletiert. Nach der Resuspension des Pellets in 100  $\mu$ l Lösung V (Nucleofektionskit V) wurden 2  $\mu$ g der zu transfizierenden DNA zugegeben und das Gemisch in eine Transfektionsküvette überführt. Die Küvette wurde in den amaxa Nucleofektor gestellt und das Programm E-14 für Kurzzeitexpression und hohe Zellviabilität gestartet. Nach der Zugabe von 500  $\mu$ l DMEM + 10% FCS wurde die Zellsuspension mit der mitgelieferten Spezialpipette in eine 6-well Platte, in der 1 ml Medium vorgelegt wurde, transferiert. Die Zellen wurden für 24h kultiviert. Anschließend erfolgten ein Mediumwechsel und die Induktion mit 600 ng/ml Doxycyclin. 24 h, 48 h, 72 h und 168 h nach der Induktion wurden die Zellen für einen Luciferase Reporter Assay gewonnen und am Ende des Experiments gemeinsam vermessen. Nicht induzierte Kontrollen wurden über den gesamten Zeitraum mitgeführt.

In analoger Weise erfolgte die transiente Transfektion von MCF-7 Tet-On und U2-OS Luc Tet-On mit pTRE2hyg + BMP-2, um die Induzierbarkeit des hergestellten Vektorkonstrukts zu testen. Von den Proben wurde RNA isoliert und eine rt-PCR hinsichtlich beta-Aktin (Housekeeping Gen) und BMP-2 durchgeführt.

#### **2.4.3.2. Etablierung stabil transfizierter Klone**

Für eine Induktion der BMP-2 Expression über einen längeren Zeitraum war es notwendig, stabil transfizierte Klone zu etablieren. Das Vorgehen bei der stabilen Transfektion entspricht dem unter 2.4.3.1 beschriebenen. Jedoch fand das Programm P-20 für hohe Transfektionseffizienz und Langzeitexpression Verwendung. Die Zellen wurden für 1 Woche unter ständiger mikroskopischer Kontrolle und regelmäßigem Mediumwechsel kultiviert. Anschließend erfolgte die Selektion stabiler Klone mit 100  $\mu$ g/ml Hygromycin für 2 Wochen. Nachfolgend wurden die Zellen vereinzelt, um definierte homogene Zellklone zu gewinnen. Dazu erfolgte die Aussaat von 1,5 Zellen pro well im 96-well Format in 100  $\mu$ l Medium.

Nach drei Woche wurden die 96-well Platten nach großen, gesunden Klonen durchsucht. Diese wurden anschließend sukzessive von 96- in 48- in 24- in 12- in 6-well Platten und schließlich in kleine Zellkulturflaschen, in Abhängigkeit des Wachstums, umgesetzt. Die Kultivierung erfolgte über den gesamten Zeitraum unter 100 µg/ml Hygromycin. Die so gewonnenen und stabil mit pTRE2hyg + BMP-2 transfizierten Klone wurden zum einen kryokonserviert und zum anderen für die folgenden Analysen mit Doxycyclin induziert.

#### **2.4.4. Analyse der stabil transfizierten Klone**

Die stabil mit BMP-2 transfizierten Klone wurden mit molekularbiologischen Methoden analysiert. Dazu wurden induzierte und nicht induzierte Proben der verschiedenen pTRE2hyg + BMP-2 Klone generiert. Zuerst wurde der Nachweis der Expression verschiedener Gene durchgeführt. Die korrekte Funktion des pTet-On Plasmids wurde anhand der Expression des reversen transkriptionellen Transaktivators (rtTA) und der Neomycin-Resistenz überprüft. Der pTRE2hyg + BMP-2 Vektor wurde mittels der Hygromycin-Resistenz, und die Induktion anhand der BMP-2 Expression nachgewiesen. Als Kontrolle diente beta-Aktin (Housekeeping Gen), welches nicht durch das Tet-System reguliert und dem eine ubiquitäre, stabile Expression zugeschrieben wird. Aus den generierten Proben wurde RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und eine rt-PCR bezüglich der besprochenen Gene durchgeführt (siehe 2.2.). Die entstandenen Produkte wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Klone, bei denen eine Induktion der BMP-2 Expression im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar war, wurden quantitativ mittels realtime-PCR untersucht.

## **2.5. Immunhistochemie**

### **2.5.1. Etablierung der BMP-2 Immunhistochemie**

Die OP-Resektate der Mammakarzinome wurden freundlicherweise vom Institut für Pathologie Dr. med. habil. A. Schmidt in Bad Berka/Thüringen zur Verfügung gestellt. Mit ausgewählten Tumorproben von Mammakarzinom-Patienten wurde der BMP-2 Antikörper (N-14, sc-6895, Santa-Cruz) getestet und die immunhistochemische Methode etabliert.

#### **2.5.1.1. Die Avidin-Biotin-Komplex Methode**

Der immunhistochemische Nachweis wurde unter Verwendung der Avidin-Biotin-Komplex Methode durchgeführt. Dabei macht man sich die starke Affinität von Avidin zu Biotin (Hsu

et al, 1981) zunutze. Hier bindet ein präformierter Komplex aus biotinylierten Peroxidasen und Avidin die freien Bindungsstellen am biotinylierten Sekundärantikörper. Dieser bindet an den Primärantikörper, der das Antigen erkennt. Die Visualisierung dieser Antigenerkennung erfolgt mit der Peroxidase. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung des Chromogens 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB), wobei ein braunes, in Alkohol und Xylol unlösliches, Reaktionsprodukt entsteht.

### **2.5.1.2. Durchführung der Immunhistochemie**

#### *Anfertigung der Paraffinschnitte*

Von den formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Tumorproben wurden jeweils mehrere Leerschnitte mit einer Stärke von 4 µm an einem Schlittenmikrotom angefertigt und auf adhäsive Objektträger (Super-Frost Plus) aufgezogen. Die Paraffinschnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

#### *Entparaffinieren und Rehydratisieren der Gewebeschnitte*

Die Schnitte wurden auf einer 70°C warmen Heizplatte für einige Sekunden „angebacken“ und wieder getrocknet. Anschließend erfolgte die Entparaffinierung durch Xylol (1 x 10 min, 1 x 5 min) und die Rehydratisierung in einer absteigenden Alkoholreihe: 2 x 5 min in 99% Ethanol und 2 x 5 min 70% Ethanol. Anschließend wurden die Schnitte in PBS gespült.

#### *Blocken der endogenen Peroxidase*

Um die Hintergrundaktivität zu minimieren bzw. falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurde die endogene Peroxidaseaktivität unterdrückt. Die Peroxidase nutzt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Oxidationsmittel, um von einem Substrat (z.B. Glutathion, aromatische Amine) Wasserstoff darauf zu übertragen, wobei zwei Wassermoleküle entstehen. Die Gewebeproben wurden 30 min in 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen.

#### *Renaturierung/Herstellung der Antigenität*

Die Fixierung der Tumorproben mit Formalin führt zu einer Vernetzung von Proteinen, und lösliche Antigene werden teilweise immobilisiert. Die Proteinvernetzung führt darüber hinaus zur Zerstörung und Maskierung antigener Strukturen. Diese Maskierung kann durch die Denaturierung bei einer Mikrowellenbehandlung mit anschließender Rehydratisierung

rückgängig gemacht werden, sodass die Antigenerkennung durch den Antikörper verbessert wird. Die Schnitte wurden in Citratpuffer (0,01 M, pH 6,0) für vier Minuten bei 720 W und weitere 12 min bei 400 W erhitzt. Die Abkühlung erfolgte langsam bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben in PBS gewaschen.

#### *Blocken mit Normalserum*

Für alle weiteren Schritte wurden die Objektträger in Cover-Plates gesetzt. Der dabei entstehende Kapillarspalt ermöglicht eine Durchführung unter geringem Verbrauch von Reagenzien. Darüber hinaus ließen sich Waschschrte intensiv und effektiv durchführen, und ein Eintrocknen der Schnitte konnte vermieden werden. Um unspezifische Antigene auf der Schnittoberfläche (z.B. Fc-Rezeptoren) zu maskieren, erfolgte eine Inkubation mit Normalserum, das aus der gleichen Spezies stammt wie der Sekundärantikörper. Die Proben wurden für 15 min mit Pferdenormalserum inkubiert.

#### *Antikörperinkubation*

Für die Detektion von BMP-2 wurde der polyklonale Antikörper N-14 aus Ziege (Santa Cruz, sc-6895) verwendet, der ein Peptid nahe des N-Terminus erkennt. Dieser wurde 1:100 in Diluent-Puffer (siehe „Material“) verdünnt und über Nacht (4°C) auf die Schnitte gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper (Anti-Ziege-IgG) für 45 min bei RT. Ein weiterer Waschvorgang schloss sich an.

#### *Nachweis mit der Avidin-Biotin-Komplex Methode*

Für die Herstellung des Avidin-Biotin-Komplexes wurde der Vectastain Elite<sup>®</sup> ABC-Kit verwendet. 30 min vor der Verwendung wurden je 100 µl der Lösungen A, B und C in vorgelegtes PBS überführt und auf 5 ml mit PBS aufgefüllt. Die Schnitte wurden mit 100 µl dieser Lösung für 45 min bei RT inkubiert. Die Objektträger wurden anschließend aus den Cover-Plates genommen und nochmals mit PBS gewaschen. Das Substrat-Chromogen Reagenz wurde frisch hergestellt und die Schnitte damit überschichtet. Beim Einsetzen der ersten mikroskopisch sichtbaren Immunreaktivität wurde die Reaktion durch Spülen mit destilliertem Wasser abgestoppt.

### *Gegenfärbung und Entwässerung*

Die Kerngegenfärbung erfolgte mit Hämalan. Dazu wurden die Schnitte fünf Sekunden in der Farblösung geschwenkt und mit destilliertem Wasser gespült. Zuletzt erfolgte das Bläuen in Leitungswasser. Zur Entwässerung wurde eine aufsteigende Alkoholreihe (2 x 5 min in 70% Ethanol und 2 x 5 min in 99% Ethanol) und schließlich Xylol (2 x 10 min) genutzt. Die Objektträger wurden mit Kanadabalsam eingedeckelt und bei RT getrocknet.

### *Auswertung*

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch durch zwei unabhängige Pathologen. Die Immunreaktivität wurde mittels des Remmele Scores (RS) beurteilt, wobei sowohl der Prozentsatz der gefärbten Zellen, wie auch die Färbintensität berücksichtigt wurden (Remmele und Stegner, 1987). Der Remmele Score berechnet sich wie folgt:

$$\text{Farbintensität} \times \text{Prozent positive Zellen} = \text{Remmele-Score}$$

Farbintensität	Prozent positive Zellen	Remmele-Score (IRS-Immune Reactive Score)
0 = keine	0 = keine	Skala von 1-12
1 = schwach	1 = <10 %	
2 = mäßig	2 = 10-50 %	
3 = stark	3 = 51-80 %	
	4 = >80 %	

### **2.5.2. Multi Tissue Array**

Für das Screening der BMP-2 Expression in verschiedenen Gewebeproben wurden Multi Tissue Arrays (MTAs) verwendet. Diese Methode ermöglicht die zeitgleiche Untersuchung von Hunderten von Proben mit einem typischen Durchmesser von 0,6 mm (Kallioniemi et al., 2001). Es wurde der MTA „breast prognosis“ verwendet, auf dem über 2000 Proben von Mammakarzinomen verschiedener histopathologischer Diagnose vertreten sind. Dieser Array wurde uns freundlicherweise von G. Sauter (Hamburg) und A. Hartmann (Erlangen) zur Verfügung gestellt. Der immunhistochemische Nachweis von BMP-2 konnte in Analogie zu der vorher beschriebenen Prozedur durchgeführt werden. Des Weiteren wurde ein Multitumor-Array eingesetzt, der über 160 verschiedene Tumorentitäten und Normalgewebe beinhaltet. Dieser wurde ebenfalls hinsichtlich der BMP-2 Expression untersucht.

## 2.6. Proteinanalytik mittels Western blot

Zur Analyse veränderter Gene auf Proteinebene wurden die Proteine isoliert und in einer diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Anschließend wurde ein Westernblot (Towbin et al., 1979) durchgeführt, dazu wurden die Proteine für die Immunodetektion durch Elektrotransfer vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran übertragen („geblottet“). Der Proteinachweis erfolgte mit spezifischen Antikörpern (siehe „Material“).

### 2.6.1. Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung

Je nach Fragestellung wurden Zellkulturproben generiert und abschließend in 500 µl Proteinlysepuffer (siehe Anhang) aufgenommen. Die Lysate wurden über Nacht bei -80°C gelagert und nach dem Auftauen für 15 min bei 4°C und 15000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Konzentrationsbestimmung der Proteine verwendet. Diese erfolgte photometrisch und basiert auf der Wechselwirkung von Proteinen mit dem Säurefarbstoff Coomassie-Brilliantblau (Bradford 1976). Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes verschiebt sich in Anwesenheit von Proteinen im sauren Milieu von 465 nm zu 595 nm, vermutlich aufgrund der Stabilisierung der unprotonierten, anionischen Sulfatform des Coomasie-Brilliantblau. Für die Messung wurden 2 µl des Zellysats mit 498 µl Aqua dest. und 500 µl Bradford-Reagenz versetzt und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und die Konzentration anhand einer Eichkurve, die für Rinderserumalbumin bekannter Konzentrationen erstellt wurde, bestimmt.

### 2.6.2. Auftrennung des Proteingemisches mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine weisen aufgrund ihrer unterschiedlich geladenen Aminosäuren verschiedene Gesamtladungen und Strukturen auf. Für eine elektrophoretische Auftrennung sind ein konstantes Ladungs-Masseverhältnis sowie eine einheitliche Struktur notwendig. Das wird durch die Zugabe des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) erreicht, welches SDS-Proteinkomplexe mit konstant negativer Ladung pro Masseinheit bildet. Eine Inkubation des Gemisches bei 95°C führt zur Spaltung von hydrophoben Verbindungen und somit zur Auflösung von Tertiär- und Sekundärstrukturen. Durch Zugabe des Reduktionsmittels beta-Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken gespalten. Im elektrischen Feld wandern die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe zur Anode.

Jeweils 50 µl der Proteinlösung wurden mit 15 µl Proteinladepuffer versetzt und für fünf Minuten bei 95°C inkubiert. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden 30 µl der Proben auf ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Größenstandard dienten 5-10 µl des farbigen Rainbow-Markers und 5-10 µl des Santa-Cruz Markers. Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer bei konstant 145V und 300 mA für 75 min.

### **2.6.3. Elektrotransfer und Immundetektion der Proteine**

Der Elektrotransfer wurde in einer „Semi-Dry“-Westernblot-Apparatur durchgeführt (Khyse-Anderson 1984). Dabei erfolgte die Übertragung der negativ geladenen Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran zwischen zwei Plattenelektroden. Das Gel, die Membran und Filterpapiere wurden in Transferpuffer inkubiert und anschließend in der Reihenfolge Filterpapier – Gel – Membran – Filterpapier aufeinander geschichtet. Der Elektrotransfer erfolgte bei 25V und konstant 0,09mA für 90 min.

Die für die Immundetektion unspezifischen Bindungsstellen wurden anschließend mit 5% (w/v) Rinderserumalbumin in PBS-T für 1h bei Raumtemperatur abgeblockt. Die Membran wurde dreimal für 10 min mit PBS-T gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert (siehe Material). Nach erneutem dreimaligem Waschen der Membran erfolgte die Inkubation für 1h bei RT mit einem Peroxidase gekoppelten Sekundäntikörper, der gegen die Spezies gerichtet ist, aus der der Primäntikörper gewonnen wurde. Um die unspezifische Hintergrundfärbung zu minimieren wurde nochmals dreimal mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurden 6 ml ECL-Lösung (Enhanced Chemolumineszenz) zu der Membran gegeben und die Detektion am LAS-3000 (Luminescent Image Analysis System) durchgeführt. Die Visualisierung der Antikörper-Antigen-Erkennung beruht auf der enzymatischen Aktivität der am Sekundäntikörper gekoppelten Peroxidase, die die Oxidation des Luminol (3-Amino-phthalhydrazid) zu 3-Aminophthalat katalysiert. Die bei dieser Reaktion entstehende Chemolumineszenz wurde detektiert.

Zum Zweck der Normalisierung wurde auf der gleichen Membran das Housekeeping Protein beta-Aktin nachgewiesen. Dazu erfolgte eine Rehybridisierung der Membran, um die gebundenen Antikörper wieder zu lösen. Es wurden 10 ml Rehybridisierungspuffer für 10-30 min bei 50°C zu der Membran gegeben. Nach gründlichem Waschen wurde erneut mit Rinderserumalbumin blockiert und die Prozedur, wie oben beschrieben, mit einem beta-Aktin Antikörper wiederholt.



## 3. Ergebnisse

### 3.1. Expressionsanalysen zur zeitabhängigen Wirkung von BMP-2

Zur Bestimmung der Effekte bei einer Kurzzeit- und Langzeitgabe von BMP-2 wurden globale Expressionsanalysen durchgeführt. Es wurden 14500 Gene mittels eines Oligonukleotid-Microarrays (Affymetrix, HG-U133A) untersucht, und die Kurzzeit- (bezeichnet als „Inkubation“) und die Langzeitwirkung (bezeichnet als „Überexpression“) von BMP-2 auf die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 verglichen (Abb. 3.1.). In der Gruppe „Inkubation“ wurden 206 Gene als differentiell exprimiert identifiziert; 67 Gene waren herunterreguliert (definiert als mind. zweifache Abnahme) und 139 Gene waren hochreguliert (definiert als mind. zweifacher Anstieg). 198 Gene in der Gruppe „Überexpression“ zeigten eine differentielle Expression im Vergleich zu den Kontrollen: 128 Gene waren herunterreguliert und 70 Gene hochreguliert. Ein Vergleich der beiden Gruppen zeigte eine Übereinstimmung in 1% (drei Gene) der veränderten Gene.

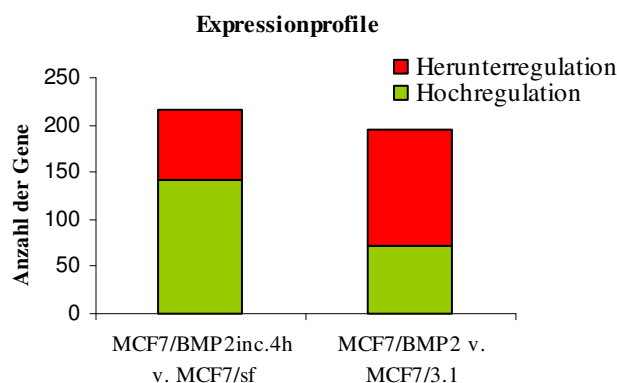


Abb.3.1. Darstellung der veränderten Gene in der jeweiligen Subgruppe unterteilt in hoch- (grün) und herunterregulierte (rot) Gene  
MCF7/BMP2inc.4h v. MCF7/sf = Inkubation von MCF7 mit BMP-2 für 4h normalisiert gegen eine serumfreie MCF7-Kontrolle  
MCF7/BMP2 v. MCF7/3.1 = BMP-2 überexprimierende MCF7 normalisiert gegen MCF7 mit Leervektor 3.1.

#### 3.1.1. Generelle funktionelle Analyse der differentiell exprimierten Gene

Für weitere Vergleiche wurden die Gruppen differentiell exprimierter Gene mittels Gene Ontology (GO) analysiert. Das Gene Ontology Consortium bietet die Möglichkeit einer funktionellen Klassifizierung von Genen hinsichtlich biologischer Prozesse, in die sie involviert sind, der zellulären Komponente, in der sie lokalisiert sind und der molekularen

Funktion (The Gene Ontology Consortium, 2000). Mit diesen drei strukturierten Bereichen (Ontologies) können Gene in einer speziesunabhängigen Art und Weise beschrieben werden. Die Gene werden in einen Stammbaum eingeordnet, der von generellen bis hin zu konkreten biologischen Prozessen, aufgeteilt auf neun Ebenen (Level), reicht. Je höher das Level, desto genauer ist die Klassifizierung und die Information über die Funktion eines bestimmten Gens. Für die Analyse wurde das Webtool FatiGo+ (Al-Shahrour et al., 2004) verwendet, welches die funktionelle Annotation, die Zuordnung der GO-Bezeichnungen zu dem jeweiligen Gen, für beide experimentelle Gruppen simultan durchführt.

In der Gruppe „Inkubation“ wurden 206 und in der Gruppe „Überexpression“ 198 Gene analysiert. Die differentiell exprimierten Gene wurden evaluiert, und jeweils 151 Gene konnten funktionell annotiert werden. Diese wurden anschließend in 1121 biologische Prozesse (Level 3-9) eingeordnet. Dabei zeigte sich eine Übereinstimmung in 501 (45%) biologischen Prozessen zwischen den beiden Gruppen. Die Gruppe „Inkubation“ zeigt 324 (29%) und die Gruppe „Überexpression“ 296 (26%) biologische Prozesse, die für die jeweilige Gruppe spezifisch sind.

Eine weitere Auswertung wurde mit statistischen Methoden durchgeführt. Mittels des Fisher's exact Tests wurden statistisch überrepräsentierte Prozesse im Vergleich zu der normalen Verteilung nach Gene Ontology für die Level 3-6 ermittelt. 298 (53%) biologische Prozesse waren entweder in einer oder in beiden Gruppen statistisch signifikant stärker vertreten. Für die weitere Betrachtung wurden alle biologischen Prozesse, die keine statistische Signifikanz und eine Häufigkeit kleiner 7% zeigten, ausgeschlossen. Des Weiteren wurden signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mittels Fisher's exact Test ermittelt. In der Gruppe „Inkubation“ zeigten sich dreimal mehr signifikant überrepräsentierte biologische Prozesse im Vergleich zur Gruppe „Überexpression“ (Abb. 3.2.).

Betrachtet man die Prozentzahl der Gene in den jeweiligen biologischen Prozessen in Level 3, so sind bei 12 Prozessen (75%) beide Gruppen überrepräsentiert. Bei katabolischen und makromolekularen metabolischen Prozessen ist nur die Gruppe „Inkubation“ im Vergleich zu Gene Ontology überrepräsentiert, während die „Überexpression“ von BMP-2 signifikant erhöht Stressantwort und Zelladhäsion beeinflusst.

Die funktionelle Interpretation der beteiligten biologischen Prozesse im Level 3 deutet auf eine hauptsächliche Beteiligung der Gruppe „Inkubation“ an Prozessen des Metabolismus hin. Primärer, zellulärer und makromolekularer Stoffwechsel zeigen einen signifikanten Unterschied zur normalen Verteilung laut Gene Ontology und auch zur Gruppe „Überexpression“.

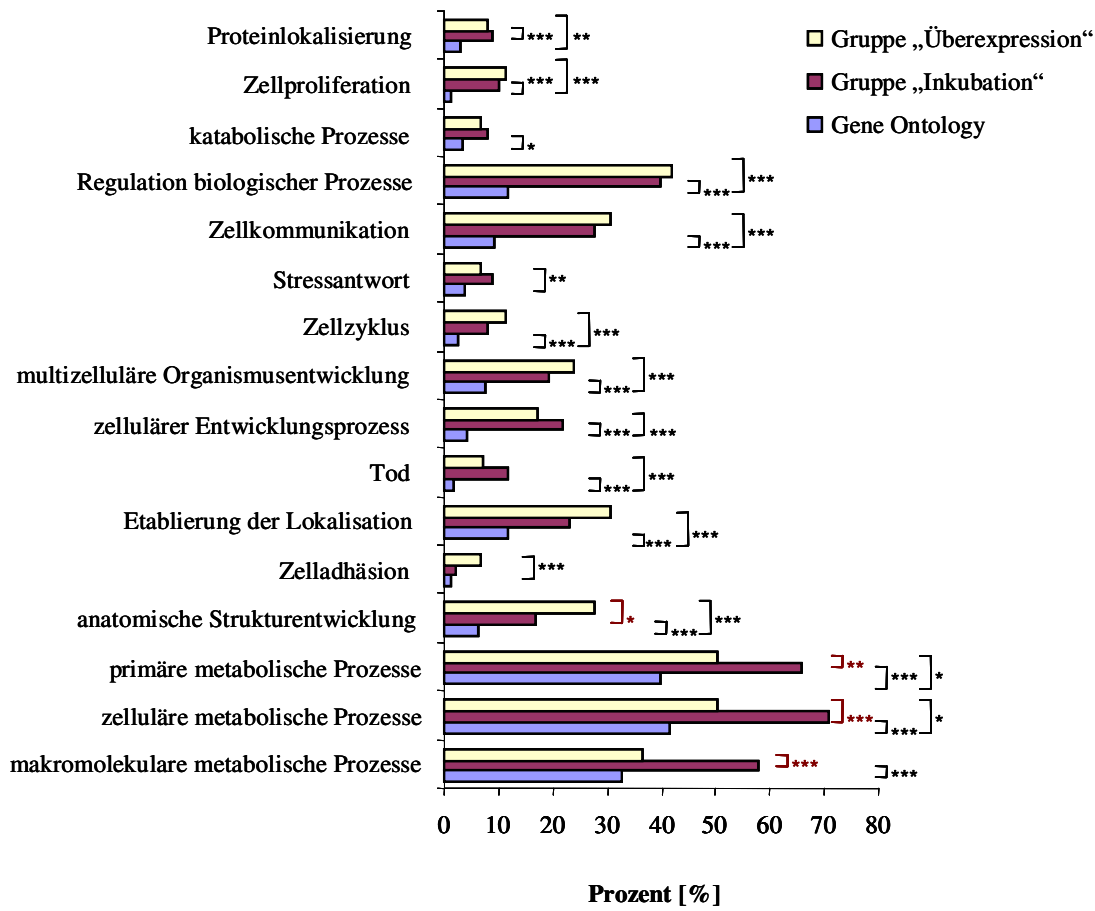


Abb. 3.2. Ergebnisse der funktionellen Analyse nach Gene Ontology (Level 3): Darstellung der Prozentzahl der veränderten Gene in den jeweiligen Prozessen für die beiden experimentellen Gruppen „Inkubation“ und „Überexpression“ im Vergleich mit der Verteilung annotierter Gene nach Gene Ontology und signifikante Unterschiede, \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ ; schwarze Balken: experimentelle Gruppen vs. GO, rote Balken: „Inkubation“ vs. „Überexpression“

Die Langzeitinkubation mit BMP-2 hingegen beeinflusst vornehmlich Prozesse, die mit Entwicklung assoziiert sind und unterscheidet sich somit bei dem Prozess der anatomischen Strukturentwicklung signifikant von der Kurzzeitinkubation mit BMP-2. Alle anderen biologischen Prozesse wie Zellzyklus und Zellproliferation, die als überrepräsentiert ermittelt wurden, zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Gruppierung der differentiell exprimierten Gene infolge von Kurzzeit- bzw. Langzeitapplikation mit BMP-2, nach beeinflussten biologischen Prozessen, zu einer Übereinstimmung von 45% führt, obwohl komplett andere Gene in den beiden Gruppen erscheinen. Diese Daten deuten auf generelle, von BMP-2 beeinflusste biologische Prozesse hin, zeigen aber gleichzeitig einen zeitabhängigen Unterschied hinsichtlich der veränderten Gene auf. Die Wirkung von BMP-2 auf die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 ist stark abhängig von der Expositionsdauer.

### 3.1.2. Assoziation der differentiell exprimierten Gene mit Tumorigenese

Die signifikant überrepräsentierten biologischen Prozesse wurden hinsichtlich einer Beteiligung an der Tumorentstehung und –progression untersucht. Beide Gruppen zeigten eine Verbindung zu tumorassoziierten Prozessen wie Zellproliferation, Zelladhäsion, Zellzyklus, Tod und zellulären Entwicklungsprozessen. Nur die Prozesse „Zellzyklus“ und „Tod“ können bis in höhere Level verfolgt werden und deuten auf gut untersuchte Prozesse und beteiligte Gene hin (Abb. 3.3.).

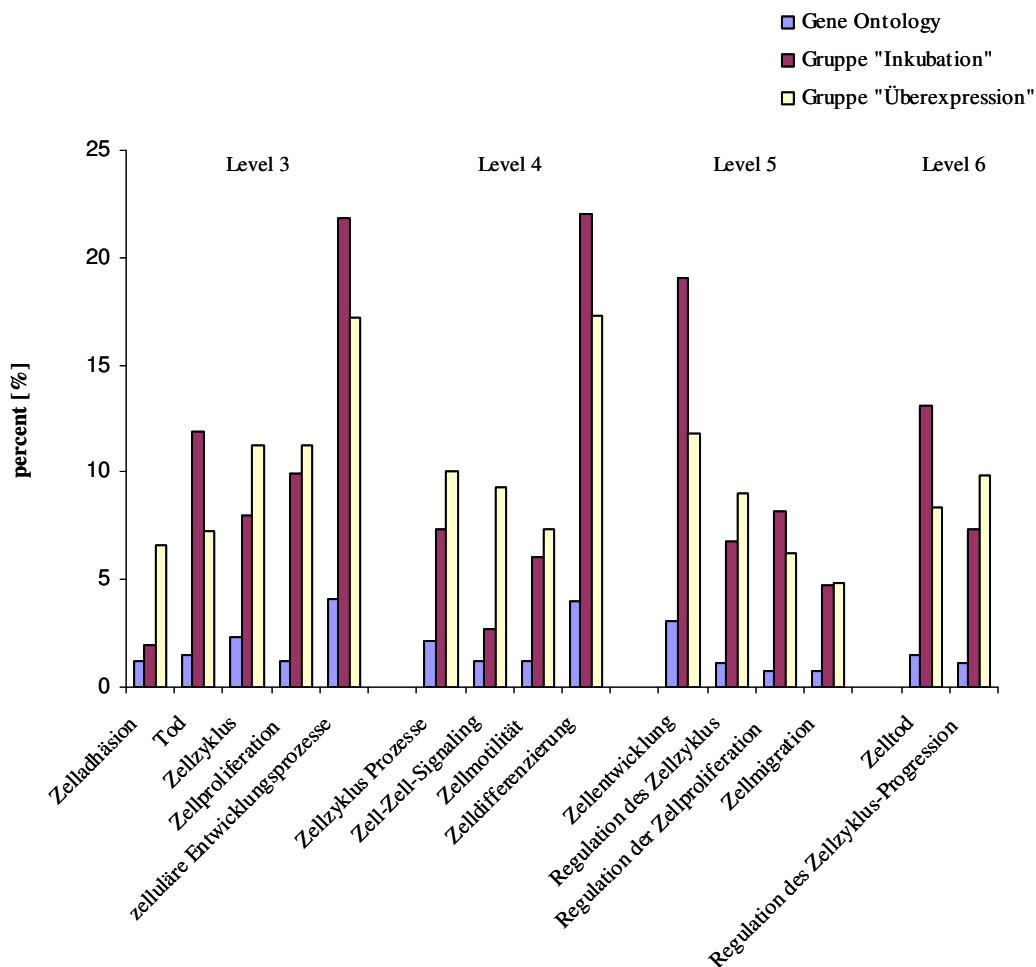


Abb.3.3. Darstellung der tumorassoziierten Prozesse auf Basis der funktionellen Klassifizierung mittels Gene Ontology für die Level 3-6 und Vergleich des prozentualen Anteils der veränderten Gene in den beiden Gruppen „Inkubation“ und „Überexpression“ im jeweiligen Prozess mit der Verteilung laut Gene Ontology

Die Gruppe „Überexpression“ beinhaltet vor allem Gene, die mit Zellzyklus verbunden sind, während die Gruppe „Inkubation“ Gene umfasst, die mit „Tod“ assoziiert sind. Eine detaillierte Evaluation dieser Prozesse zeigte einen größeren Unterschied zwischen Kurzzeit- und Langzeitapplikation von BMP-2 im Prozess „Tod“. Eine Untersuchung des Stammbaumes, der aus der Annotation „Tod“ entspringt, ergab eine direkte Verbindung mit dem

Prozess Apoptose, welcher eine entscheidende Rolle während der Tumorentstehung und – progression einnimmt (Abb. 3.4./3.5.).

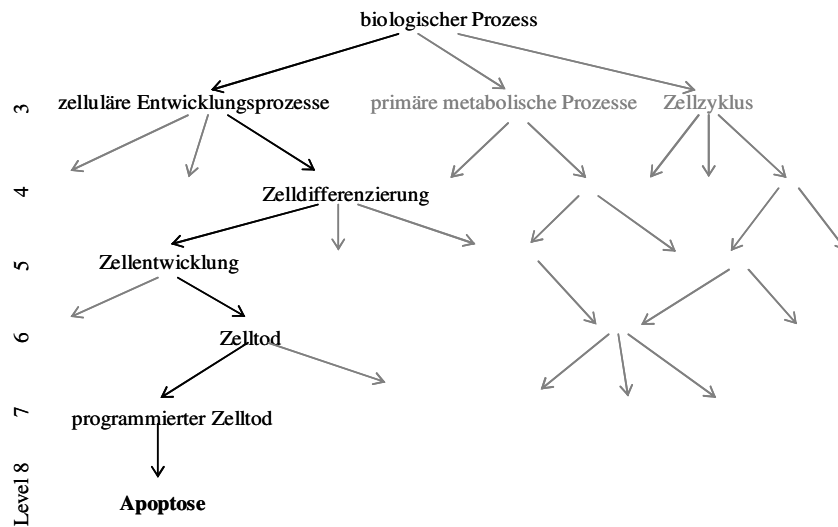


Abb. 3.4. Stammbaum des biologischen Prozesses Apoptose laut Gene Ontology

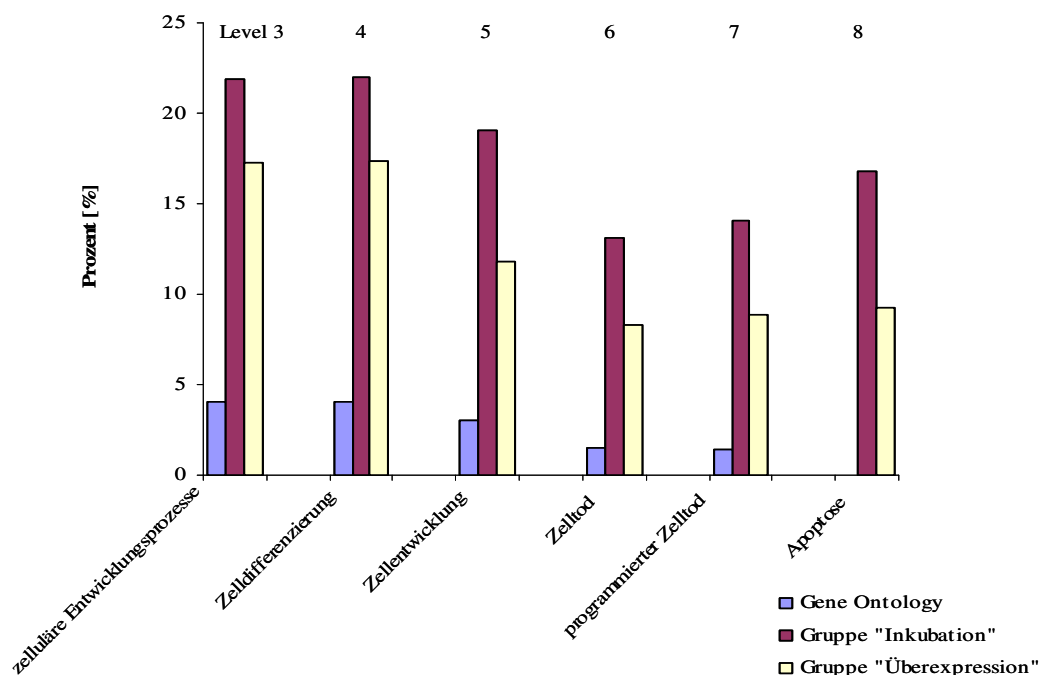


Abb. 3.5. Darstellung des prozentualen Anteils der veränderten Gene in den Gruppen „Inkubation“ und „Überexpression“ im Vergleich zu Gene Ontology für die Apoptose-assoziierten Prozesse laut Stammbaum für die Level 3-8

Nach der Einmalgabe (Inkubation) von BMP-2 wurden 18 Apoptose-assoziierte Gene als differentiell exprimiert identifiziert, während die Überexpression nur mit 8 Apoptosegenen assoziiert ist. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden die weiteren Untersuchungen auf den Prozess Apoptose in der Gruppe „Inkubation“ konzentriert.

### 3.1.3. Verifizierung der Microarray-Daten mittels realtime-PCR

Für die Validierung der Expressionsdaten aus den Microarray-Experimenten wurden realtime-PCRs von ausgesuchten Genen durchgeführt. In der Gruppe „Inkubation“ lag das Augenmerk infolge der Ergebnisse der funktionellen Klassifikation besonders auf Genen, die mit Apoptose assoziiert sind. Für die Überprüfung der Microarray-Daten in der Gruppe „Überexpression“ wurden Gene ausgewählt, die bereits im Zusammenhang mit BMP-2 oder Tumorbiologie beschrieben wurden.

#### 3.1.3.1. Validierung der Microarray Daten in der Gruppe „Überexpression“

Bei der funktionellen Analyse der veränderten Gene kristallisierten sich vor allem für die Gruppe „Inkubation“ signifikant veränderte Prozesse heraus. Diese wurden für weitergehende Untersuchungen ausgewählt (siehe 3.1.3.2.). Um für die Zuverlässigkeit der Microarray-Daten der BMP-2 überexprimierenden Zellen ebenfalls ein Gespür zu bekommen, wurden auf Grundlage einer ausführlichen Literaturrecherche eine Auswahl BMP-2 assoziierter Gene mittels realtime-PCR verifiziert.

Die Expression von IGFBP-5 (insulin-like growth factor binding protein 5) wurde als BMP-2 reguliert beschrieben (Gabbitas und Canalis, 1995). LIF (leukemia inhibitory factor) reguliert im Zusammenspiel mit BMP-2 zahlreiche Entwicklungsprozesse (Adachi et al., 2005, Izumi et al., 2006).

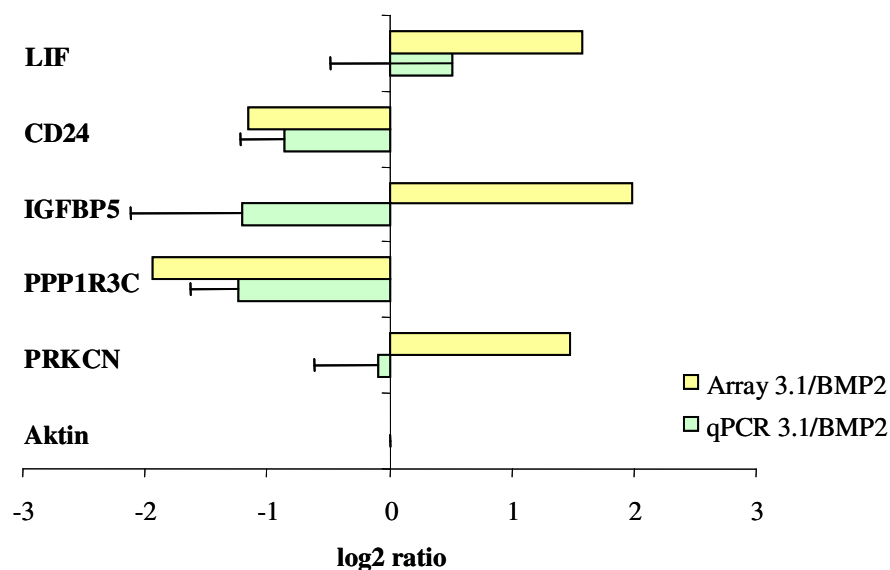


Abb. 3.6. Vergleich der Microarray-Daten und der Ergebnisse der realtime-PCR ausgewählter Gene für die Gruppe „Überexpression“, 3.1/BMP2 – BMP-2 überexprimierende MCF7 normalisiert gegen MCF7 mit Leervektor

Des Weiteren wurden Gene untersucht, die mit dem Tumorgeschehen assoziiert sind. CD24 beispielsweise wurde als Marker für Tumorstammzellen beschrieben (Ponti et al., 2006). PPP1R3C, eine Untereinheit der Proteinphosphatase 1, ist an der Regulation einer Vielzahl von zellulären Funktionen mittels Dephosphorylierung beteiligt (Doherty et al., 1996). Außerdem wurde PRKCN, ein Mitglied der Proteinkinase C-Familie (Hayashi et al., 1999), untersucht, da es in beiden experimentellen Gruppen differentiell exprimiert wird.

Die realtime-PCR-Daten korrespondieren sehr gut mit den Microarray-Daten für LIF, CD24 und PPP1R3C. IGFBP5 und PRKCN zeigten bei den verschiedenen Nachweismethoden eine gegenläufige Tendenz. Die interne Kontrolle Aktin ist nicht verändert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Microarray- und die realtime-PCR-Ergebnisse eine begrenzte Übereinstimmung zeigten (Abb. 3.6.). Für einige Gene (CD24, LIF und PPP1R3C) konnten die Resultate bestätigt werden, während sich für andere Gene (IGFBP5 und PRKCN) die Ergebnisse der verschiedenen Nachweismethoden nicht deckten. Dies lässt sich zum einen auf die unterschiedlichen Methoden zurückführen (siehe 3.1.3.2.). Im Falle des BMP-2 regulierten IGFBP5 sollten die Ergebnisse unter Berücksichtigung der Besonderheiten in der BMP-Wirkung betrachtet werden. So sind die BMP-Effekte in starkem Maße vom momentanen Zustand der Zelle und deren Umgebung abhängig und liefern eine mögliche Erklärung für die divergenten Ergebnisse.

### **3.1.3.2. Validierung der Microarray Daten der Apoptose-assoziierten Gene**

In Anlehnung an die Ergebnisse der funktionellen Interpretation wurden Apoptose-assoziierte Gene in der Gruppe „Inkubation“ näher untersucht (Tab. 3.1.). Die Einordnung in den biologischen Prozess Apoptose nach Gene Ontology erfolgte aufgrund bereits beschriebener direkter oder indirekter Assoziationen mit dem programmierten Zelltod. Diese werden im Folgenden erläutert. Das anti-apoptotische Protein TPT1 weist in Tumoren eine höhere Expression als im korrespondierenden Normalgewebe auf und ist mit der Wachstumsregulation assoziiert (Bommer und Thiele, 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der TPT1-Expression mit einer Unterdrückung des malignen Phänotyps assoziiert ist (Tuynder et al., 2002, 2004). Das RNA-bindende Protein TIA1 ist ein Regulator des RNA-Metabolismus auf der Ebene der RNA-Translation und des alternativen Spleißens (Förch und Valcárcel, 2001). Aufgrund dieses Regulationsmechanismus scheint TIA1 seine pro-apoptotische Wirkung zu entfalten. TNFRSF5 (auch CD40), ein Mitglied der TNF- (tumor necrosis factor) Familie, ist ein Transmembranprotein, welches in vielen Zellen und daraus resultierenden Tumoren, z.B. Brust, Lunge, Leber, exprimiert wird (Younes und

Kadin, 2003). Die CD40-Expression scheint auf Tumorzellen epithelialen und mesenchymalen Ursprungs beschränkt und spielt eine Rolle bei der Induktion von Apoptose (Ottaiano et al., 2002). Wichtige Regulatoren der Apoptose sind die Mitglieder der Bcl-2 Familie (Schorr et al., 1999), von denen sich drei Mitglieder unter den veränderten Genen befinden: die pro-apoptotischen Moleküle BCLAF1 und BAX sowie das anti-apoptotische BAG5. Die Interaktionen und Regulationsmechanismen dieser Proteinfamilie sind sehr vielfältig und beruhen auf einer Feinabstimmung einer Vielzahl von Komponenten. Eine Verbindung dieser Proteine und der Entwicklung der Brustdrüse sowie der Entstehung von Brustkrebs konnte bereits hergestellt werden (Schorr et al., 1999). DOCK1, ein Molekül mit GEF-Aktivität (Guanidin exchange factor), in einem Komplex mit ELMO spielt bei der Beseitigung apoptotischer Zellen eine Rolle (Kinchen und Ravichandran 2007). Ein möglicher Tumorsuppressor ist das pro-apoptotische INHA, ein Mitglied der TGF $\beta$ -Superfamilie (Kumanov et al., 2005). RYBP oder DEDAF (death effector domain-associated factor) interagiert mit einer Reihe Apoptoseproteinen wie FADD und verschiedenen Procaspasen und induziert über diese Wechselwirkungen die Apoptose (Zheng et al., 2001). Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) spielt eine zentrale Rolle in der Angiogenese und darüber hinaus beeinflusst er verschiedene biologische Prozesse, unter anderem Apoptose, während der Tumorigenese (Mercurio et al., 2005). NCKAP1, ein NAK-assoziiertes Protein, bindet und aktiviert IKK-abhängige Kinasen und stimuliert dadurch den NF- $\kappa$ B Signalweg (Fujita et al., 2003). Diese Aktivierung führt zu einer Hemmung der TNF $\alpha$  induzierten Apoptose. Ein wichtiger Schritt in der Apoptose ist der Aufbau von so genannten Apoptosomen, einem Komplex spezifischer Adaptorproteine, die für die Aktivierung der Initiatorcaspasen essentiell sind. In diesen Prozess scheint das Protein CASP8AP involviert zu sein, wobei der genaue Mechanismus noch aufgeklärt werden muss (Shi, 2006). Die atypische Rho GTPase ARHT1 ist an der Regulation der mitochondrialen Homöostase beteiligt, wobei eine Aktivierung von ARHT1 zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Netzwerkes führt (Fransson et al., 2003). Über diesen Mechanismus wird vermutlich die Apoptose-induzierende Wirkung von ARHT1 vermittelt. Ein weiteres regulatorisches Protein der Apoptose ist FAIM (Fas apoptotic inhibitory molecule). Es entfaltet seine anti-apoptotische Wirkung über die Interaktion mit Fas, einem zentralen Molekül in der Aktivierung des extrinsischen Weges der Apoptose (Schneider et al., 1999). PAWR ist in der Lage in einer Reihe von Zellen und durch verschiedene Stimuli Apoptose zu induzieren (García-Cao et al., 2005) und wird als möglicher Tumorsuppressor betrachtet. Die Interferon-induzierbare Proteinkinase PKR wurde ursprünglich im Zusammenhang mit



antiviralen Effekten beschrieben, scheint darüber hinaus aber auch, mit dem Tumorgeschehen und Apoptose assoziiert zu sein (Jagus et al., 1999).

<b>Affymetrix-ID</b>	<b>BMP2 4h/SF</b>	<b>Gene Symbol</b>	<b>Gene Title</b>
207783_x_at	0,14	TPT1	tumor protein, translationally-controlled 1
35150_at	0,37	TNFRSF5	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5
203187_at	0,41	DOCK1	dedicator of cytokinesis 1
201083_s_at	0,45	BCLAF1	Bcl-2-associated transcription factor
219072_at	0,47	BCL7C	B-cell CLL/lymphoma 7C
210314_x_at	0,50	TNFSF13	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13
210141_s_at	2,00	INHA	inhibin, alpha
202984_s_at	2,06	BAG5	BCL2-associated athanogene 5
201845_s_at	2,06	RYBP	RING1 and YY1 binding protein
210512_s_at	2,14	VEGF	vascular endothelial growth factor
207738_s_at	2,18	NCKAP1	NCK-associated protein 1
222201_s_at	2,20	CASP8AP2	CASP8 associated protein 2
218323_at	2,24	ARHT1	ras homolog gene family, member T1
220643_s_at	2,27	FAIM	Fas apoptotic inhibitory molecule
208478_s_at	2,35	BAX	BCL2-associated X protein
201448_at	2,35	TIA1	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein
204005_s_at	2,87	PAWR	PRKC, apoptosis, WT1, regulator
204211_x_at	3,28	PKR	protein kinase, interferon-inducible

Tab. 3.1. Liste der veränderten, Apoptose-assoziierte Gene in der Gruppe „Inkubation“

Die Microarray-Daten ergaben 18 Gene, die infolge einer BMP-2 Inkubation differentiell exprimiert werden und im Zusammenhang mit Apoptose stehen: sechs herunterregulierte (TPT1, TNFRSF5, DOCK1, BCLAF1, BCL7C, TNFSF13) und 12 hochregulierte Gene (INHA, BAG5, RYBP, VEGF, NCKAP1, CASP8AP2, ARHT1, FAIM, BAX, TIA1, PAWR, PKR). Die Ergebnisse des Microarray-Experiments konnten für 10 Gene reproduziert werden (TPT1, DOCK1, BCLAF1, BCL7C, BAG5, VEGF, CASP8AP2, BAX, PAWR, PRK). Die Validierung dieser differentiell exprimierten Gene durch zwei verschiedene Nachweismethoden (Microarray und realtime-PCR) spricht für eine Regulation durch exogenes BMP-2 (Abb. 3.7.). Für die nicht verifizierten Gene (TNFRSF5, RYBP, NCKAP1, ARHT1, FAIM, TIA1) kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, da die beiden Nachweismethoden auf verschiedenen Prinzipien beruhen. Bei der Microarray-Technologie werden die Gene durch Hybridisierung mit kurzen Oligonukleotiden nachgewiesen, und bei der realtime-PCR werden größere Genabschnitte mittels genspezifischen Primern amplifiziert. Obwohl die Primer auf

Grundlage der Erkennungssequenzen des Microarrays hergestellt wurden, werden bei der realtime-PCR zumeist größere Genabschnitte amplifiziert, die veränderte Eigenschaften aufweisen können. Durch post-transkriptionelle Modifikationen wie alternatives Spleißen kommt es zu einer Veränderung der mRNA Sequenz, und dadurch kann die sequenz-spezifische Detektion behindert werden. Während man bei der Microarray-Technologie von einer generellen Gen-Erkennung ausgeht und mögliche falsch-positiven Ergebnisse berücksichtigen muss, ist die realtime-PCR spezifischer, aber eventuelle Spleißvarianten können durch das Primerdesign möglicherweise nicht detektiert werden. Diese Tatsache muss bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden und macht weitergehende Untersuchungen notwendig. So sind für TIA1, welches nicht verifiziert werden konnte, alternative Spleißvarianten beschrieben wurden.

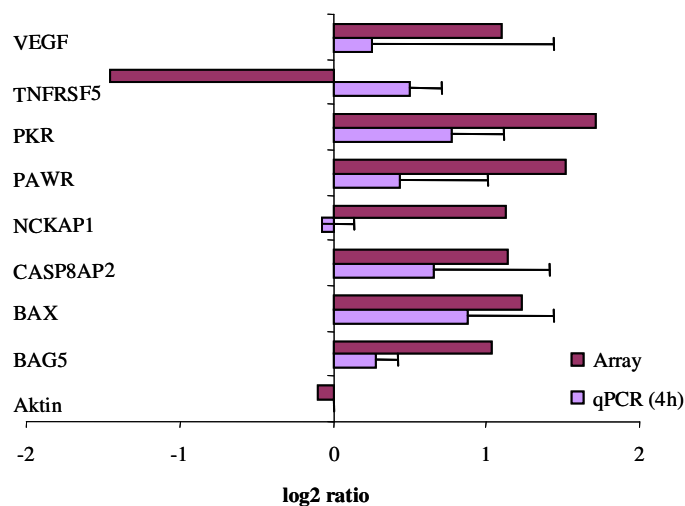


Abb. 3.7. Vergleich der Microarray- und realtime-PCR-Daten Apoptose-assoziiierter-Gene in der Gruppe „Inkubation“

Des Weiteren unterscheiden sich die beiden Methoden grundlegend in der Probenvorbereitung. Während bei der realtime-PCR die isolierte Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben und sofort der PCR-Reaktion zugeführt wird, erfolgen bei der Probenvorbereitung für die Microarray-Analyse noch weitere Schritte, die eine mögliche Fehlerquelle darstellen. Die durchgeführte Fragmentierung der cRNA beispielsweise kann zur Zerstörung spezifischer Erkennungssequenzen führen und somit die Detektion einiger Gene erschwert werden.

Bei weitergehenden Untersuchungen (Taubert, 2007) mit diesen Apoptose-Genen und verschiedenen Konzentrationen von BMP-2 wurden die Daten eingehender analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Veränderungen der Apoptose-assoziierten Gene konzentrationsabhängig sind (Tab. 3.2.). Bei der Inkubation von MCF-7 mit 50 ng/ml BMP-2 konnte die veränderte

Expression von zehn Genen (TNFRSF5, INHA, BAG5, RYBP, VEGF, NCKAP, CASP8AP2, BAX, TIA1, PKR) aus dem Microarray-Datensatz „Apoptose“ bestätigt werden. Auch bei einer Konzentration von 100 ng/ml BMP-2 zeigte sich eine Bestätigung der Microarray-Daten bei 10 Genen, allerdings nicht in Übereinstimmung mit den Resultaten mit 50 ng/ml BMP-2.

Gen	log2 ratio		
	Array (100 ng/ml BMP-2)	qPCR (100 ng/ml BMP-2)	qPCR (50 ng/ml BMP-2)
TPT1	-2,84	-0,79	0,15
TNFRSF5	-1,43	0,50	-0,35
DOCK1	-1,29	-1,79	0,65
BCLAF1	-1,15	-0,83	0,65
BCL7C	-1,09	-1,36	0,42
TNFSF13	-1,00		
INHA	1,00		0,10
BAG5	1,04	0,28	0,13
RYBP	1,04	-0,71	0,58
VEGFA	1,10	0,25	0,14
NCKAP1	1,12	-0,07	0,39
CASP8AP2	1,14	0,66	0,52
ARHT1	1,16	-1,83	-0,33
FAIM	1,18	-1,30	-0,75
BAX	1,23	0,88	0,17
TIA1	1,23	-2,62	0,46
PAWR	1,52	0,43	-0,20
PKR	1,71	0,78	0,53

Tab. 3.2. Vergleich der Microarray-Daten mit den Ergebnissen der realtime-PCR nach Inkubation mit unterschiedlichen BMP-2 Konzentrationen, rot: Herunterregulation, grün: Hochregulation

Insgesamt kann man die Resultate in drei Gruppen einteilen. Zum einen gibt es Gene, die bei beiden BMP-2 Konzentrationen die Microarray-Daten widerspiegeln: BAG5, VEGF, CASP8AP2, BAX und PRK. Bei diesen Genen kann man von einer Sensitivität gegenüber BMP-2, unabhängig von der Konzentration, ausgehen. Diese Ergebnisse deuten auf eine generelle Regulation dieser Gene durch BMP-2 hin. Zum anderen gibt es Gene (ARHT1 und FAIM), für die die Expressionsdaten bei keiner BMP-2 Konzentration verifiziert werden können. Dies ist möglicherweise auf die bereits beschriebenen verschiedenen Nachweismethoden zurückzuführen. Die dritte Gruppe beinhaltet Gene, die in Abhängigkeit der BMP-2 Konzentration die Ergebnisse des Microarrays bestätigen. TNFRSF5, RYBP, NCKAP und TIA1 zeigen nur eine Übereinstimmung mit dem Microarray nach einer Inkubation mit 50 ng/ml BMP-2. Wohingegen die veränderte Expression von PAWR nur bei einer BMP-2 Konzentration von 100 ng/ml reproduziert werden kann.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Microarray-Daten mit einer zweiten Methode (realtime-PCR) gut reproduziert werden konnten. Eine neue Gruppe BMP-2 regulierter Gene, die mit Apoptose assoziiert sind, wurde identifiziert. Bei einer genauen Betrachtung dieser Gene zeigt sich, dass nur wenige direkt an der Apoptoseregulation beteiligt sind. Eine Vielzahl der Gene ist eher indirekt mit dem Prozess Apoptose assoziiert, z.B. mit der Beseitigung apoptotischer Zellen (DOCK1) oder der Regulation der mitochondrialen Homöostase (ARHT1). Des Weiteren ist der Modus des BMP-2 Einflusses fraglich. Es muss die Frage geklärt werden, ob es sich bei den beobachteten Einfluss von BMP-2 auf die Expression dieser Apoptose-assoziierten Gene um einen direkten oder indirekten Effekt handelt. Es zeigten sich teilweise divergente Ergebnisse in Abhängigkeit der BMP-2 Konzentration. Die zugrunde liegenden Mechanismen müssen in weitergehenden Experimenten genauer untersucht werden. Es ist bereits bekannt, dass die BMP-2 Wirkung konzentrations- und zeitabhängig ist. Des Weiteren sind die BMP-2 Effekte zelltypspezifisch und müssen deshalb individuell studiert und in den Gesamtkontext des jeweiligen Zelltypen und der äußeren Bedingungen eingeordnet werden.

#### **3.1.4. Funktionelle Untersuchungen von PKR und seinem Substrat eIF2alpha**

Die Veränderungen der Proteinkinase R (PKR) konnten mit beiden Methoden sehr gut reproduziert werden. Die Veränderungen der PKR Expression auf der mRNA-Ebene wurden anschließend mittels Western blot auf Proteinebene untersucht. Dazu wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (4h, 16h, 20h, 24h) BMP-2 inkubierte Proben und serumfreie Kontrollen generiert. Die BMP-2 abhängige Hochregulation von PKR auf der mRNA-Ebene führt nicht zu einer Veränderung des PKR-Proteingehalts (Abb. 3.8.). Die Proteinkinase R ist ein wichtiger Regulator der Translation, des Zellwachstums und der Apoptose. Die Aktivierung von PKR erfolgt durch Homodimerisierung und Autophosphorylierung. Die Inkubation von MCF-7 mit BMP-2 führte zu einem Anstieg der phosphorylierten Form von PKR nach 4 h. Dies deutet auf einen zusätzlichen BMP-2 abhängigen Regulationsmechanismus der PKR-Aktivität hin. Ein gut untersuchtes Substrat von PKR ist die alpha-Untereinheit des Translationsfaktors eIF2 (eIF2alpha). Die Phosphorylierung von eIF2alpha führt zur Hemmung der Translation. Während der Inkubation von MCF-7 mit BMP-2 ist der Gehalt an eIF2alpha nicht verändert. Im Gegensatz dazu ist die Menge an phosphoryliertem eIF2alpha infolge der BMP-2 Inkubation nach 16 und 24 Stunden im Vergleich zu den Kontrollen erhöht.

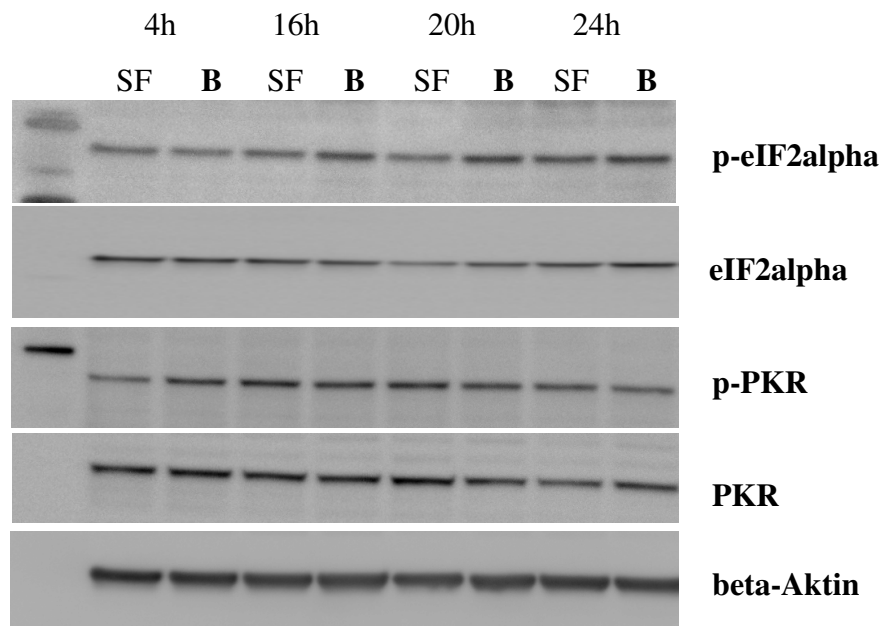


Abb. 3.8. Westernblot-Analysen von PKR und der aktivierten, phosphorylierten Form p-PKR sowie seinem Substrat eIF2alpha und der phosphorylierten Form p-eIF2alpha zum Vergleich BMP-2 inkubierter MCF-7 (B) und serumfreier Kontrollen (SF) über einen Zeitraum von 24h

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass PKR ein neues Target der BMP-2 Wirkung ist. PKR spielt eine Rolle bei der zellulären Stressantwort (Williams, 1999) und dort vor allem bei der Antwort des endoplasmatischen Reticulums auf ungefaltete Proteine. Die Induktion der PKR-Expression und die Modulation der PKR-Aktivität durch BMP-2 lassen eine mögliche Funktion von BMP-2 als Überlebensfaktor für die Zellen vermuten, der in der Lage ist infolge ungünstiger zellulärer Bedingungen, Rettungsmechanismen wie die sogenannte „unfolded protein response“ anzuschalten (Ron und Walter, 2007).

### 3.2. Das Tet-System für eine induzierbare Genexpression

Die großen Unterschiede der veränderten Gene infolge von Kurzzeit- und Langzeitapplikation von BMP-2 werfen die Frage auf, ob eine graduelle Veränderung der BMP-2 Konzentration und der Expositionsdauer von dem einen beobachteten „Extrem“ zum anderen führen. Ein geeignetes System für derartige Analysen ist eine induzierbare BMP-2 Expression. Dazu wurde das Tet-System verwendet, welches eine Induktion der BMP-2 Expression über einen definierten Zeitraum ermöglicht. Die Untersuchung der differentiell exprimierten Gene nach verschiedenen Expositionszeiten von BMP-2 soll zur Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen der zeitabhängigen Wirkung von BMP-2 beitragen. Des Weiteren ermöglicht

das Tet-System Untersuchungen zu Effekten von exogenem („Inkubation“) und endogenem BMP-2 („Überexpression“) in Zellen mit einer identischen genetischen Ausstattung.

In der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt vor allem auf der Etablierung des Tet-On Systems in MCF-7 mit BMP-2 und der Charakterisierung der hergestellten stabilen Klone.

### 3.2.1 Herstellung und Charakterisierung des Response-Plasmids

Das Volllänge-BMP-2 lag bereits kloniert im Vektor pcDNA 3.1. vor und wurde mittels EcoRV herausgeschnitten. Das Tet-On Response Plasmid pTRE2hyg wurde mit dem gleichen Enzym linearisiert. Die Produkte des Restriktionsverdau wurden mit einer Agarosegelelektrophorese analysiert (Abb. 3.9.). Der linearisierte Vektor mit einer Größe von 5325 bp und das BMP-2 mit einer Länge von 1272 bp wurden anschließend aus dem Gel extrahiert, ligiert und in E.coli transformiert.

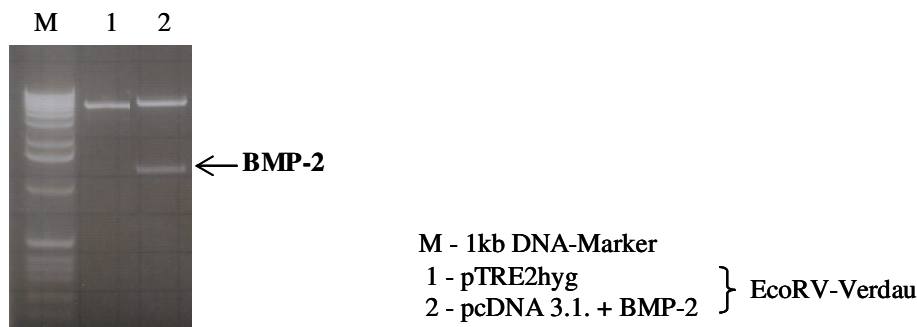


Abb. 3.9. Bild der Agarosegelelektrophorese des EcoRV-Verdau

Von ausgewählten Klone wurden Übernachtkulturen angezchtet und die Plasmide isoliert. Anschließend wurden die Klone auf den Einbau von BMP-2 untersucht. Dazu erfolgte ein Restriktionsverdau mit EcoRV (Abb. 3.10.). Plasmide, die ein Fragment der Größe 1272 bp (BMP-2) enthielten, wurden mittels eines differentiellen Restriktionsverdau weitergehend analysiert.

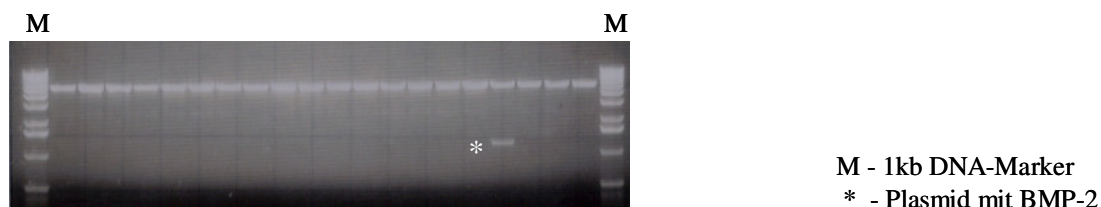


Abb. 3.10. EcoRV-Verdau zur Analyse ausgewählter Klone auf Insertion von BMP-2

Da die ligierten Fragmente durch die Verwendung von EcoRV glatte („blunt“) Enden haben, kann der Einbau des BMP-2 in zwei Orientierungen erfolgen. Um die richtige Insertion von BMP-2 zu bestimmen, erfolgte ein Verdau mit BamHI. Dieses Enzym erzeugt in Abhängigkeit der Orientierung von BMP-2 verschieden große Fragmente. Bei einem Einbau des BMP-2 in sense-Orientierung entstehen Fragmente von 1319 und 5278 bp Länge, während die antisense-Orientierung zu Bruchstücken von 6538 und 69 bp führt. Abbildung 3.11. zeigt das Bild einer Agarosegelelektrophorese des BamHI-Verdaus von zwei verschiedenen Klonen. Bei dem ersten Klon sind zwei Banden von ca. 1300 bp und reichlich 5000 bp zu sehen, was den Fragmenten für eine sense-Orientierung entspricht. Der zweite Klon zeigt nur eine Bande von über 6000 bp, was auf einen Einbau des BMP-2 in der antisense Richtung hinweist. Das zweite erwartete Fragment von 69 bp ist auf einem 1%igen Agarosegel nicht mehr nachweisbar. Der erste Klon trägt das BMP-2 in der richtigen Orientierung und wurde für weitergehende Untersuchungen verwendet.

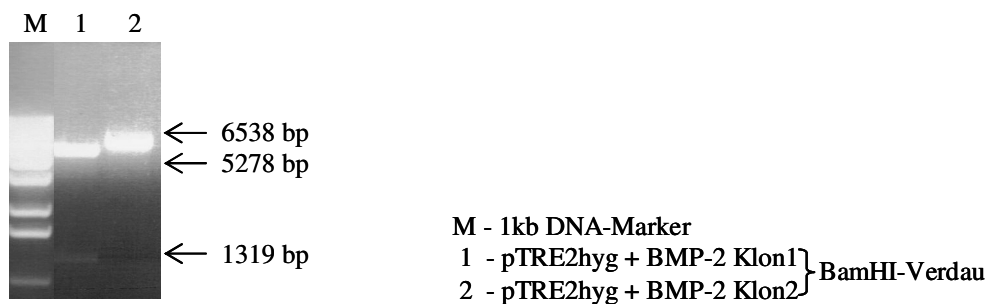


Abb. 3.11. Differentieller Restriktionsverdau mit BamHI von identifizierten BMP-2 Klonen

Im nächsten Schritt wurde das Plasmid pTRE2hyg + BMP-2 mit BMP-2 spezifischen Primern sequenziert (Sequenziererergebnisse siehe Anhang) und mit der Sequenz aus der Gendatenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) abgeglichen. In dem 1188 bp umfassenden translatierten Bereich des BMP-2 wurde ein Basenaustausch an Position 151 detektiert. Dabei wurde ein Adenosin durch ein Guanodin ersetzt. Die Analyse der daraus resultierenden Proteinsequenz zeigte einen Austausch von Serin171 gegen Glycin. Beide Aminosäuren zählen zu den kleinen Aminosäuren und unterscheiden sich vor allem in ihrer Polarität. Dieser Austausch sollte nach dem momentanen Kenntnisstand keinen Einfluss auf die BMP-2 Funktion haben.

### 3.2.2. Bestimmung der optimalen Doxycyclin-Konzentration

Für die Etablierung von stabil transfizierten Klonen wurde die Hygromycin-Resistenz des pTRE2hyg-Vektors genutzt. Die Bestimmung der optimalen Hygromycin-Konzentration erfolgte wie unter 2.4.2. beschrieben und ergab eine geeignete Konzentration von 100 µg/ml.

Anschließend erfolgte die Bestimmung der geeigneten Doxycyclin-Konzentration für eine optimale Induktion mit der Kontrollzelllinie U2-OS Luc Tet-On (siehe 2.4.2.). Dazu machte man sich die enzymatische Aktivität der Luciferase zunutze, die unter der Kontrolle des Tetracyclin Response Elements (TRE) steht. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte somit indirekt über die enzymatische Umsetzung von Luciferin durch das gebildete Protein Luciferase.

Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger, exponentieller Anstieg der Luciferase-Aktivität, gemessen in relativen Lichteinheiten (RLU – relative light units) über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich von 0,01 ng/ml bis 1 µg/ml (Abb. 3.12.).

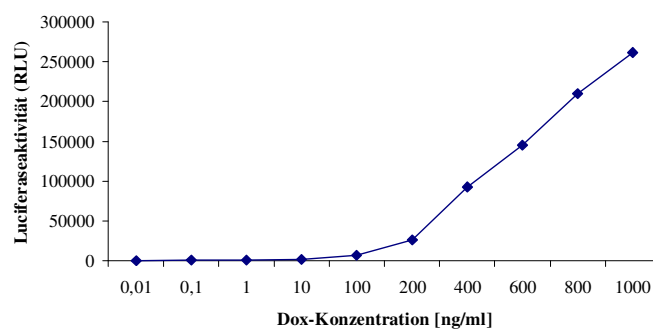


Abb. 3.12. Dosis-Wirkungs-Kurve von Doxycyclin bestimmt in U2-OS Luc Tet-On anhand der Luciferaseaktivität (angegeben in RLU)

Diese Ergebnisse bestätigen die Kontrolle der Luciferase-Expression durch den reversen Tetracyclin-kontrollierten Transaktivator (rtTA) in Anwesenheit von Doxycyclin, wobei mit steigender Doxycyclin-Konzentration die Menge an gebildetem Genprodukt (Luciferase) zunimmt. Berechnet man den Grad der Induktion des Tet-On Systems mit folgender Formel:

$$x\text{-fache Induktion} = + \text{Dox RLU} / - \text{Dox RLU}$$

so zeigt sich ebenfalls ein exponentieller Anstieg in Abhängigkeit von der Doxycyclin-Konzentration (Abb. 3.13.).

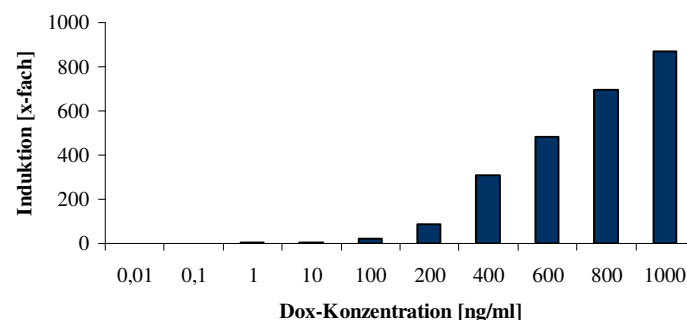


Abb. 3.13. Bestimmung des Grades der Induktion der Luciferaseaktivität in U2-OS Luc Tet-On



Bereits die Zugabe von 0,1 ng/ml Doxycyclin bewirkt eine Verdoppelung der messbaren Luciferase-Aktivität. Diese wird bis zu einer Konzentration von 1 µg/ml Doxycyclin auf das fast 900fache gesteigert. Für weitere Experimente wurde eine Konzentration von 600 ng/ml Doxycyclin ausgewählt, da sich eine fast 500fache Induktion der Genexpression im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle zeigte.

### 3.2.3. Transiente Transfektion

Die Funktionalität des Tet-Systems und des konstruierten BMP-2 Vektors (pTRE2hyg + BMP-2) wurde zuerst mittels einer transienten (kurzzeitigen) Expression untersucht. Dazu wurde die bereits stabil mit dem Tet-On Vektor transfizierte Mammakarzinomzelllinie MCF-7 (MCF-7 Tet-On) und die doppelt stabil transfizierte Kontrollzelllinie U2-OS Luc Tet-On verwendet. Im ersten Schritt wurde die Effektivität der Transfektionsmethode getestet. Die Plasmide wurden mittels einer Nucleofektion, einer Sonderform der Elektroporation, in die Zellen eingebracht. Zur Bestimmung der Transfektionsrate wurde ein Plasmid transfiziert, welches konstitutiv ein grün fluoreszierendes Protein (eGFP – enhanced green fluorescent protein) exprimiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mikroskopisch begutachtet und durch einen Vergleich der Phasenkontrast- und der Fluoreszenzaufnahme die Effizienz der Transfektion abgeschätzt.

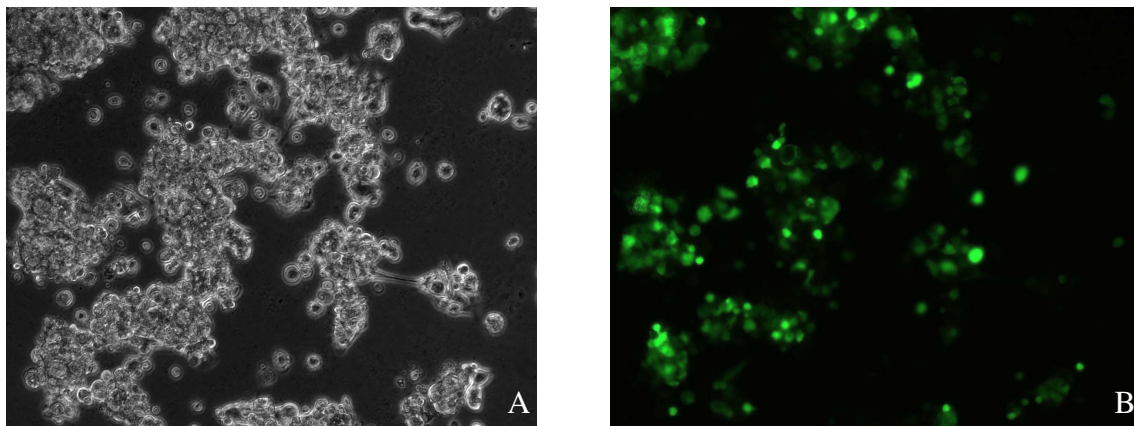


Abb. 3.14. Bilder der transienten Transfektion von MCF-7 Tet-On mit eGFP  
(A) Phasenkontrastaufnahme, (B) Fluoreszenzaufnahme, 40x

Bei den MCF-7 Tet-On Zellen waren ca. 50-60% der Zellen positiv bezüglich GFP, was mit der Effektivität der Transfektion gleichzusetzen ist (Abb.3.14.). Die Morphologie der MCF-7 Tet-On deutet darauf hin, dass die Transfektionsprozedur enormen Stress für die Zellen bedeutet, da sie nach 24 h immer noch abgerundet sind und sich nicht richtig auf der Zellkulturoberfläche ausbreiten.

Bei der Kontrollzelllinie U2-OS Luc Tet-On zeigte sich eine Transfektionseffizienz von über 70% (Abb. 3.15.). Anhand der Morphologie der Zellen ist zu erkennen, dass die U2-OS Luc Tet-On weniger sensitiv gegenüber der Nukleofektion sind. Die Zellen haben sich bereits wieder vollständig an die Zellkulturoberfläche geheftet und auch in der Fluoreszenzaufnahme ist deutlich eine zytoplasmatische Färbung des GFP zu erkennen. Der Zellkern erscheint dunkel und ungefärbt wohingegen bei den MCF-7 Tet-On nur eine diffuse Fluoreszenz zu sehen ist.

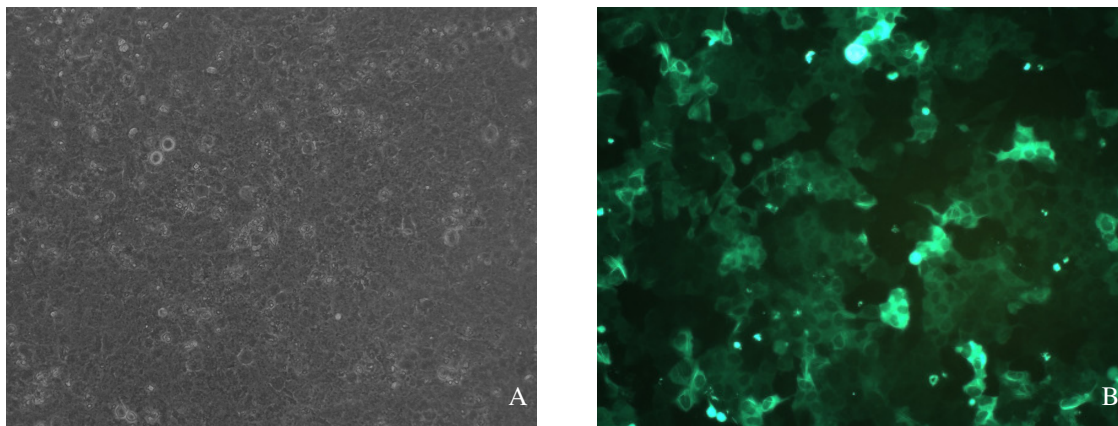


Abb. 3.15. Bilder der transienten Transfektion von U2-OS Luc Tet-On mit eGFP  
(A) Phasenkontrastaufnahme, (B) Fluoreszenzaufnahme, 40x

Die Nukleofektion eignet sich sehr gut, um Vektoren in die getesteten Zellen einzubringen. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der konstruierte Vektor pTRE2hyg + BMP-2 unter der Kontrolle des Tet-Systems funktioniert. Dazu wurde das Plasmid transient in die Kontrollzelllinie U2-OS Luc Tet-On transfiziert. Nach 24 h wurde die Hälfte der Transfektionsansätze mit 600 ng/ml Doxycyclin induziert und die andere als Kontrolle mitgeführt. Nach 24 h, 48 h, 72 h und 168 h (eine Woche) Induktion wurden die Zellen in RNA-Lysepuffer aufgenommen und bei -80°C eingefroren. Die Proben wurden wie unter 2.2. beschrieben aufbereitet, und verschiedene PCRs wurden durchgeführt.

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Zuerst wurde eine beta-Aktin PCR durchgeführt, um die Qualität der isolierten RNA und die Gleichmäßigkeit der Proben zu testen. In Abb. 3.16. ist zu sehen, dass die Banden für alle Proben gleichmäßig stark sind. Das lässt darauf schließen, dass gleiche Mengen cDNA für die PCR eingesetzt wurden. Außerdem zeigten sich keine Unterschiede zwischen induzierten und nicht induzierten Proben. Des Weiteren wurde bei allen PCRs eine Kontrolle mit Wasser anstelle von cDNA mitgeführt, um Kontaminationen der verwendeten Chemikalien und somit falsch positive Ergebnisse auszuschließen. Die Überprüfung der Induzierbarkeit des Systems

erfolgte mittels einer BMP-2 spezifischen PCR. Das inklonierte Gen steht unter Kontrolle des Tetracyclin Response Elements (TRE) und ist somit sensitiv für das Vorhandensein von Doxycyclin. Zu allen Zeitpunkten ist die BMP-2 Bande und somit die Expression von BMP-2 in den induzierten Proben stärker als in den nicht induzierten Proben. Die BMP-2 Expression steht demzufolge unter der Kontrolle des Tet-Systems, und die Funktionalität des konstruierten Vektors pTRE2hyg + BMP-2 konnte nachgewiesen werden.

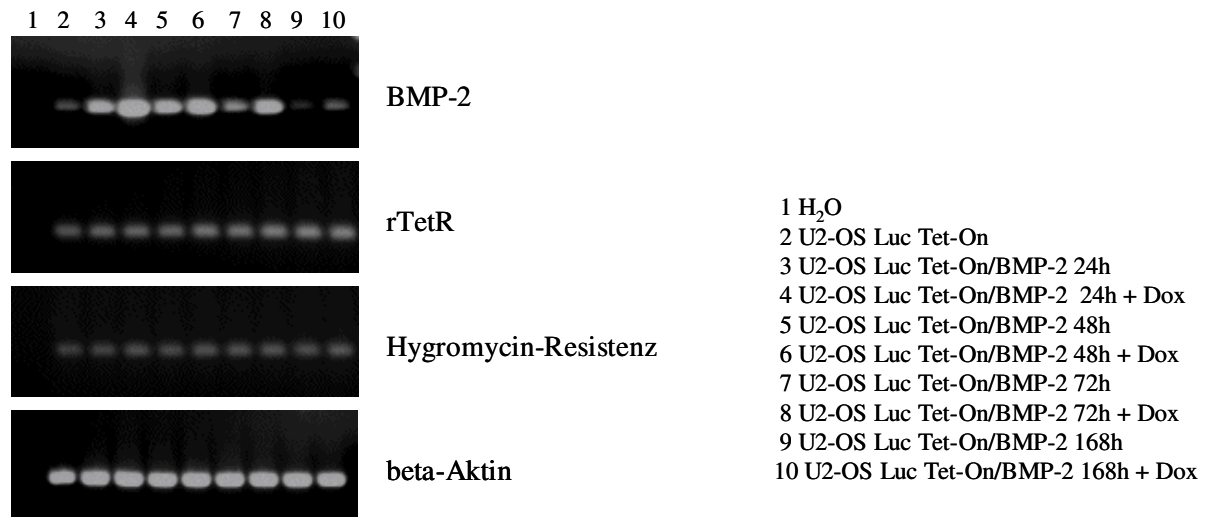


Abb. 3.16. Bilder der Agarosegelelektrophoresen der durchgeführten rt-PCRs mit den transient transfizierten U2-OS Luc Tet-On Zellen

Dabei zeigt sich eine Abnahme der BMP-2 Expression über die Zeit, was darauf zurückzuführen ist, dass der Vektor nur temporär in die Zellen eingebracht wurde und eine Woche (168 h) nach der Transfektion von den Zellen bereits wieder eliminiert wurde. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die BMP-2 Expression in der nicht transfizierten Probe (2) niedriger ist als in allen transfizierten Proben. Das lässt auf eine Hochregulation des BMP-2 infolge der Transfektionsprozedur schließen. Durch eine semiquantitative Auswertung der Bandenintensitäten mittels AIDA konnte das weiter untermauert werden. Über den ganzen untersuchten Zeitraum wiesen die mit Doxycyclin induzierten Proben eine höhere BMP-2 Expression (normalisiert gegen Aktin) auf als die nicht-induzierten Proben (Abb. 3.17.). Des Weiteren konnte die Abnahme der BMP-2 Expression über die Zeit bestätigt werden. Die maximale Induzierbarkeit (1,3fach) zeigte sich 24 h nach der Zugabe von Doxycyclin. Bei der Beurteilung dieser Daten ist zu berücksichtigen, dass infolge der Sättigung der PCR-Reaktion für BMP-2 die Bandenintensität sehr stark ist und der Höchstwert für eine Quantifizierung mit der Software überschritten wird. Somit ist von einem höheren Wert für das Maß der Induktion auszugehen.

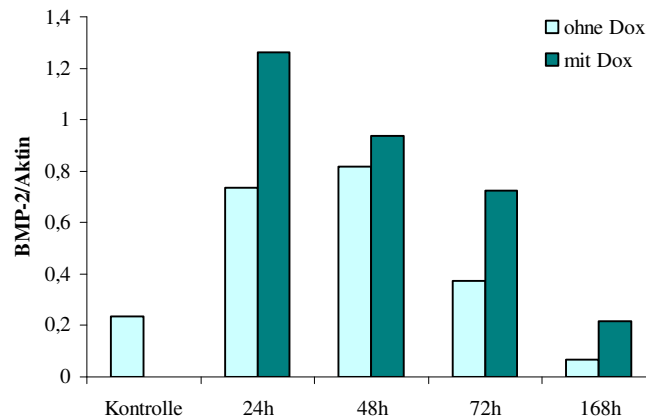


Abb. 3.17. Semiquantitative Auswertung der PCR-Reaktion der BMP-2 transfizierten U2-OS Luc Tet-On mit AIDA; BMP-2 Expression normalisiert gegen die Aktin-Expression für nicht-induzierte (ohne Dox) und induzierte (mit Dox) Proben und eine untransfizierte Kontrolle

Zur weiteren Kontrolle des Tet-Systems wurde der von dem pTet-On Vektor exprimierte reverse Tet-Repressor (rTetR) untersucht (Abb. 3.16.). Dieses Protein wird konstitutiv exprimiert, bindet in Anwesenheit von Doxycyclin an das Tetracyclin Response Element (TRE) und initiiert somit die Expression von nachgeschalteten Genen (z.B. BMP-2).

Die rTetR spezifische PCR zeigte für alle Proben eine gleich bleibende Expression des Gens. Somit konnte die konstitutive Expression dieses Gens und die Unabhängigkeit von der Zugabe von Doxycyclin nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde als Voruntersuchung für die Etablierung stabiler Klone die Expression des Hygromycin-Resistenzgens untersucht (Abb. 3.16.). Auch hier zeigte sich eine gleich bleibende, Doxycyclin-unabhängige Expression, und die Hygromycin-Resistenz kann somit für die Selektion stabiler Klone genutzt werden

Da in der vorliegenden Arbeit die Rolle von BMP-2 im Mammakarzinom im Mittelpunkt steht, wurde im nächsten Schritt die Modellzelllinie MCF-7 Tet-On auf ihre Funktionalität überprüft. Dazu fand der Vektor pTRE2hyg Luc Verwendung, welcher ein Luciferase-Gen unter der Kontrolle des Tet-Systems enthält. Dieser wurde transient in die MCF-7 Tet-On transfiziert und mittels eines Luciferase Assays die Induktion der Genexpression mit 600 ng/ml Doxycyclin in diesem Zellsystem untersucht. In Abb. 3.18. sind die Ergebnisse der Luciferase-Aktivitätsmessung der induzierten Proben für die verschiedenen Zeitpunkte abzüglich der Hintergrundaktivität der nicht-induzierten Proben dargestellt. Dabei zeigt sich ein Anstieg der Luciferase-Genexpression bis 48 h mit einem anschließenden Abfall bis zu 168 h. Dieser zeitabhängige Verlauf ist auf die Eliminierung des transient eingebrachten

Plasmids pTRE2hyg Luc zurückzuführen. Berechnet man den Grad der Induktion des Tet-On Systems mit folgender Formel:

$$x\text{-fache Induktion} = + \text{Dox RLU} / - \text{Dox RLU}$$

so ist die Zeitabhängigkeit weniger stark ausgeprägt, da durch den Quotient die Werte der Luciferase-Aktivität für jeden Zeitpunkt gegen die Negativkontrolle (ohne Dox) normalisiert werden. Bis 72 h zeigt sich eine ca. 2fache Induktion der Luciferase-Genexpression mit einem Maximum von 2,2fach nach 48 h Induktion.

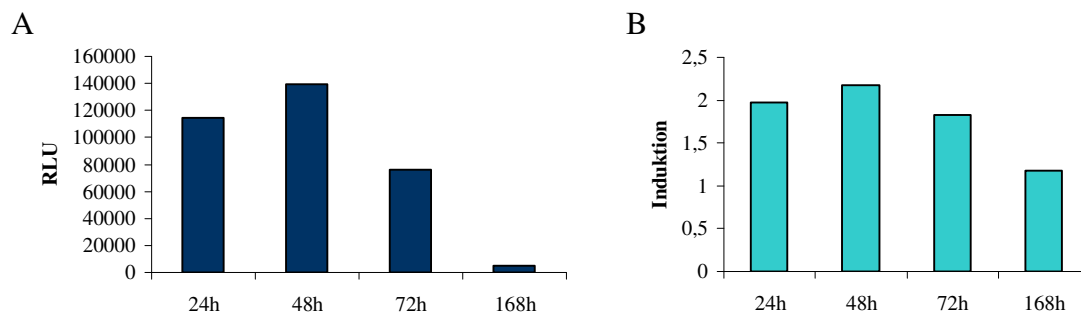


Abb. 3.18. Ergebnisse des Luciferase Assays von MCF-7+ pTRE-Luc  
 (A) absolute Werte der Luciferase-Aktivität  
 (B) Grad der Induktion

Diese Ergebnisse bestätigen die Funktionalität des Tet-On Systems in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Osteosarkomzelllinie U2-OS Luc Tet-On ist die Induzierbarkeit in diesem System deutlich geringer (500fach vs. 2fach). Aus diesem Grund wurde in weiteren Experimenten eine Doxycyclin-Konzentration von 2 µg/ml für die Induktion genutzt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die MCF-7 Zellen nur transient transfiziert wurden und die Funktionalität des Tet-Systems abhängig vom Zelltyp und dem eingebrachten Gen ist. Bei der Kontrollzelllinie U2-OS Luc Tet-On handelt es sich um ein gut etabliertes und studiertes Zellsystem, dass als Kontroll- und Modellsystem genutzt wurde. Ein Vergleich mit dem experimentellen System in der vorliegenden Arbeit ist daher nur begrenzt möglich und die bisherigen Ergebnisse zeigen deutlich wie diffizil ein induzierbares Expressionssystem ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl der konstruierte BMP-2 Vektor (pTRE2hyg + BMP-2) als auch die MCF-7 Tet-On Zellen die volle Funktion für die Anwendung im Tet-On System erfüllen. Im folgenden Schritt wurden diese beiden Komponenten zusammengeführt und getestet. In Analogie zu der Testung mit U2-OS Luc Tet-On wurde der Vektor pTRE2hyg +BMP-2 transient in die MCF-7 Tet-On eingebracht und

induzierte und nicht-induzierte Proben zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion gewonnen. Die RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit dieser eine beta-Aktin und BMP-2 spezifische PCR durchgeführt. Die Banden der beta-Aktin-PCR zeigen für alle Proben eine nahezu gleichmäßige Menge dieses Genproduktes und dienen als Kontrolle (Abb. 3.19.). Bei der BMP-2 spezifischen PCR sind die Banden bei allen induzierten Proben höher im Vergleich zu den nicht-induzierten Proben für den jeweiligen Zeitpunkt. Dabei zeigt sich der deutlichste Unterschied nach 48 h Induktion. Diese Ergebnisse werden durch die semiquantitative Auswertung bestätigt (Abb. 3.20.).

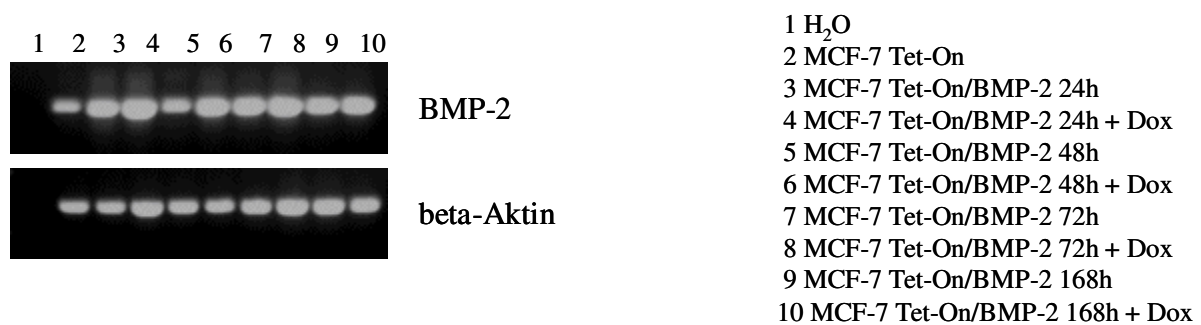


Abb. 3.19. Bilder der Agarosegelelektrophoresen der durchgeführten rt-PCRs mit den transient transfizierten MCF-7 Tet-On

Die Stärke der Banden deutet auf eine Sättigung der PCR-Reaktion hin und erschwert mitunter die genaue Interpretation der Ergebnisse, z.B. bei den Proben nach 72 h und 168 h Induktion. Bei dem Vergleich der untransfizierten MCF-7 Tet-On mit den nicht-induzierten transfizierten Zellen zeigte sich bereits ein Anstieg der BMP-2 Expression.

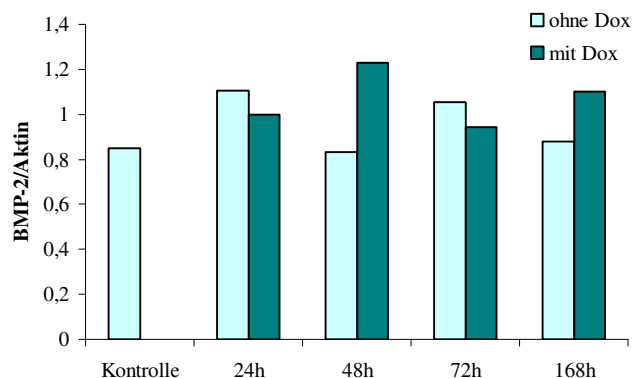


Abb. 3.20. Semiquantitative Auswertung der PCR-Reaktion der BMP-2 transfizierten MCF-7 Tet-On mit AIDA; BMP-2 Expression normalisiert gegen die Aktin-Expression für nicht-induzierte (ohne Dox) und induzierte (mit Dox) Proben und eine untransfizierte Kontrolle

Das deutet zum Einen auf eine Hintergrundexpression im nicht-induzierten System hin, und zum Anderen kann es infolge der Transfektion per se zu einer Hochregulation des BMP-2 gekommen sein, da bei der durchgeführten PCR nicht zwischen genomischen und vektorkodierten BMP-2 unterschieden werden kann. Diese Ergebnisse bestätigen die Funktionalität des Tet-Systems in den MCF-7 Tet-On Zellen und dem konstruierten pTRE2hyg + BMP-2 Vektor. Im nächsten Schritt erfolgte die Etablierung einer stabil mit pTRE2hyg + BMP-2 transfizierten MCF-7 Tet-On Zelllinie.

### 3.2.4. Stabile Transfektion

Für die genauere Untersuchung der zeitabhängigen Wirkung von BMP-2 war es notwendig, eine stabil transfizierte MCF-7 Tet-On Zelllinie herzustellen. Dazu wurde im ersten Schritt die Transfektionseffizienz für eine stabile Genexpression bestimmt. In Analogie zur transienten Transfektion wurden die Zellen mit einem eGFP Vektor unter Verwendung des Transfektionsprogramms für hohe Effizienz und Langzeitexpression transfiziert. Die Effektivität wurde wiederum mikroskopisch bestimmt (Abb. 3.21.).

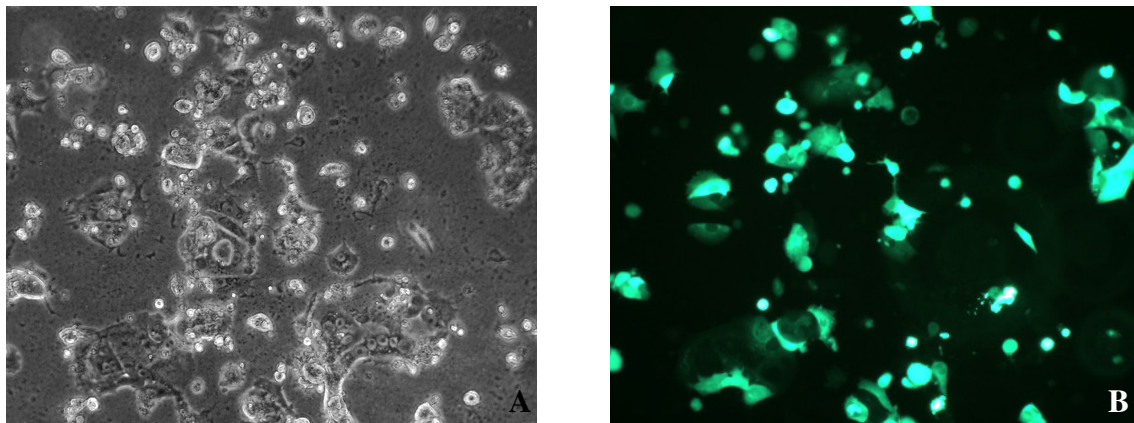


Abb. 3.21. Bilder der stabilen Transfektion von MCF-7 Tet-On mit eGFP  
(A) Phasenkontrastaufnahme, (B) Fluoreszenzaufnahme, 40x

Der Vergleich der Phasenkontrast- und der Fluoreszenzaufnahme ergibt eine Transfektionseffizienz von circa 70%, wobei die Zellmortalität nach der stabilen Transfektion deutlich höher war als bei der transienten. Die bereits beobachteten Veränderungen der Zellmorphologie wurden abermals beobachtet.

Die Nukleofektion kann auch für die Etablierung stabiler Klone in den MCF-7 Tet-On Zellen mit hinreichender Effizienz verwendet werden. Im nächsten Schritt wurden der Kontrollvektor pTRE2hyg und der konstruierte Vektor pTRE2hyg + BMP-2 in die Zellen stabil eingebracht. Eine Probe ohne Zugabe von DNA wurde als Negativkontrolle ebenfalls

transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die verschiedenen Ansätze mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden unter ständiger mikroskopischer Kontrolle für 10 Tage kultiviert, um sich von der Transfektion zu regenerieren. In Abb. 3.22. sind Phasenkontrastaufnahmen der verschiedenen Transfektionsansätze dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass alle Zellen eine zelluntypische Morphologie aufweisen. Die Zellen zeigen vermehrte Filopodienbildung und das Zytoplasma weist eine starke Granularität auf. Da dieses Phänomen sowohl bei den vektortransfizierten Zellen als auch bei der Negativkontrolle auftritt, lassen sich diese morphologischen Veränderungen ausschließlich auf die Transfektionsprozedur zurückführen. Eine Toxizität der eingebrachten Vektoren kann somit weitgehend ausgeschlossen werden. Ab dem 10. Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit 100 µg/ml Hygromycin weiterkultiviert, um stabil transfizierte Klone zu selektionieren.

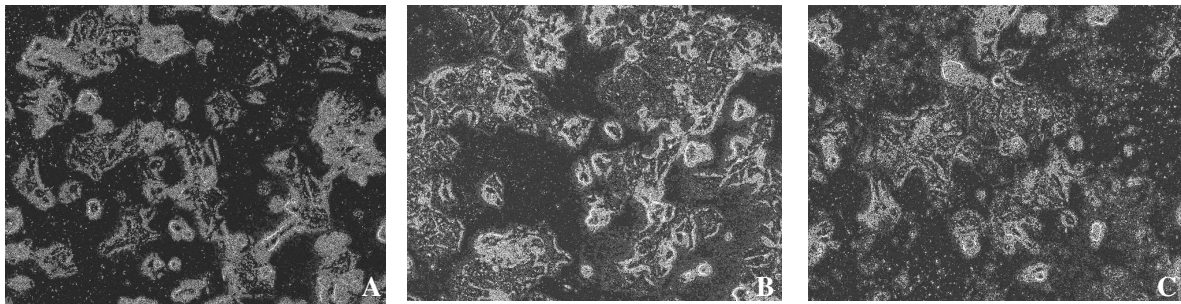


Abb. 3.22. Morphologie der MCF-7 Tet-on Zellen nach der Transfektion, 40x  
 (A) Negativkontrolle (ohne DNA) (B) pTRE2hyg (C) pTRE2hyg + BMP-2

Dabei war zuerst das Einsetzen eines massiven Zelltodes zu beobachten. Die Zellen wurden regelmäßig mikroskopisch kontrolliert und die toten Zellen mittels Waschen mit PBS entfernt. Nach circa 2 Wochen bildeten die Zellen, welche das Plasmid stabil integriert hatten, einzelne Kolonien aus (Abb. 3.23.A). Diese wurden weiterkultiviert bis eine ausreichende Zellzahl vorhanden war. Anschließend wurden die Zellen mit einer Konzentration von 1,5 Zellen pro well unter Selektionsbedingungen in 96 well-Platten ausgesät, um einzelne Klone zu isolieren. Nach dreiwöchiger Kultivierung wurden die 96 well-Platten unter dem Mikroskop nach gewachsenen Kolonien durchsucht. Große, gesunde Kolonien (siehe Abb. 2.23.B) wurden in eine 48 well-Platte überführt und durch sukzessives Umsetzen in das nächstgrößere well-Format angezüchtet. Abb. 3.23.C zeigt einen der circa 100 isolierten stabil transfizierten Klone. Die MCF-7 Tet-On + pTRE2hyg + BMP-2 Zellen weisen wieder eine zelltypspezifische Morphologie ohne stark granuläres Plasma und Filopodien auf.



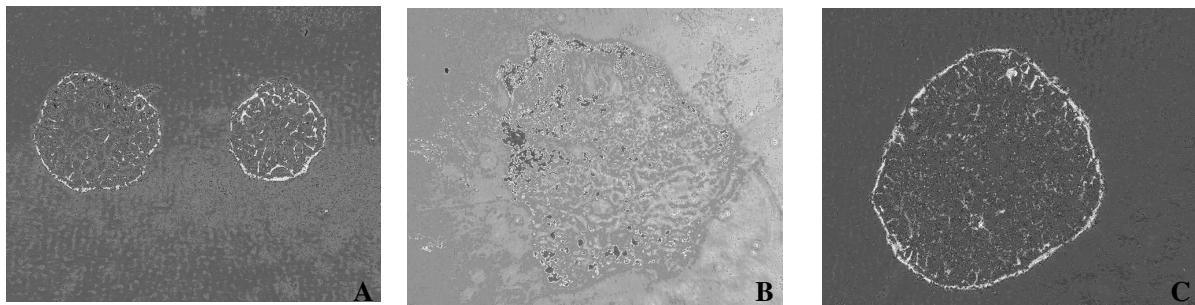


Abb. 3.23. Phasenkontrastaufnahmen während der Etablierung stabiler Klone, 40x  
 (A) heranwachsende Klone unter Selektionsdruck  
 (B) Morphologie eines Klones im 96-well Format  
 (C) etablierter Klon

Von den verschiedenen Klonen wurden induzierte und nicht-induzierte Proben generiert und in Analogie zu den transient transfizierten Zellen mittels rt-PCR analysiert. Dabei diente beta-Aktin wiederum als interne Kontrolle und BMP-2 wurde für die Ermittlung induzierbarer Klone genutzt. Es wurden stabile Klone, die eine Erhöhung der Genexpression von BMP-2 zeigten, für weitergehende Untersuchungen ausgewählt. In Abb. 3.24. sind die Ergebnisse der rt-PCR für zehn Klone exemplarisch dargestellt. Die Banden der beta-Aktin PCR weisen für alle Proben eine gleichmäßige Intensität auf, daraus kann man auf die gleiche Quantität und Qualität der eingesetzten cDNA schließen. Die Evaluierung von induzierbaren Klonen erfolgte durch den Vergleich der BMP-2 Banden der induzierten und nicht-induzierten Proben des jeweiligen Klones.

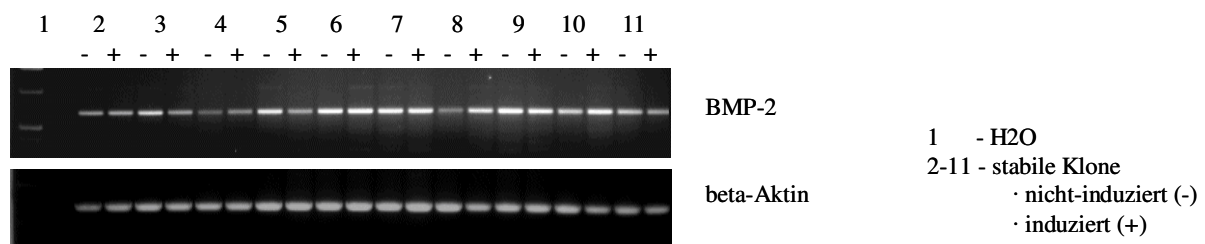


Abb. 3.24. Bilder der Agarosegelelektrophorese der durchgeführten PCRs zur Analyse der stabilen Klone

Bei den in Abb. 3.24. dargestellten Ergebnissen, konnte bei den Klonen 8 und 10 eine Hochregulation der BMP-2 Expression detektiert werden. So identifizierte Zellklone wurden anschließend quantitativ mittels realtime-PCR analysiert. Von den circa 100 untersuchten Klonen konnte bei 20 eine Induzierbarkeit der BMP-2 Expression durch das Tet-System detektiert werden. Da sich bei der rt-PCR in einigen Fällen nur geringe Unterschiede zeigten, wurden die ausgewählten Klone quantitativ mittels realtime-PCR genauer untersucht. In Analogie zur rt-PCR wurden bei der realtime-PCR beta-Aktin und BMP-2 bestimmt. Die

quantitative Auswertung erfolgte anhand der Ct-Werte, welche die Zyklenzahl angeben, bei der die Fluoreszenz und somit die Menge des amplifizierten Gens erstmals signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz überschreitet. Gleichzeitig markiert der Ct-Wert den Eintritt in die exponentielle Phase der Amplifikation, in der eine Quantifizierung möglich ist. Die Ct-Werte der BMP-2 spezifischen realtime-PCR wurden gegen beta-Aktin normalisiert, um die verschiedenen Ansätze vergleichbar zu machen. Die berechneten Quotienten dienen der Ermittlung von induzierbaren Klonen. Die so ausgewerteten Daten sind exemplarisch in Abb. 3.25. graphisch dargestellt. Bei Klon K21(I) konnte keine Veränderung der BMP-2 Expression zwischen induzierter und nicht-induzierter Probe festgestellt werden. Für die Klone K29 und K37 wurde ein geringerer Quotient für die induzierte Probe ermittelt, was gegen eine Induzierbarkeit der BMP-2 Expression in diesen Zellen spricht. Die Klone K7 und K26 hingegen zeigten eine höhere BMP-2 Expression in den induzierten Proben im Vergleich zu den nicht-induzierten, was sich durch eine Erhöhung des beta-Aktin/BMP-2 Quotienten ausdrückt. Bei diesen beiden Zellklonen kann von einer Induzierbarkeit der BMP-2 Expression durch das Tet-System ausgegangen werden.

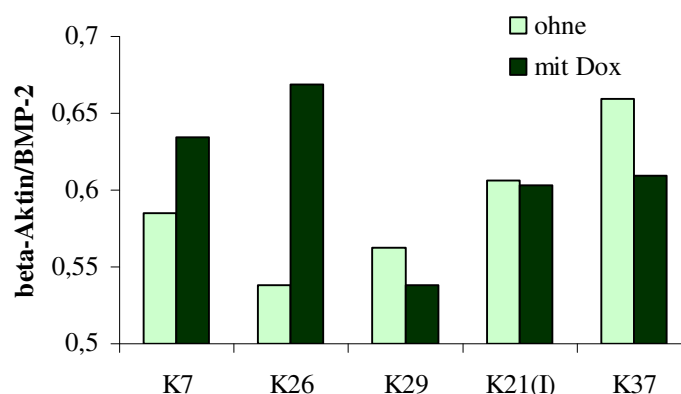


Abb. 3.25. Auswertung der Ergebnisse der realtime-PCR für ausgewählte stabile Klone; BMP-2 Expression normalisiert gegen die Aktin-Expression für nicht-induzierte (ohne Dox) und induzierte (mit Dox) Proben

Dieses Experiment wurde zweimal unabhängig wiederholt und nur Klone, die in beiden Experimenten die gleichen Ergebnisse lieferten, wurden für weitergehende Untersuchungen ausgewählt. Von den circa 100 untersuchten Klonen konnten nach diesen verschiedenen Nachweismethoden fünf Klone (K3, K7, K26, K47 und K64) selektiert werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Tet-System in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mit einer induzierbaren BMP-2 Expression etabliert und hinreichend analysiert werden konnte. Dementsprechend liegen stabil transfizierte Klone für weitere

Untersuchungen vor. Es zeigte sich jedoch, dass die BMP-2 Expression nur geringfügig induzierbar ist. Eine deutlich höhere Induktion konnte mit einer transienten Transfektion erreicht werden, so dass für weitergehende Experimente dieses System eventuell zu bevorzugen ist. Sowohl die transiente als auch die stabile induzierbare Überexpression von BMP-2 konnten etabliert werden und besitzen spezifische Vorteile. Für die Planung nachfolgender Experimente müssen diese berücksichtigt werden und die Auswahl hinsichtlich der jeweiligen experimentellen Fragestellung getroffen werden.

### **3.3. Immunhistochemische Untersuchung der BMP-2 Expression**

Untersuchungen zur Expression von BMP-2 in Mammakarzinomen deuten daraufhin, dass sowohl eine niedrige als auch eine hohe Expression *in vivo* denkbar ist (Raida et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit konnten bereits die verschiedensten Effekte von BMP-2 auf die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 aufgezeigt werden. Zur genauen Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der unterschiedlichen BMP-2 Expression und der mannigfaltigen Veränderungen und deren Einfluss auf die Tumorprogression wurde die Expression von BMP-2 mittels Immunhistochemie in Tumorproben von Mammakarzinompatienten bestimmt. Die vorliegenden Daten und Ergebnisse anderer Untersuchungen deuten auf eine Rolle von BMP-2 in der Tumorigenese hin. Entscheidende Prozesse der Tumorentstehung und –progression wie Migration und Invasivität, Neoangiogenese oder Apoptose konnten als BMP-2 regulierte Prozesse identifiziert werden (Clement et al., 2000, Clement et al., 2005, Raida et al., 2005). Bei diesen Untersuchungen wiesen die Zellen zumeist kontinuierlich hohe Level von BMP-2 auf wohingegen Tumorproben eine große Varianz in der Expressionsstärke des BMP-2 zeigten. Die Bedeutung der unterschiedlichen BMP-2 Menge in Mammakarzinomen und ein möglicher Zusammenhang mit Prognose und Tumorprogression sollte in der vorliegenden Arbeit eingehend studiert werden.

#### **3.3.1. Etablierung der BMP-2 Immunhistochemie**

Im ersten Schritt erfolgte die Testung und Optimierung der BMP-2 spezifischen Immunhistochemie. Dazu wurden 52 Mammakarzinome untersucht, bei denen es sich um OP-Resektate aus den Jahren 1996 und 1997 handelt. Das unselektierte Patientengut stammte aus Routineuntersuchungen des Institutes für Pathologie in Bad Berka. An diesem Probenmaterial wurde zum einen die Methode (siehe 2.5.1.) für den BMP-2 spezifischen Antikörper (N-14, sc-6895, Santa-Cruz) optimiert und zum anderen die immunhistochemische Färbung und Verteilung

von BMP-2 studiert. Die BMP-2 Expression konnte in paraffineingebettetem Tumormaterial mit der Avidin-Biotin-Komplex Methode nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich BMP-2 als zytoplasmatische Braunfärbung in den Zellen. Die Zellkerne wurden durch Gegenfärbung mit Hämalaun sichtbar gemacht.

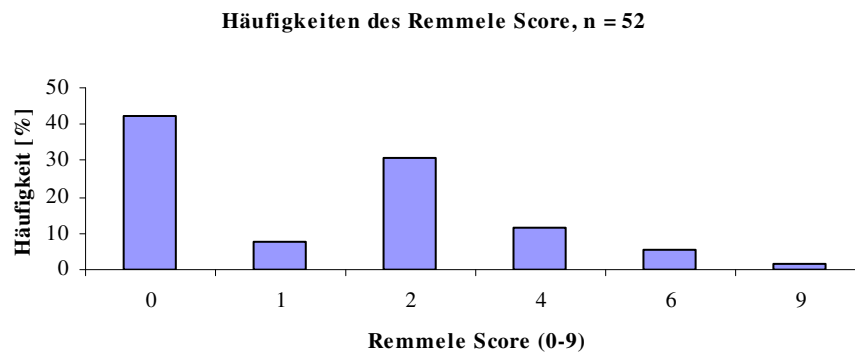


Abb. 3.26. Häufigkeiten der BMP-2 Expression auf Grundlage des Remmele Scores

Von den 52 untersuchten Proben wiesen 30 (58%) eine positive Immunreaktivität bezüglich BMP-2 auf. Betrachtet man die Stärke der Immunreaktivität anhand der Verteilung des Remmele Scores (Abb. 3.26.), so zeigt sich, dass 38,5% der Proben eine schwache Färbung zeigen (Remmele Score 1-2) und 19,2% eine mäßige bis starke (Remmele Score 4-9). Bewertet man nur die Gruppe der BMP-2 positiven Proben, so weisen zwei Drittel nur eine schwache Immunreaktivität auf. In Abb. 3.27. sind zwei Beispiele der immunhistochemischen BMP-2 Färbung gezeigt. Dabei ist auffällig, dass die BMP-2 spezifische Färbung sehr heterogen ist. Neben negativen Tumorarealen treten schwach gefärbte Bereiche, stark gefärbte Einzelzellen und mäßig bis stark gefärbte Areale auf (Abb. 3.28.).

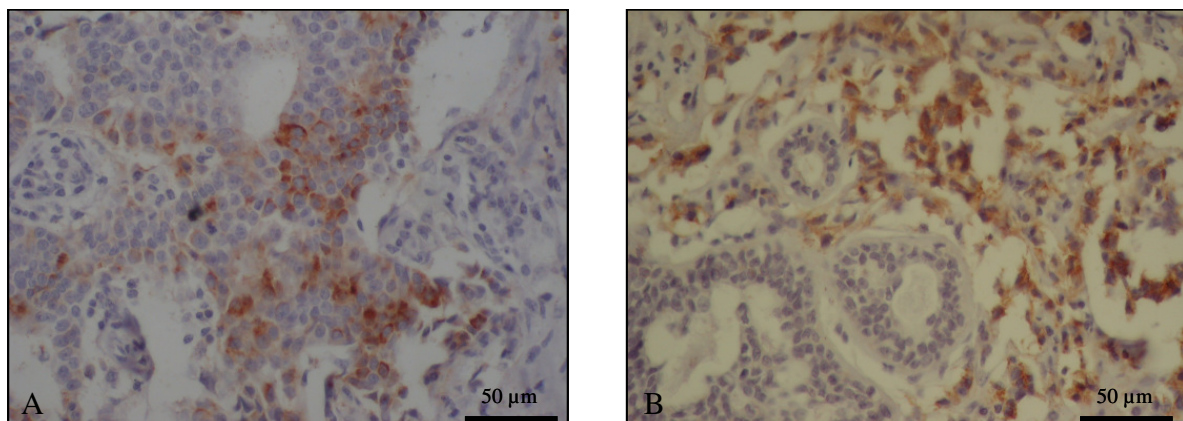


Abb. 3.27. Bilder der BMP-2 Immunhistochemie eines invasiv-duktales Mammakarzinoms einer 70-jährigen Patientin, pT2N1MX, Vergrößerung 60x  
 (A) heterogene Verteilung der BMP-2 Expression  
 (B) mäßige BMP-2 Expression im Tumorareal und negatives Normalgewebe

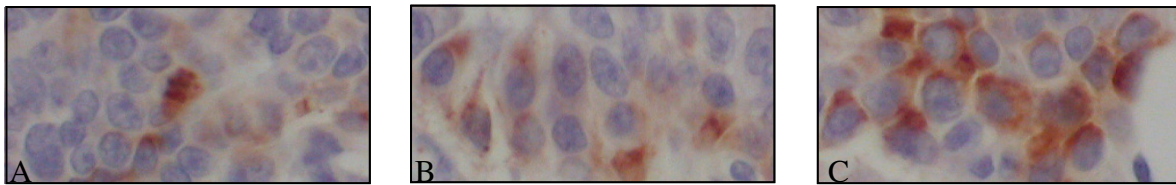


Abb. 3.28. heterogene Verteilung der BMP-2 Immunreaktivität

- (A) stark gefärbte Einzelzelle
- (B) schwach positive Tumorbereiche
- (C) mäßig gefärbte Tumoreale

Des Weiteren ist in Abb. 3.27.B der Unterschied der BMP-2 Expression zwischen Tumor- und Normalgewebe dargestellt. Während das gut differenzierte Normalgewebe negativ bezüglich BMP-2 ist, weisen die schlecht differenzierten Tumoreale eine BMP-2 Immunreaktivität auf.

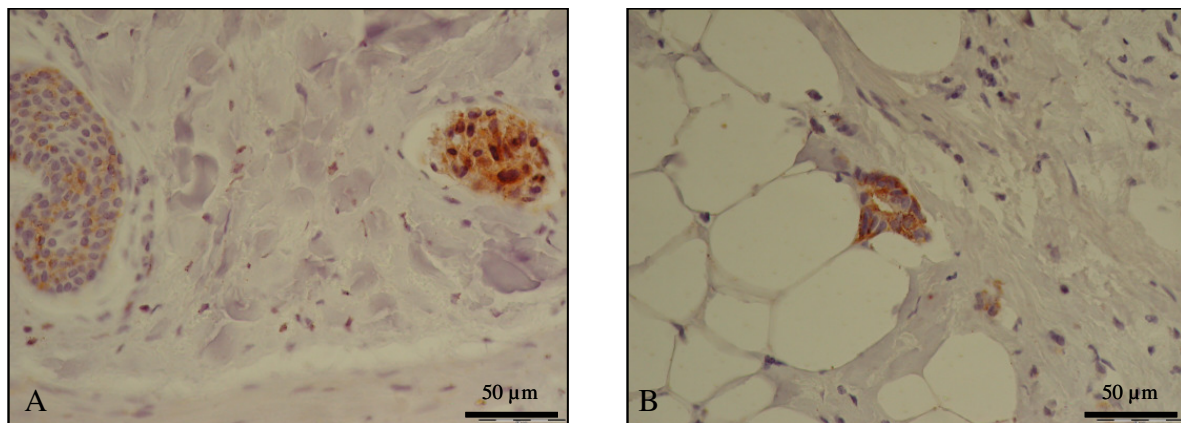


Abb. 3.29. Verteilung der BMP-2 Expression, Vergrößerung 60x

- (A) schwach BMP-2 positive Milchdrüse und mäßig gefärbtes Tumoreal in einem invasiv-duktalem Mammakarzinom einer 57-jährigen Patientin, pT4N2MX
- (B) BMP-2 Immunreaktivität einer Fettgewebismetastase eines invasiv-duktalem Mammakarzinoms einer 70-jährigen Patientin, pT2N1MX

Eine Ausnahme des überwiegend negativen Normalgewebes bilden Milchdrüsen. Diese wiesen eine schwache Immunreaktivität bezüglich BMP-2 auf. Abb. 3.29.A stellt eine solche Drüse und ein stärker positives Tumoreal dar. Des Weiteren zeigten auch Fettgewebismetastasen eine mäßige bis starke BMP-2 Immunreaktivität auf (Abb. 3.29.B).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass BMP-2 im Tumorgewebe der Brust nachweisbar ist. Dabei erscheint die BMP-2 Färbung sehr heterogen und ist zumeist schwach bis mäßig.

### 3.3.2. Multigewebearray „breast prognosis“

Im nächsten Schritt wurde die so etablierte Methode auf ein größeres Patientenkollektiv angewendet, welches in Form eines Multigewebearrays (MTA – multi tissue array) vorlag. Der verwendete MTA „breast prognosis“ beinhaltet 2221 Proben von Brusttumoren mit verschiedenen histo-pathologischen Diagnosen und wurde uns freundlicherweise von der Pathologie in Basel durch G. Sauter und A.Hartmann zur Verfügung gestellt. Die Präparate wurden wie unter 2.5.1. beschrieben gefärbt und mit Hilfe von zwei unabhängigen Pathologen beurteilt und nach dem Remmele-Score bewertet.

#### 3.3.2.1. Das Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv bestand aus 2221 Frauen im Alter von 26 bis 101 Jahren bei Diagnose. Die Altersverteilung, gegliedert in zwölf Gruppen, ist in Abb. 3.30. dargestellt.

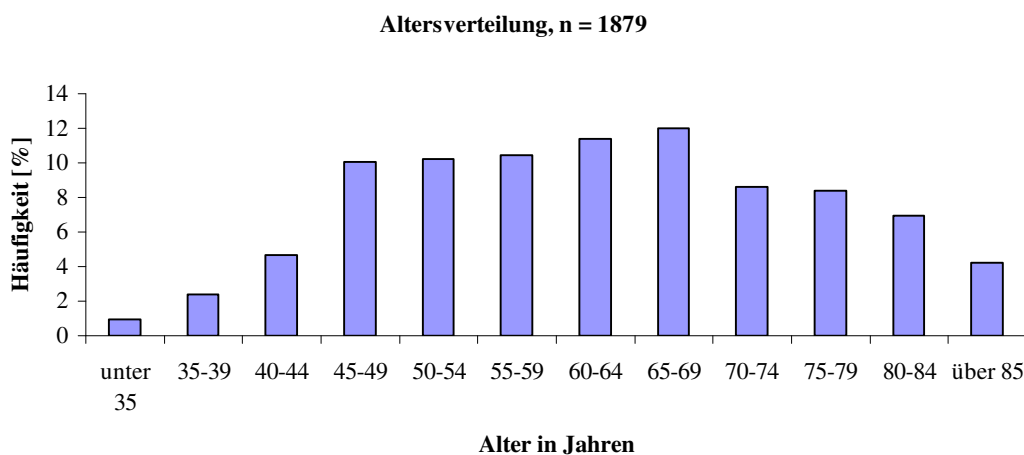


Abb. 3.30. Altersverteilung des Patientenkollektivs

Das mittlere Alter lag bei 62,5 Jahren mit einer Standardabweichung von 13,6 Jahren. Bei 50,1 % der Patientinnen wurde das Mammakarzinom vor dem 64. Lebensjahr diagnostiziert. Die Inzidenz der Erkrankung war vor allem zwischen dem 45. und dem 70. Lebensjahr ausgeprägt. Nimmt man den Beginn der Menopause um das 50. Lebensjahr an, so waren die Mehrzahl der Patientinnen (80%) postmenopausal.

#### 3.3.2.2. Histopathologie und Klassifikation des Mammakarzinoms

Zu den untersuchten Tumorproben lag eine Vielzahl klinisch-pathologischer Parameter vor, die im Folgenden erläutert werden.

Histogenetisch wird das Mammakarzinom in Milchgangs- (duktale Karzinome) und Lappchenkarzinome (lobuläre Karzinome) unterteilt. Des Weiteren gibt es seltenere Formen, wie das medulläre, muzinöse, kribriforme und das tubuläre Mammakarzinom. Die histologische Verteilung des Patientenkollektivs ist in Abb. 3.31. dargestellt. Unter der Kategorie „sonstige“ sind 145 Mammakarzinome mit verschiedensten histologischen Diagnosen wie metaplastisches, papilläres, fettreiches und apokrines Karzinom zusammengefasst. Aufgrund statistischer Gesichtspunkte wurden nur Histologien mit einer Fallzahl über 50 als eigenständige Gruppe betrachtet.

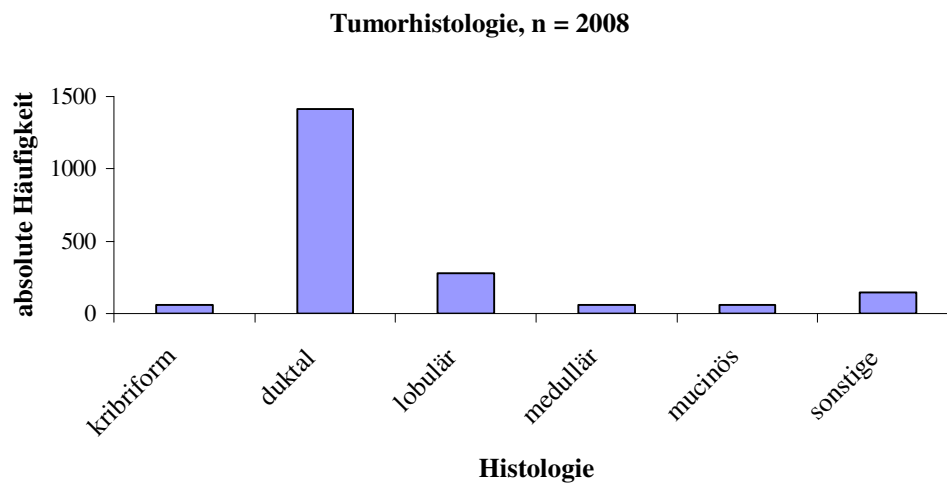


Abb. 3.31. Histologie der Mammakarzinome

Des Weiteren werden die Mammakarzinome histopathologisch in nicht-invasive und invasive Karzinome unterteilt. Zu den nicht-invasiven Karzinomen zählen die Carcinoma in situ (CIS) mit einer Häufigkeit von 15-20%. Auf dieser Grundlage ergibt sich folgende prozentuale Verteilung:

Invasiv-duktale Karzinome	70,3%
Invasiv-lobuläre Karzinome	13,9%
Kribriforme Karzinome	2,9%
Medulläre Karzinome	2,8%
Muzinöses Karzinom	2,9%
Sonstige Histologien	7,2%

Die klassische pathologische Beurteilung der Tumorproben erfolgte anhand der TNM-Klassifikation. Auf Grundlage dieses Systems wird der Tumor hinsichtlich der anatomischen Ausbreitung mit den Komponenten Primartumorgroe (T), Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M) aufgrund bildgebender und klinischer Methoden beurteilt (Bässler 1998). Die mit dem Präfix p versehene pTNM-Klassifikation kennzeichnet eine Beurteilung des Tumors nach einem operativen Eingriff (p – postoperativ).

An den Tumorresektaten wurde postoperativ die Tumorausdehnung (pT) und der Befall der regionären Lymphknoten (pN) auf Grundlage des pTNM-Systems erfasst. Für 1996 der Proben konnte die Größe des Primärtumors erfasst werden (Abb. 3.32.). 713 Karzinome (35,7%) wurden als pT1 beurteilt. Bei einer weiteren Unterteilung dieser Gruppe, fanden sich 7 pT1a, 97 pT1b und 598 pT1c. Bei 941 Patientinnen wurde eine pT2-Ausdehnung diagnostiziert, was einer relativen Häufigkeit von 47,1% entsprach. 117 Fälle befanden sich im pT3-Stadium (5,9%) und 225 (11,3%) wurden dem pT4-Stadium zugeordnet.

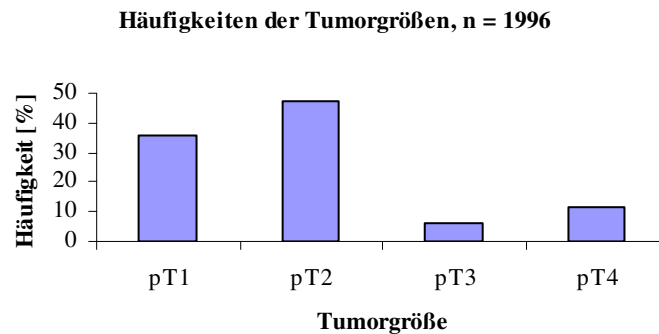


Abb. 3.32. Häufigkeitsverteilung der Tumorgröße nach der pTNM-Klassifikation

Die Untersuchung der regionären Lymphknoten und die daraus resultierende Klassifikation wurde bei 1692 Patientinnen durchgeführt (Abb. 3.33.). Dabei wurden 852 Proben (50,3%) als tumorfrei identifiziert und somit in das pN0-Stadium eingeordnet. 732 der Tumoren (43,3%) bildeten die Gruppe pN1 und 108 (6,4%) wurden dem pN2-Stadium zugeteilt.

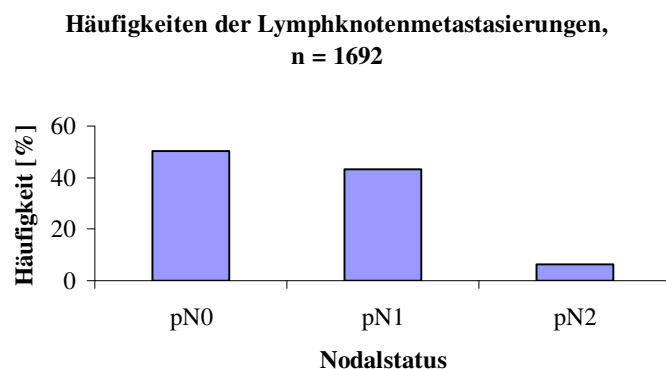


Abb. 3.33. Häufigkeitsverteilung der Lymphknotenmetastasierung nach der pTNM-Klassifikation

Des Weiteren erfolgte eine Differenzierungseinstufung (Grading) des Tumors. Dabei werden Tubulusbildung, Kernpleomorphie und Mitoseraten zur Bildung eines Scores herangezogen. Auf Grundlage dieses Scores erfolgt die Definition und Graduierung des Malignitätsgrades des Tumors (Bässler 1998). Beim Grading der Mammakarzinome ergeben sich auf Basis dieses Systems die Gruppen BRE1 bis BRE3, also von gut über mäßig bis hin zum schlecht



bzw. undifferenzierten Karzinom. Auf Basis des histopathologischen Gradings ergab sich folgende Gruppierung: 482 der Tumoren (26,1%) wurde als BRE1 eingestuft, 603 waren schlecht differenziert und somit BRE3 (32,6%). Die größte Gruppe (762) war mäßig differenziert und wurde als BRE2 eingestuft (Abb. 3.34).

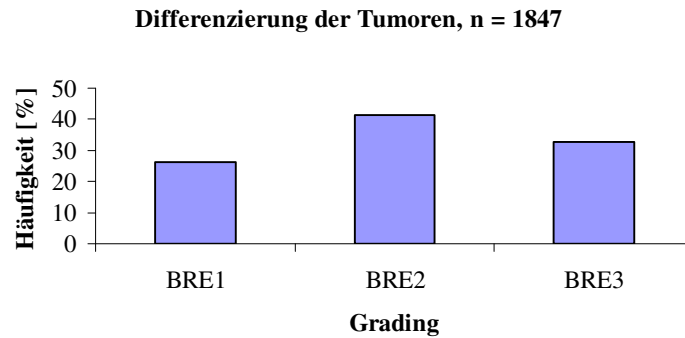


Abb. 3.34. Häufigkeitsverteilung des Gradings

Zusätzlich zu den histopathologischen Parametern wurden routinemäßig der Hormonrezeptorstatus und der Her2/neu-Status immunhistochemisch bestimmt. Der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus wurden nach dem Remmele-Score bewertet, wobei negative Tumoren einen Score von 0-2 aufweisen, schwach und mäßig positive Tumoren werden mit 3-8 bewertet und ein Score von 9-12 für stark positive Tumoren steht.

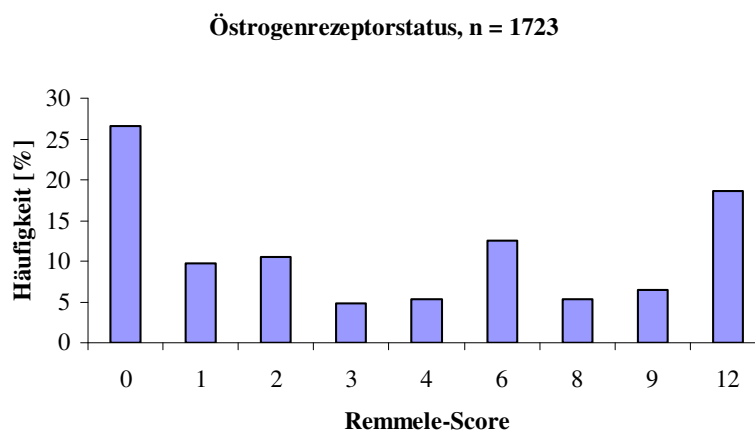


Abb. 3.35. Häufigkeiten der Östrogenrezeptor-Expression anhand des Remmele-Scores

Die Verteilung des Remmele-Scores für den Östrogenrezeptorstatus ist in Abb. 3.35. dargestellt. 459 (26,6%) der Tumoren waren negativ bezüglich des Östrogenrezeptors. Als positiv gelten Tumoren mit einem Remmele-Score größer 9, dies traf auf 431 (25%) der Tumoren zu.

Der Nachweis des Progesteronrezeptors konnte an 1714 Tumoren durchgeführt werden (Abb. 3.36.). Für die Therapieplanung und Prognoseabschätzung ist vor allem des Vorhandensein

des Progesteronrezeptors entscheidend, weniger die Expressionsstärke. In dem untersuchten Patientenkollektiv waren 63,7% der Tumoren negativ bezüglich des Progesteronrezeptors.

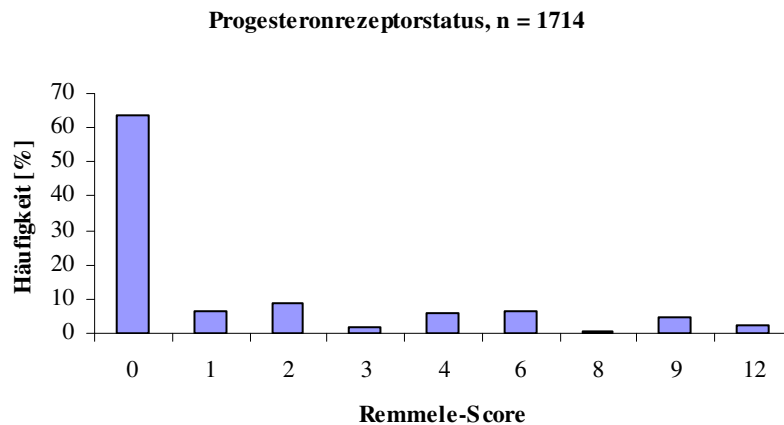


Abb. 3.36. Häufigkeiten der Progesteronrezeptor-Expression anhand des Remmele-Scores

Die Beurteilung des Her2/neu-Status erfolgte auf Grundlage des DAKO-Scores, der von 0 bis 3+ reicht. Negative Tumoren werden mit 0 und 1+ bewertet, mäßig gefärbte Tumoren sind DAKO 2+ und eine starke Färbung wird als DAKO 3+ eingestuft. Eine Bewertung mit 3+ steht für mindestens 10% komplett und stark gefärbte Zellen und ist das Kriterium für eine Antikörpertherapie mit Herceptin®. In dem untersuchten Patientenkollektiv erfüllten 10,7% (200) der Tumoren dieses Kriterium und 1460 (78,3%) der Tumoren waren negativ bezüglich Her2/neu (Abb. 3.37.).

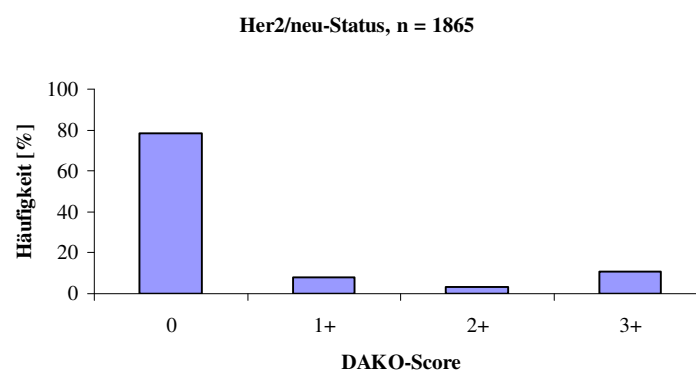


Abb. 3.37. Häufigkeiten der Her2/neu-Expression anhand des DAKO-Score

### 3.3.2.3. Immunhistochemisch bestimmte Parameter

Zusätzlich zu den klassischen histopathologischen und immunhistochemischen Parametern wird kontinuierlich nach neuen Markern gesucht, die eine genauere Klassifikation der Mammakarzinome ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit soll der Zusammenhang von BMP-2 mit klassischen Prognosefaktoren genauer untersucht werden. Um ein Protein auf

seine Eignung als prognostischer Marker zu testen, sind gut charakterisierte Tumoren, große Fallzahlen und validierte Daten notwendig. Diese Voraussetzungen wurden von dem verwendeten Multi-Gewebearray erfüllt und zusätzlich erwies sich der minimale Zeit- und Materialaufwand als wesentlicher Vorteil (Kallioniemi et al., 2001).

Zu dem untersuchten TMA „breast prognosis“ lagen noch weitere immunhistochemische Daten vor, die von den Gruppen um G. Sauter und A. Hartmann generiert wurden. Diese wurden ebenfalls in die Auswertung einbezogen. Bei den getesteten Faktoren handelt es sich um Moleküle, die mit zentralen Prozessen der Tumorigenese wie Apoptose, Proliferation und Zellzyklusregulation in Zusammenhang stehen. Dazu gehört das Cyclin D1, welches eine zentrale Rolle beim G1/S-Phase-Übergang einnimmt sowie die Inhibitoren der cyclin-abhängigen Kinasen (CDKI – cyclin-dependent kinase inhibitors) p16 und p27. Diese beiden Moleküle sind an der Kontrolle des Zellzyklus in der G1-Phase beteiligt. Ein Zusammenhang dieser Regulatoren mit Mammakarzinomen wurde bereits von Wong et al. (2001) beschrieben und aus diesem Grund in die vorliegende Studie einbezogen. Die prognostische Relevanz des anti-apoptotischen bcl2 wurde an kleinen Patientenkollektiven untersucht und ein Zusammenhang mit einer günstigen Prognose hergestellt (Park et al., 2002, Thomadaki et al., 2007). Bezugnehmend auf diese Daten wurde mit dem verwendeten MTA eine größere Patientenkohorte untersucht. Das Ca<sup>2+</sup>-bindende Protein Calretinin wurde in Serumproben von Brustkrebs-Patienten in erhöhten Mengen detektiert (Schwaller et al., 1998) und diese Ergebnisse sollten mit immunhistochemischen Daten korreliert werden. Des Weiteren wurden die Tumorsuppressoren p53 und SFRP1 bestimmt. p53, welches eine Rolle in der G0/G1-Transition spielt, ist in einer Vielzahl von Tumoren mutiert und mit einer schlechten Prognose korreliert (Lacroix et al., 2006). Der lösliche Modulator des Wnt-Signalweges SFRP1 ist in Mammakarzinomen herunterreguliert und mit einer schlechten Prognose assoziiert (Klopocki et al., 2004). Darüber hinaus wurde ein Zusammenhang zwischen dem BMP- und dem Wnt-Signalweg postuliert, der für die Zellhomöostase essentiell ist (Katoh 2007). Eine Störung dieses Signalnetzwerkes führt zu schweren Erkrankungen wie Krebs.

#### **3.3.2.4. Statistische Überprüfung des Patientenkollektivs**

Im ersten Schritt wurde überprüft, ob das Patientenkollektiv eine Normalverteilung aufweist. Dazu wurde die Korrelation von etablierten Prognosefaktoren mit dem Überleben anhand von Kaplan-Meier-Kurven bestimmt.

Das Überleben der untersuchten Patienten korreliert signifikant mit der Größe des Primärtumors: je kleiner der Tumor desto höher ist das Gesamtüberleben (Abb. 3.38.A). Des

Weiteren zeigt das Patientenkollektiv die bereits beschriebenen Korrelationen des Überlebens mit folgenden Faktoren:

- Nodalstatus pN
- Grading
- Her2/neu-Status
- Proliferation

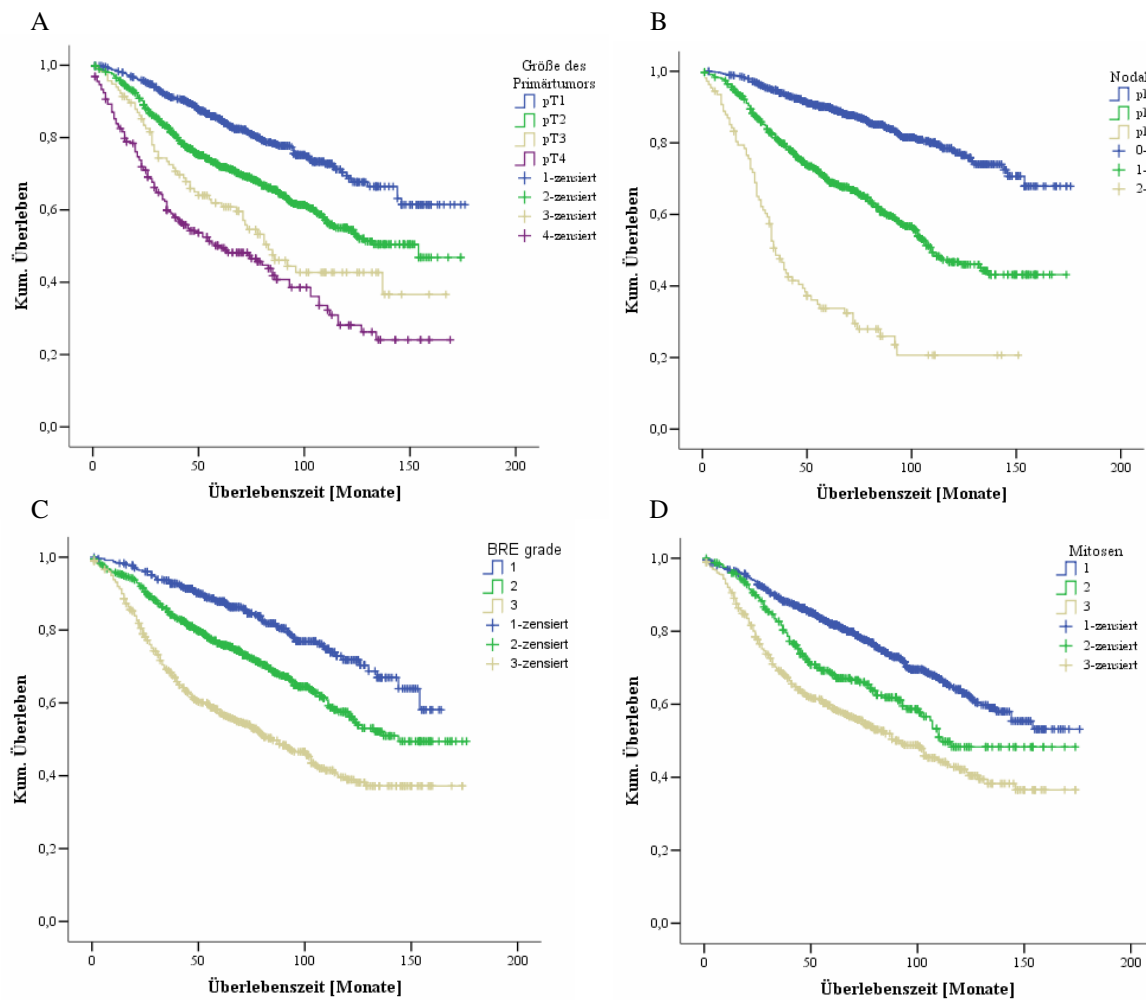


Abb. 3.38. Kaplan-Meier Überlebenskurve in Abhängigkeit etablierter Prognosefaktoren  
 (A) Größe des Primärtumors (pT)      (B) Nodalstatus (pN)  
 (C) Grading      (D) Proliferationsindex (Mitosen)

Mit diesen statistischen Analysen konnte nachgewiesen werden, dass es sich um ein normalverteiltes Patientenkollektiv handelt.

### 3.3.2.5. Häufigkeit und Verteilung der BMP-2 Expression

Der immunhistochemische Nachweis von BMP-2 der Multigewebearrays wurde wie bereits beschrieben (2.5.) durchgeführt. Die erste mikroskopische Begutachtung zeigte eine

Aufteilung der untersuchten Proben in vier Gruppen. Zum einen gab es BMP-2 negative Tumoren und zum Anderen BMP-2 positive, die in Proben mit schwacher, mäßiger und starker Immunreaktivität unterteilt werden konnten (Abb. 3.39.). Insgesamt waren 57% der Tumoren positiv bezüglich BMP-2.

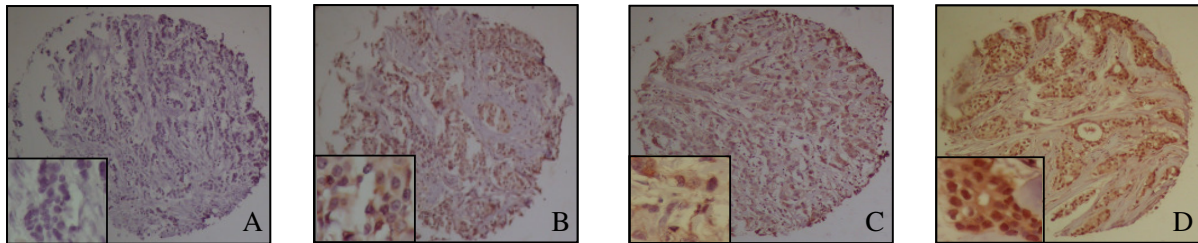


Abb. 3.39. BMP-2 Immunhistochmie der Tumoren auf dem Multigewebearray „breast prognosis“, 20x  
 (A) negativer Tumor  
 (B) schwache BMP-2 Expression  
 (C) mäßige BMP-2 Expression  
 (D) starke BMP-2 Expression

Die BMP-2 spezifische Färbung wurde genauer anhand des Remmele Scores beurteilt. Die Verteilung dieser Bewertung ist in Abb. 3.40. dargestellt. Dabei zeigt sich, dass 38,5% der Proben eine schwache Positivität aufweisen (Remmele Score 1-2) und 19,3% eine mäßige bis starke Immunreaktivität (Remmele Score 3-9).

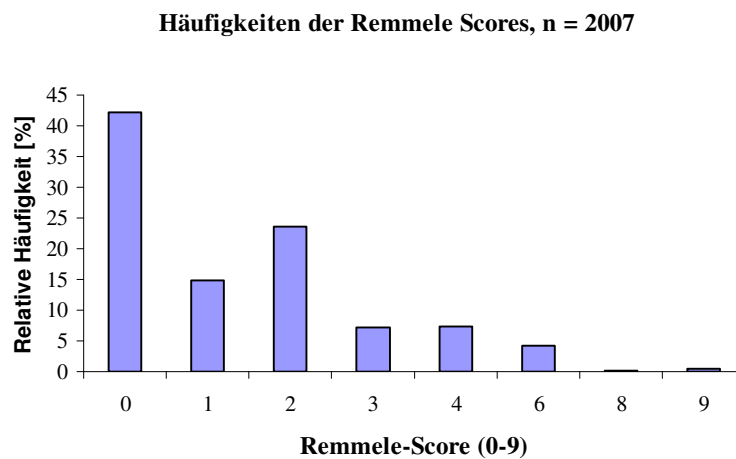


Abb. 3.40. Häufigkeiten der BMP-2 Expression anhand des Remmele Scores

Bei der Betrachtung der BMP-2 positiven Gruppe bilden die schwach positiven Tumoren eine Mehrheit von zwei Dritteln. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits bei dem kleinen Patientenkollektiv beobachtete Verteilung der BMP-2 Immunreaktivität und deuten darauf hin, dass BMP-2 meist nur in geringem Maß exprimiert wird.

### 3.3.2.6. Korrelationen von BMP-2

Der Zusammenhang von BMP-2 mit den einzelnen prognostischen Faktoren wurde mit dem Chi-Quadrat-Test auf signifikante Beziehungen untersucht. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von  $p = 0,05$  definiert, d.h. bei einem Wert von  $p \leq 0,05$  kann ein statistisch signifikanter Zusammenhang angenommen werden. Bei einem signifikanten Test wurde die Korrelation anhand des Spearman-Koeffizienten bestimmt, da die Daten auf einem ordinalen Messniveau beruhen. Dabei wurde eine Korrelation von 0 bis 0,2 als schwach, von 0,21 bis 0,7 als mäßig und von 0,71 bis 1 als stark bezeichnet. Die gleiche Einteilung galt auch für die negative Ausprägung.

Da bisher wenig über die Expression von BMP-2 in Tumoren bekannt ist, wurden die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen unter verschiedenen Gesichtspunkten gruppiert. Zum einen erfolgte eine einfache Einteilung nach positiv und negativ, wobei alle Tumoren mit einem Remmele Score von 0 als negativ gewertet wurden und alle mit einem Score größer 0 als positiv (0 = negativ, 1 = positiv). Zum anderen wurde eine Gruppierung nach dem Remmele Score vorgenommen, die davon ausgeht, dass alle Proben mit einem Score von 0-2 als negativ zu betrachten sind und alle mit einem Score von 3-12 als positiv. Des Weiteren wurde eine Gliederung in negative Tumoren (RS: 0-2) und hochexprimierende (RS: 6-12) vorgenommen. In analoger Weise wurde mit den anderen immunhistochemisch ermittelten Parametern verfahren, so dass die Korrelationsanalysen unter Berücksichtigung des Expressionsniveaus durchgeführt wurden.

In die statistische Auswertung konnten 2007 Fälle einbezogen werden, bei denen eine Beurteilung der BMP-2 Expression möglich war. Dabei zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,031$ ) mit der Größe des Primärtumors (pT), wobei pT1-Stadien einen höheren Anteil an BMP-2 positiven Tumoren aufweisen als pT4-Stadien (Tab. 3.3.).

		BMP-2		Gesamt
		0	1	
pT	1	293	420	713
	4	111	114	225
Gesamt		404	534	938

$$\chi^2 = 4,735, p = 0,031$$

$$r_s = -0,071, p = 0,033$$

Tab. 3.3. Kreuztabelle BMP-2/pT, n = 938

Diese Beziehung konnte auch durch den Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ( $r_s$ ) bestätigt werden, der einer schwach negativen Korrelation entsprach. Dieser Zusammenhang konnte auch bei der Betrachtung aller Tumoren ungleich pT4 gegen alle pT4-Stadien bestätigt werden (siehe Anhang). Im Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2 = 5,390$ ,  $p = 0,022$ ) zeigte sich eine statistisch signifikante, schwach negative Korrelation.

Beim Vergleich von Östrogenrezeptor-negativen Tumoren mit der hochexprimierenden Gruppe besteht eine statistisch hoch-signifikant negative Korrelation zwischen der Expression von BMP-2 und dem Östrogenrezeptorstatus ( $\chi^2 = 11,688$ ,  $p = 0,001$ ). Dieser Zusammenhang kann laut Spearman-Korrelationskoeffizienten als stark negativ bezeichnet werden (Anhang). Die BMP-2 Expression wurde nach dem Remmele Score eingeteilt, da sich bei einer einfachen Ja-/Nein-Einteilung keine Korrelation zeigte. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Tumoren, deren BMP-2 Expression einen bestimmten Schwellenwert ( $RS > 2$ ) überschreitet, signifikant erhöht negativ bezüglich des Östrogenrezeptors sind.

Eine weitere Assoziation besteht zwischen der BMP-2 Expression und dem Grading der Tumoren. Dabei weisen gut differenzierte Tumoren (BRE1) eine statistisch signifikant ( $\chi^2 = 7,268$ ,  $p = 0,026$ ) höhere Zahl an BMP-2 positiven Tumoren auf als schlecht differenzierte Karzinome (BRE3) (Tab. 3.4.).

		BMP-2		Gesamt
		0	1	
Grading	BRE1	193	289	482
	BRE2	311	451	762
	BRE3	284	319	603
Gesamt		788	1059	1847

$\chi^2 = 7,268$ ,  $p = 0,026$

$r_s = -0,057$ ,  $p = 0,014$

Tab. 3.4. Kreuztabelle BMP-2/Grading, n = 1847

Des Weiteren zeigte sich eine hoch-signifikante, schwach negative Korrelation ( $\chi^2 = 13,332$ ,  $p < 0,001$ ,  $r_s = -0,075$ ,  $p < 0,001$ ) mit der Proliferation, die anhand des Mitosestatus abgeschätzt wurde (Tab. 3.5.).

Außerdem gibt es eine Beziehung zwischen BMP-2 und der Histologie des Tumors, die an anderer Stelle genauer erläutert wird (siehe 3.3.2.7.). Mit den klassischen Prognosefaktoren Nodalstatus, Her2/neu- und Progesteronrezeptorstatus zeigte sich kein statistischer Zusammenhang.

		BMP-2		Gesamt
		0	1	
Mitosen	1	394	593	987
	2	131	195	326
	3	263	271	534
Gesamt		788	1059	1847

$\chi^2 = 13,332, p < 0,001$
$r_s = -0,075, p < 0,001$

Tab. 3.5. Kreuztabelle BMP-2/Mitosen, n = 1847

Bei den immunhistochemisch bestimmten weiteren Parametern zeigte sich bis auf Calretinin mit allen eine statistisch signifikante Korrelation, die im Folgenden erläutert wird.

Für Cyclin D1 und p16 zeigte sich ein Zusammenhang mit der BMP-2 Expression bei der Ja-/Nein-Einteilung. Das deutet darauf hin, dass bei diesen Molekülen eher das Vorhandensein als die Stärke der Expression von Bedeutung ist. Für Cyclin D1 zeigte sich eine hoch-signifikante, schwach positive Korrelation ( $\chi^2 = 11,745, p < 0,001, r_s = 0,081, p < 0,001$ ) mit der BMP-2 Expression (Tab. 3.6.).

		BMP-2		Gesamt
		0	1	
Cyclin	0	376	439	815
D1	1	376	610	986
Gesamt		752	1049	1801

$\chi^2 = 11,745, p < 0,001$
$r_s = 0,081, p < 0,001$

Tab. 3.6. Kreuztabelle BMP-2/Cyclin D1, n = 1801

Das Vorhandensein von BMP-2 ist hoch signifikant und schwach positiv ( $\chi^2 = 9,071, p = 0,003, r_s = 0,071, p = 0,003$ ) mit der Existenz von p16 vergesellschaftet (siehe Anhang).

Für Bcl2, p27 und p53 ist die Expressionsstärke für die Korrelation mit BMP-2 entscheidend. BMP-2 positive Tumoren zeigen einen höheren Anteil einer starken Bcl2-Expression. Dabei wird ein Remmele Score größer sechs als Grenze für hochexprimierende Tumoren definiert. Die Beziehung zwischen der hohen Bcl2-Expression und BMP-2 ist statistisch signifikant und schwach positiv korreliert (Tab. 3.7.).

Für die Korrelation von BMP-2 mit p27 zeigte sich die gleiche Assoziation. Eine hohe BMP-2 Expression steht statistisch signifikant ( $\chi^2 = 5,098, p = 0,029, r_s = 0,057, p = 0,024$ ) in Beziehung zu einer hohen p27-Expression (siehe Anhang). Dieser Zusammenhang erscheint



noch deutlicher, wenn man Tumoren mit einem Remmele Score von 0-4 zusammenfasst (p = 0,008).

		BMP-2		Gesamt
		0	1	
bcl2	0-2	145	160	305
	6-12	546	805	1351
Gesamt		691	965	1656

$\chi^2 = 5,197, p = 0,024$

$r_s = 0,056, p = 0,023$

Tab. 3.7. Kreuztabelle BMP-2/Bcl2, n = 1656

Bei einer Einteilung von BMP-2 und p53 in positiv und negativ bezüglich des Remmele Scores zeigt sich eine hoch signifikante, schwach positive Korrelation ( $\chi^2 = 15,787, p < 0,000, r_s = 0,091, p < 0,000$ ). Diese Assoziation bleibt bei einer Einteilung in negative und hochexprimierende Tumoren nach dem Remmele Score bestehen, was auf einen starken Zusammenhang zwischen BMP-2 und p53 hindeutet (siehe Anhang).

Eine weitere statistisch hoch-signifikante Beziehung besteht zwischen BMP-2 und SFRP1, welche sich bei allen beschriebenen Gruppierungen bestätigen lässt. In Tab. 3.8. ist die Korrelationsanalyse von BMP-2 und SFRP1 bei einer Ja-/Nein-Einteilung exemplarisch dargestellt. Der Chi-Quadrat-Test ergab eine hoch-signifikante, schwach positive Beziehung ( $\chi^2 = 18,641, p < 0,000, r_s = 0,100, p < 0,000$ ). Da diese Korrelation bei allen Gruppierungen signifikant war, ist von einem bedeutenden Zusammenhang zwischen BMP-2 und SFRP1 auszugehen.

		BMP-2		Gesamt
		0	1	
SFRP1	0	623	747	1370
	1	172	329	501
Gesamt		795	1076	1871

$\chi^2 = 18,641, p < 0,000$

$r_s = 0,100, p < 0,000$

Tab. 3.8. Kreuztabelle BMP-2/SFRP1, n = 1871

### 3.3.2.7. Überlebensanalyse

Die Überlebenszeitanalyse bezüglich der BMP-2 Expression wurde aufgrund des Vorhandenseins zensierter Daten mit der Kaplan-Meier-Schätzung vorgenommen. Die Prüfung der Signifikanz erfolgte mittels des Log-Rank-Tests.

Aufgrund der bisher gewonnen Erkenntnisse erfolgte eine Einteilung in BMP-2 positive und negative Tumoren. Die Kaplan-Meier zeigte ein höheres Gesamtüberleben von Patienten mit BMP-2 positiven Karzinomen (Abb. 3.41.). Dieser Zusammenhang erwies sich als statistisch signifikant (Log-Rank = 0,001). Des Weiteren ist zu beachten, dass 58% (1160) der Patienten eine BMP-2 Expression aufwiesen und somit eine höhere Überlebenschance haben. Der Beobachtungszeitraum dieses Patientenkollektivs betrug über 14 Jahre.

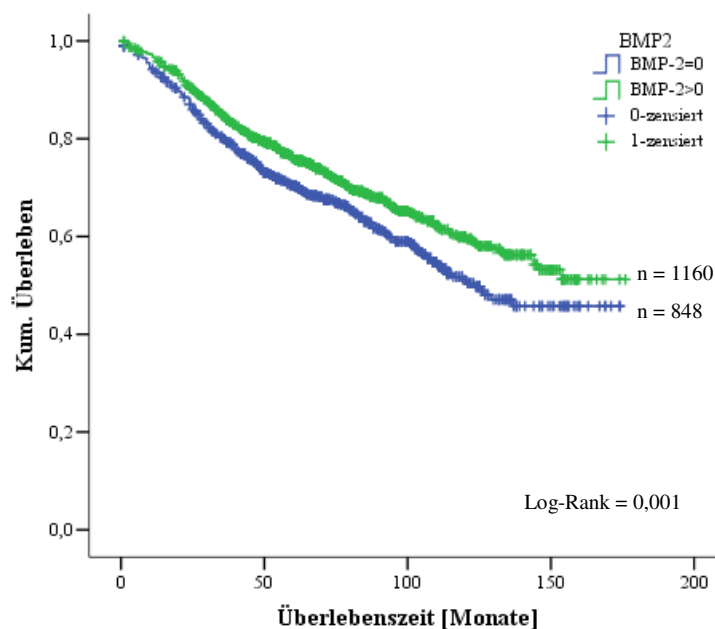


Abb. 3.41. Kaplan-Meier-Überlebensanalyse in Abhängigkeit der BMP-2 Expression

Die 5-Jahres Überlebensrate lag für BMP-2 exprimierende Tumoren bei 78% gegenüber 72,4% bei den negativen Tumoren. Dieser Unterschied erwies sich als statistisch signifikant ( $p = 0,004$ ).

Wie bereits erwähnt, besteht ein Zusammenhang zwischen der BMP-2 Expression und der Histologie des Tumors. Dieser wurde mittels des Chi-Quadrat-Tests ermittelt ( $\chi^2 = 12,235$ ,  $p = 0,032$ ). Da es zwischen den verschiedenen histologischen Diagnosen keine direkte Verbindung gibt, die mit der BMP-2 Expression in Beziehung gesetzt werden könnte, erfolgte eine Gruppierung der Patienten nach der Tumorhistologie. Anschließend wurden für jede

Gruppe Korrelationsanalysen bezüglich BMP-2 und eine Kaplan-Meier-Überlebensanalyse in Abhängigkeit der BMP-2 Expression durchgeführt. Dabei zeigte sich eine Korrelation des Überlebens mit der BMP-2 Expression in Analogie zu der bereits beschriebenen nur für die invasiv-duktales (p = 0,006) und invasiv lobuläres (p = 0,019) Karzinome (Tab. 3.9.A). Unterteilt man die Gruppen weiter nach klinisch-pathologischen Aspekten wie der Tumorgroße pT und dem Nodalstatus pN, so zeigt sich, dass besonders die invasiv-duktales nodal-negativen Tumoren einen Überlebensvorteil aufgrund der BMP-2 Expression haben (Tab. 3.9.B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass BMP-2 ein prognostisch günstiger Marker im nodal-negativen invasiv-duktales Mammakarzinom ist.

A	Kaplan-Meier-Überlebensanalyse
cribriformes Karzinom	-
ductales Karzinom	0,006
lobuläres Karzinom	0,019
medulläres Karzinom	-
mucinöses Karzinom	-
sonstige Histologien	-
alle Histologien	0,001

B	Kaplan-Meier-Überlebensanalyse
pN0	0,021
pN1	-
pN2	-

Tab. 3.9 Zusammenstellung der Kaplan-Meier-Überlebensanalysen bezüglich BMP-2

A – in Abhängigkeit der Histologie

B- nur duktales-invasive Karzinome bezüglich des Nodalstatus

Weitere Gruppierungen nach klinischen Gesichtspunkten zeigten, dass die BMP-2 Expression in allen nodal-negativen Tumoren signifikant mit dem Überleben korreliert ist (p = 0,025). BMP-2 fördert das Überleben in allen Östrogenrezeptor-positiven Tumoren (p = 0,004) und Her2/neu-negative Tumoren (p = 0,001) profitieren ebenfalls von der BMP-2 Expression. Diese Daten deuten daraufhin, dass die BMP-2 Expression in prognostisch günstigen Tumoren einen weiteren Beitrag zum Überleben leistet.

### 3.3.2.8. BMP-2 – ein unabhängiger Prognosefaktor?!

Die Ergebnisse der Kaplan-Meier-Überlebensanalysen legen eine mögliche Rolle von BMP-2 als neuer prognostischer Marker nahe. Die bisher durchgeführten Analysen haben das Überleben nur in Abhängigkeit von einem Parameter (univariat), dem BMP-2, betrachtet. Bei der Ermittlung von unabhängigen prognostischen Faktoren muss daher eine Untersuchung des Überlebens in Abhängigkeit von mehreren Parametern erfolgen. Dies geschieht mittels einer Cox-Regression. Die Reduktion der Variablen erfolgte über eine schrittweise Rückwärts-Prozedur nach der Wald Methode. Aus den Regressionskoeffizienten lassen sich adjustierte

---

Hazard Ratios als Maß für die Stärke des Zusammenhangs berechnen. Diese so genannte multivariate Analyse wurde unter der Berücksichtigung folgender Faktoren durchgeführt:

- Tumorgroße pT
- Nodalstatus pN
- Grading
- Mitosen
- BMP-2

Die Ergebnisse der Cox-Regression sind ausführlich im Anhang dargestellt und werden im Folgenden erläutert. Bei der multivariaten Analyse zeigte sich einzig der Proliferationsindex (Mitosen) als nicht signifikant mit dem Gesamtüberleben korreliert. Alle anderen untersuchten Faktoren leisten einen unabhängigen Beitrag zum Überleben. Das Signifikanzniveau für BMP-2 lag bei 0,039. Anhand der ermittelten Hazard-Ratio ( $\text{Exp}(B)$ ) kann der Beitrag des jeweiligen Faktors zum Gesamtüberleben abgeschätzt werden. Für BMP-2 ergab sich ein Wert von 1,214, was bedeutet, dass die Sterbewahrscheinlichkeit von Patienten mit BMP-2 negativen Tumoren um 21,4% höher ist als bei BMP-2 positiven Tumoren. Das Konfidenzintervall der Hazard-Ratio reicht von 1,010 bis 1,459 und impliziert, dass das Sterberisiko im Einzelfall sogar um 45,9% erhöht ist. Diese Analyse zeigte einen unabhängigen Beitrag von BMP-2 zum Gesamtüberleben unter Berücksichtigung der anderen Faktoren. Besonders zu beachten ist, dass es sich bei den untersuchten Parametern um starke prognostische Faktoren handelt und selbst unter dem Einfluss dieser kann BMP-2 einen zusätzlichen Beitrag zum Überleben leisten. Das bedeutet, dass BMP-2 ein unabhängiger prognostischer Marker für das Mammakarzinom ist.

### **3.3.3. Multitumor-Gewebearray**

Die Rolle von BMP-2 als prognostischer Marker im Mammakarzinom wirft die Frage auf, ob dieser Zusammenhang spezifisch für das Mammakarzinom ist oder BMP-2 auch eine prognostische Bedeutung in anderen Tumorentitäten hat. Um diese Fragestellung zu erklären, wurde ein so genannter Multitumor-Gewebearray verwendet, der Proben verschiedenster Tumorentitäten und korrespondierender Normalgewebe beinhaltet. Der Multitumor-Array 3,I-VII besteht aus 3910 Proben, die sich aus 173 Normalgewebeproben, 3544 Tumorproben und 193 Kontrollen zusammensetzen. Der Array wurde uns freundlicherweise von der Pathologie in Basel durch G. Sauter und A. Hartmann zur Verfügung gestellt. Der Nachweis von BMP-2 erfolgte, wie bereits beschrieben, mittels Immunhistochemie (siehe 2.5.).

Anhand des verwendeten Gewebearrays sollte ein Überblick über die Verteilung der BMP-2 Expression auf verschiedene Gewebe gewonnen werden. Die Auswertung der Immunhistochemien erfolgte mit der Hilfe von zwei unabhängigen Pathologen auf Grundlage des Remmele Scores.

### 3.3.3.1. Quantitative Auswertung der BMP-Expression

Bei der quantitativen Auswertung wurden die Proben in positive und negative eingeteilt, wobei der Remmele Score nicht berücksichtigt wurde. Im ersten Schritt wurde der Prozentsatz positiver Proben im Vergleich zur Gesamtzahl bzw. zur Anzahl der Normalgewebs- bzw. Tumorgewebsproben bestimmt. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Abb. 3.42.A dargestellt. Dabei zeigte sich das 13,8% der Proben positiv bezüglich BMP-2 sind und die Normalgewebsproben (24%) im Vergleich zu den Tumorproben (13,6%) einen signifikant höheren Anteil an Positiven aufweisen. Als nächstes wurde die Verteilung der BMP-Expression auf die verschiedenen Gewebetypen untersucht. Auf dem Gewebearray befinden sich 162 unterschiedliche Gewebe, bestehend aus 30 Normalgeweben. 131 Tumorgeweben und einer Kontrollsektion. Dabei wurden Gewebe mit positiven Proben ins Verhältnis zur Gesamtzahl der Gewebe gesetzt. Daraus ergab sich die in Abb. 3.42.B gezeigte Verteilung. 68,8% der Gewebe waren positiv für BMP-2, wobei die Tumorgewebe (73,3%) im Vergleich zu den Normalgeweben (46,6%) einen höheren Anteil an BMP-2 positiven Geweben aufwiesen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass BMP-2 in Tumorgeweben häufiger exprimiert wird als in den Normalgeweben. Dieser Unterschied erwies als signifikant.

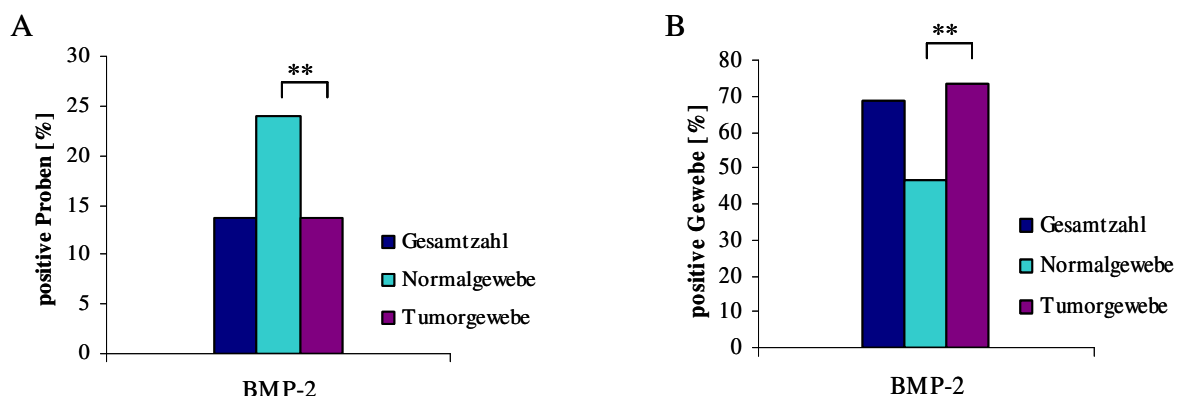


Abb. 3.42. Quantitative Auswertung der BMP-2 Expression bezogen auf die Probenanzahl (A) und auf die Anzahl der Gewebe (B)

Nach dieser globalen Betrachtung der BMP-Expression wurde eine genauere Untersuchung des festgestellten Unterschiedes zwischen Normal- und Tumorgewebe durchgeführt. Auf dem verwendeten Gewebearray fanden sich 23 Tumorentitäten mit korrespondierenden Normalgewebe. Diese wurden mittels des Fisher Exact Tests auf signifikante Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe untersucht. Dabei wurde zum einen eine einfache Einteilung in positive und negative Proben (Ja-/Nein-Einteilung) vorgenommen und zum anderen eine Gruppierung nach dem Remmele Score. Dabei galten alle Proben mit einem RS von 0-2 als negativ und alle mit einem Score größer 3 als positiv. Es zeigte sich, dass nur ca. 30% der Proben einen Remmele Score größer als 3 aufwiesen, was auf eine zumeist schwache bis mäßige Expression von BMP-2 hindeutet. Diese Beobachtung bestätigt die bereits in dem MTA „breast prognosis“ gefundene schwache bis mäßige Expression von BMP-2.

Die Ergebnisse der Signifikanzanalyse (siehe Anhang) der verschiedenen Gruppierungen wurden verglichen und nur signifikante Unterschiede, die sich mit beiden Einteilungen bestätigen ließen, wurden als valide betrachtet. Mit diesem Verfahren konnten Tumorentitäten ermittelt werden, die einen statistisch signifikanten Unterschied positiver Proben zwischen Tumor- und Normalgewebe aufweisen und für eingehende Untersuchungen interessant erscheinen. Im speziellen handelt es sich dabei um Tumoren des Kolon, des Magens, der Leber und des Pankreas.

### 3.3.3.2. Qualitative Auswertung der BMP-Expression

Mit den bisherigen Analysen lassen sich nur Aussagen über das Vorhandensein von BMP-2 treffen, aber es ist keine Beurteilung der Expressionsstärke möglich. Für eine qualitative Auswertung der BMP-Expression wurde der Remmele Score verwendet. Mit diesen Gruppenscores wurde für das jeweilige Gewebe ein Mittelwert mit Standardabweichung als Maß der durchschnittlichen Expressionsstärke des jeweiligen BMPs ermittelt.

<b>Gruppe</b>	<b>Remmele Score</b>
0	0
1	1-2
2	3-6
3	8-12

Tab. 3.10. Gruppierung der BMP-Expression nach dem Remmele Score

Der Vergleich dieser Mittelwerte ermöglicht eine Aussage über die Höhe der BMP-2 Expression im jeweiligen Gewebe. Aufgrund der Auswertung dieser Daten wurde eine

Rangliste der BMP-2 exprimierenden Gewebe erstellt (Abb. 3.42.). Insgesamt zeigte sich, dass die verschiedensten Tumor- und Normalgewebe eine starke BMP-Expression aufwiesen.

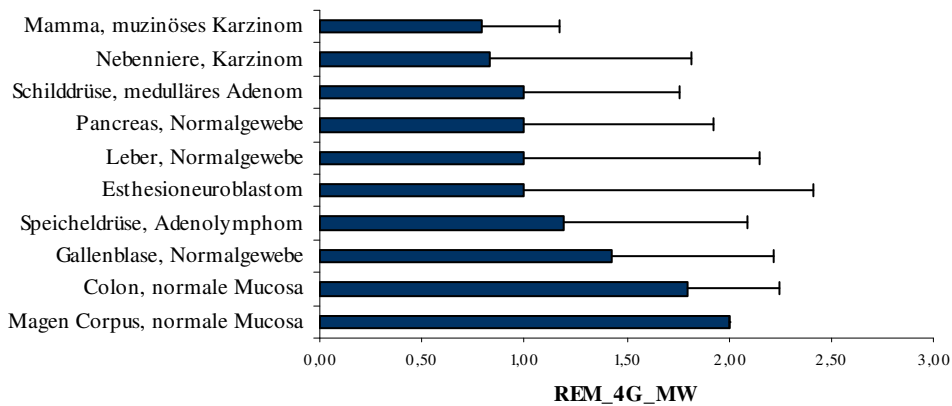


Abb. 3.43. TOP10 der BMP-2 exprimierenden Gewebe

In Anknüpfung an die quantitative Auswertung wurden anschließend die Expressionsstärken zwischen Normal- und Tumorgewebe verglichen. Anhand einer graphischen Auswertung konnte eine Gruppierung vorgenommen werden in Tumorentitäten, bei denen die BMP-2 Expression im Tumor höher ist als im Normalgewebe und Entitäten, bei denen der Tumor eine schwächere Immunreaktivität aufweist (Tab. 3.11.).

Vergleicht man nun diese Ergebnisse mit der quantitativen Auswertung, so kristallisieren sich Tumorentitäten heraus, die sowohl häufig und stark exprimiert werden als auch einen signifikanten Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe aufweisen. Für BMP-2 sind das Kolon, Magen, Leber und Pancreas.

	NG>TG	TG>NG
<b>BMP-2</b>	Cervix Colon Gallenblase Magen Leber Pancreas Penis Prostata	Dünndarm Haut Mundhöhle Niere Oesophagus Ovar Schilddrüse

Tab. 3.11. Vergleich der BMP-2 Expressionsstärke zwischen Tumor- (TG) und Normalgewebe (NG)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mittels des verwendeten Multitumor-Gewebearrays und der durchgeführten Analyse ein Überblick über die Ausprägung und die mögliche Relevanz der BMP-2 Expression in verschiedenen Tumorentitäten gewonnen

werden konnte. Die gewonnenen Erkenntnisse müssen nun im nächsten Schritt an größeren Patientenkollektiven eingehender untersucht und vor allem mit klinischen Daten korreliert werden. Die aus dem MTA „breast prognosis“ gewonnenen Erkenntnisse über die BMP-2 Expression im Mammakarzinom konnten in dem Multitumor-Gewebearray nicht bestätigt werden. Hier zeigte sich eine BMP-2 Expression nur bei 10% der untersuchten Brusttumorproben, wohingegen der Brust-spezifische Gewebearray über 60% BMP-2 positive Proben aufwies. Die Probenzahl und die Verfügbarkeit klinischer Daten sind die limitierenden Faktoren bei der Auswertung des Multitumor-Gewebearrays. Trotz allem konnte ein guter Überblick über die Verteilung von BMP-2 in verschiedenen Geweben gewonnen werden und die Erfahrungen mit dem Brust-spezifischen Gewebearray geben Anlass zu weitergehenden Untersuchungen.

Besonders hervorzuheben ist die Abnahme der BMP-2 Expression mit steigendem Malignitätsgrad im Kolonkarzinom (Abb. 3.43.). Dieser Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke von BMP-2 und der Tumorprogression wurde auch bei anderen Entitäten wie der Cervix und abgeleiteten Tumoren beobachtet. Das Kolon erschien auch nach der quantitativen und qualitativen Analyse als Entität mit signifikantem Unterschied und scheint aus diesem Grund sehr interessant für Untersuchungen zur tumorbiologischen Relevanz von BMP-2.

Eine Beziehung zwischen BMP-2 und dem Malignitätsgrad (Grading) wurde bereits in der vorliegenden Arbeit bei dem Gewebearray „breast prognosis“ gefunden. Es zeigte sich ebenfalls eine signifikante Abnahme der BMP-2 Expression mit fortschreitender Malignität.

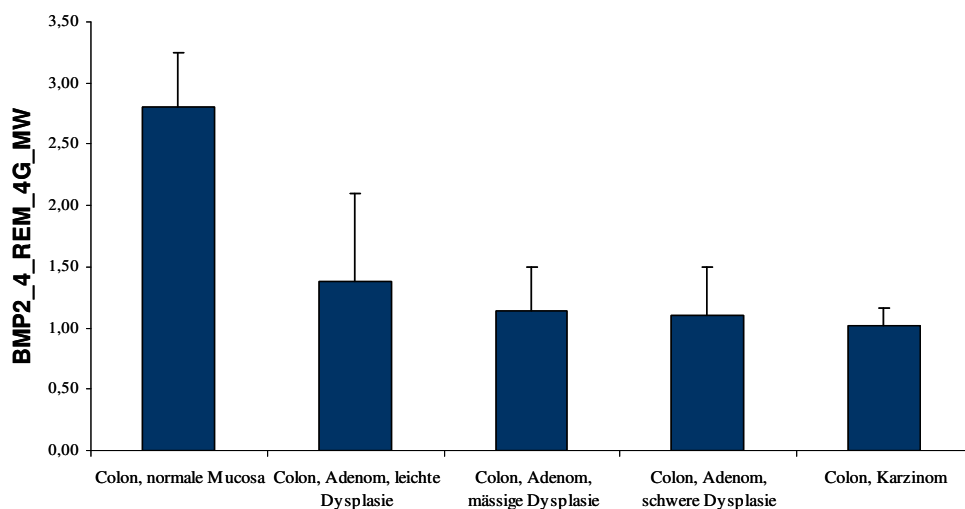


Abb. 3.44. Zusammenhang zwischen der BMP-2 Expressionsstärke und der Tumorprogression



## 4. Diskussion

Die Knochenmorphogenesefaktoren sind in die Steuerung einer Vielzahl komplexer zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Determination, Chemotaxis und Apoptose involviert. Herausragend sind zum einen die Regulation der Knochenbildung und des Knochenstoffwechsels und zum anderen die Rolle der BMPs in der Embryonalentwicklung. Die Tumorinitiation und –progression weisen Gemeinsamkeiten mit der Embryogenese auf und somit ist die Frage nach einer Beteiligung der BMPs an der Tumorigenese nahe liegend. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der tumorbiologischen Relevanz von BMP-2 im Mammakarzinom und baut auf vorangehende Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe auf. So konnte gezeigt werden, dass BMP-2 die Dedifferenzierung von Tumorzellen fördert und gleichzeitig die Migrations- und Invasionsneigung erhöht (Clement et al., 2000, 2005).

BMP-2 beeinflusst weitere Prozesse während der Tumorigenese wie Apoptose, Proliferation und Angiogenese. Dabei sind die bisher publizierten Daten mitunter gegensätzlich. Zum einen gibt es Befunde, die für eine wachstumshemmende Wirkung von BMP-2 sprechen (Ghosh-Choudhury et al., 2000), und zum anderen Daten die auf eine gesteigerte Proliferation des Tumors durch BMP-2 hindeuten (Langenfeld et al., 2003). Eine mögliche Erklärung dieser Divergenz könnte die Abhängigkeit der BMP-2 Wirkung von der Expositionsdauer sein. In *in vitro* Invasions- und Migrationsassays konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der Wirkungsdauer von BMP-2 gleiche Effekte, nämlich eine gesteigerte Migrations- und Invasionsneigung beobachtet werden (Steinert et al., 2005). Die unterschiedlich starke Ausprägung dieser Effekte führte ebenfalls zu der Annahme, dass die zeitliche Komponente einen Einfluss auf die BMP-Wirkung hat. Zur genaueren Untersuchung dieser Fragestellung wurden die Veränderungen infolge einer Kurzzeit- bzw. Langzeitapplikation von BMP-2 in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mittels einer globalen Expressionsanalyse verglichen.

Es wurden jeweils rund 200 differentiell exprimierte Gene infolge einer Kurzzeit- („Inkubation“) bzw. einer Langzeitapplikation („Überexpression“) von BMP-2 gefunden. Ein Vergleich dieser beiden Gruppen zeigte eine Übereinstimmung in nur 1% der veränderten Gene. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in Abhängigkeit von der Expositionsdauer von BMP-2, komplett verschiedene genetische Programme angesprochen werden. Dieser zeitabhängige Effekt insbesondere von BMP-2 und den BMPs generell wurde bereits in der Literatur beschrieben (Clement et al., 1995, Shimasaki et al., 2004). So konnte gezeigt

---

werden, dass die differentielle Spezifizierung von olfaktorischen und Linsenplakoden aus Vorläuferzellen von der BMP-Expositionsdauer abhängig ist (Sjödäl et al., 2007).

Trotz der immensen Unterschiede der veränderten Gene in den beiden Gruppen was die bisher bekannten biologischen Charakteristika angeht, zeigten sich einige Gemeinsamkeiten. Die funktionelle Klassifizierung der differentiell exprimierten Gene ergab eine Übereinstimmung in den betroffenen biologischen Prozessen von 45% zwischen den beiden Gruppen. Diese Daten heben generelle BMP-2 beeinflusste Prozesse unabhängig von der Expositionsdauer hervor. Dabei zeigte sich ein breites Spektrum angesprochener biologischer Prozesse wie Apoptose, Proliferation, Migration, Zellzykluskontrolle, Differenzierung und Morphogenese, die mit bereits beschriebenen Effekten konform gehen (Hogan, 1996). Diese Daten verdeutlichen das breite Spektrum der BMP-Wirkung. Ein Beispiel dafür sind die schon erwähnten *in vitro* Migrations- und Invasionsassays, in denen eine Steigerung der Migrations- und Invasionsneigung der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 sowohl infolge einer Kurzzeit- als auch einer Langzeitapplikation von BMP-2 gezeigt werden konnte (Steinert et al., 2005). Der biologische Prozess „Migration“ befindet sich auch unter den Prozessen der funktionellen Klassifizierung. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl der veränderten Gene zwischen der Gruppe „Inkubation“ und „Überexpression“, jedoch finden sich komplett andere Gene in den jeweiligen Gruppen. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass BMP-2 in der Lage ist verschiedene genetische Programme zu nutzen, um gleiche biologische Veränderungen zu erzielen. Und gleichzeitig liefert es eine mögliche Erklärung für die höheren BMP-2 Mengen, die notwendig sind, um die Migration der BMP-2 über-exprimierenden Zelllinie zu stimulieren (Steinert et al., 2005). Als Ursache für die divergenten BMP-2 Effekte sind kontinuierliche Veränderungen infolge der Expositionsdauer oder unterschiedliche Schwellenwerte für Dauer und Konzentration von BMP-2 denkbar, die zu unterschiedlichen Rezeptorkomplexen, Verteilung von Inhibitoren und Modulatoren und demzufolge zu einer veränderten Signalweiterleitung in der Zelle führen (Tribulo et al., 2003, Liu et al., 2005, Mizutani et al., 2006). Für ein genaueres Verständnis der zeitabhängigen Wirkung von BMP-2, eine Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen und eine Erklärung der beobachteten Effekte sind weitergehende Untersuchungen notwendig. Neben der generellen wurde eine funktionelle Klassifizierung laut Gene Ontology durchgeführt. Dabei wurde die Gesamtheit der nach Gene Ontology annotierten Gene und deren Einordnung in die verschiedenen biologischen Prozesse als „Normalverteilung“ angenommen und in Beziehung gesetzt zu der Verteilung der veränderten Gene in den Gruppen „Inkubation“ und „Überexpression“. Die Signifikanz der so ermittelten Daten wurde mittels Fisher's exact Test

bestimmt. Mit dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass 53% der biologischen Prozesse in einer oder in beiden experimentellen Gruppen im Vergleich zu Gene Ontology überrepräsentiert sind. Dies deutet auf eine Verschiebung der normalen Verteilung biologischer Prozesse hin zu bestimmten biologischen Prozessen. Betrachtet man diese im Detail, so zeigen sich in der Gruppe „Inkubation“ vor allem biologische Prozesse wie Stoffwechsel, die direkt zu Veränderungen in der Zelle führen. Die Überexpression von BMP-2 beeinflusst vorrangig Prozesse, die längerfristig ablaufen wie Entwicklung und Morphogenese. Die Unterschiede der BMP-2 Wirkung in Abhängigkeit von der Expositionsdauer werden somit nicht nur durch die großen Differenzen in den veränderten Genen deutlich, sondern auch auf der Ebene der angesprochenen biologischen Prozesse. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss deshalb immer berücksichtigt werden, dass die veränderten Gene in beiden Gruppen komplett verschieden sind. So sprechen die übereinstimmenden Prozesse für einen generellen Einfluss von BMP-2, aber es kann zum jetzigen Zeitpunkt keine zuverlässige Aussage über die Art und Weise der modulierenden Wirkung von BMP-2 getroffen werden.

Auffallend ist, dass viele der überrepräsentierten biologischen Prozesse eine Beteiligung an der Tumorigenese zeigen, wie Zelladhäsion, zelluläre Entwicklungsprozesse, Tod, Zellzyklus und Zellproliferation.

Die Ergebnisse der Microarray-Analyse wurden mittels realtime-PCR verifiziert. In der Gruppe „Überexpression“ wurden zu diesem Zweck auf Grundlage einer ausführlichen Literaturrecherche eine Auswahl BMP-2 bzw. tumorassoziierter Gene untersucht. Die Microarray- und die realtime-PCR Ergebnisse zeigten eine begrenzte Übereinstimmung. Für CD24, LIF und PPP1R3C konnten die Daten verifiziert werden, während sich bei IGFBP5 und PRKCN die Resultate der verschiedenen Methoden nicht deckten. Diese Divergenz ist unter Berücksichtigung der verschiedenen Nachweismethoden zu betrachten. Die Hochregulation von LIF (leukemia inhibitory factor) infolge einer Langzeitinkubation von BMP-2 konnte mit beiden Methoden bestätigt werden. LIF und BMP-2 wurden bereits als Regulatoren einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen beschrieben und entfalten ihre Wirkung kooperativ und über verschiedene Signalwege (Adachi et al., 2005, Izumi et al., 2006). Dabei zeigte sich eine direkte Verbindung zwischen dem LIF aktivierten ERK1/2-Signalweg und der Aktivierung der Smad-Signalkaskade durch BMP-2 (Izumi et al., 2006). Der synergistische Einfluss von BMP-2 und LIF auf Entwicklungsprozesse scheint auch in der Tumorigenese des Mammakarzinoms eine Rolle zu spielen und untermauert die Ergebnisse der funktionellen Klassifizierung, in der gezeigt werden konnte, dass eine

Langzeitinkubation mit BMP-2 vornehmlich Prozesse wie Entwicklung und Morphogenese beeinflusst.

Die Herunterregulation von PPP1R3C konnte ebenfalls mittels realtime-PCR bestätigt werden. Diese inhibitorische Untereinheit der Proteinphosphatase 1 (PP1) ist in die Regulation zahlreicher zellulärer Funktionen involviert (Doherty et al., 1996). Dabei moduliert es die reversible Proteinphosphorylierung durch PP1 und deren Substratspezifität. Die Veränderungen in der Expression von PPP1R3C und dessen Beteiligung an unterschiedlichen Signalwegen ist eine mögliche Erklärung für die verschiedenen biologischen Prozesse, die infolge einer BMP-2 Überexpression angesprochen werden.

Des Weiteren wurde die Expression von CD24, einem Marker für Tumorstammzellen, genauer untersucht (Ponti et al., 2006). Eine schwache bzw. keine CD24 Expression und gleichzeitig eine hohe CD44 Expression sind mögliche Kennzeichen von Brustkrebs-Stammzellen. Eine Herunterregulation von CD24 konnte in den durchgeführten Experimenten gezeigt werden. CD44 wies eine nicht bestätigte Tendenz zur Hochregulation auf. Der Einfluss von BMPs auf verschiedene Stammzellen mit unterschiedlichen Effekten wurde bereits beschrieben (Varga und Wrana, 2005, Wagner, 2007). Zusätzlich ist das BMP-2 regulierte LIF verantwortlich für die Pluripotenz von Stammzellen. Im Kontext der aktuellen Literatur weisen die Daten der vorliegenden Arbeit auf einen Zusammenhang zwischen BMP-2 und Tumorstammzellen hin.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Microarray-Daten in der Gruppe „Überexpression“ in den meisten Fällen gut reproduzierbar waren. Eine genaue Betrachtung der veränderten Gene liefert spannende Aspekte für eine Erklärung der zugrunde liegenden Mechanismen und viele interessante Ansatzpunkte für weitergehende Untersuchungen. So finden sich eine Vielzahl von Genen, die bereits als tumorassoziiert beschrieben wurden oder eine mögliche Erklärung für die Diversität der BMP-2 Wirkung liefern. MAPK3 (ERK1) und MAPK12 (ERK3), zwei Mitglieder des MAPK-Signalweges, sind solche interessanten Kandidaten. Der MAPK-Signalweg ist in 30% aller Krebsarten verändert und daher von größtem Interesse in der Krebsforschung. Des Weiteren besteht eine modulierende Wirkung des MAPK-Signalweges auf die Signaltransduktion durch BMP-aktivierte Smads (Gazzerro und Canalis, 2006). Die Aktivierung von Smad1 durch den BMP-Signalweg beispielsweise führt zu einer carboxy-terminalen Phosphorylierung eines Serinrestes und einer nukleären Akkumulation wohingegen Erk einen Serinrest in der Linkerregion phosphoryliert und somit die nukleäre Akkumulation und die transkriptionelle Aktivität von Smad1 blockiert

(Kretzschmar et al., 1997). Dieser Zusammenhang könnte ein wichtiger Schlüssel für die Aufklärung der vielfältigen BMP-Wirkung sein.

Das Glykoprotein Clusterin (CLU) vermittelt eine Reihe komplexer Oberflächenerkennungsreaktionen im Menschen und ist an Prozessen wie Entwicklung, Differenzierung und Apoptose beteiligt. Es existieren zwei Isoformen mit teilweise gegensätzlichen biologischen Funktionen: das nukleäre Clusterin (nCLU) wirkt pro-apoptotisch, während das sekretorische Clusterin (sCLU) die Apoptose hemmt (Shannan et al., 2006). Clusterin ist somit in der Lage biologische Prozesse in vielfältiger Weise zu beeinflussen und daher ein weiterer Effektor von BMP-2, der die Diversität der BMP-2 Wirkung erklären kann. Darüber hinaus konnte bereits ein Zusammenhang zwischen Clusterin und Bax, einem veränderten Gen in der Gruppe „Inkubation“, hergestellt werden. Diese Interaktion könnte ein Indiz für den sukzessiven Übergang der beobachteten Effekte nach einer Kurzzeitapplikation hin zu den Veränderungen infolge einer Langzeitapplikation von BMP-2 sein.

Die Verifizierung der Microarray-Daten in der Gruppe „Inkubation“ erfolgte auf Grundlage der funktionellen Klassifizierung. Während sich in der Gruppe „Überexpression“ vorrangig ein Zusammenhang mit dem Zellzyklus zeigte, ist die Gruppe „Inkubation“ vor allem mit der Gene Ontology Annotation „Tod“ assoziiert. Eine detaillierte Betrachtung der biologischen Prozesse, die mit der Annotation „Tod“ verbunden sind, ergibt eine direkte Verbindung mit dem biologischen Prozess Apoptose. Ein Vergleich zwischen Kurzzeit- und Langzeitapplikation von BMP-2 zeigte eine höhere Anzahl Apoptose-assoziiierter Gene in der Gruppe „Inkubation“. Aus diesem Grund wurden die weiteren Untersuchungen auf den biologischen Prozess Apoptose in der Gruppe „Inkubation“ konzentriert und die damit verbundenen Gene mittels realtime-PCR eingehender studiert. Die abnormale Aktivierung der Proliferation und Veränderungen des normalen Zellzyklus wurden für viele Tumorentitäten beschrieben. Darüber hinaus gibt es deutliche Hinweise, dass nicht nur gesteigerte Proliferation ein abnormales Zellwachstum verursacht, sondern auch die Dysregulation der normalen Apoptose zur Immortalisierung von Krebszellen beiträgt (Kaufmann und Gores, 2000). Die anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder beispielsweise sind in einer Vielzahl humaner Krebsarten überexprimiert (Reed, 1998). Nicht nur die Überexpression von Inhibitoren der Apoptose führt zur Aktivierung apoptotischer Signalwege. Eine Herunterregulation und/oder Deletion pro-apoptotischer Gene wie Caspase-9 oder Apaf-1 scheint eine ebenso wichtige Rolle in der Tumorigenese einzunehmen (Soengas et al., 1999). Bei der Interpretation von Veränderungen in den apoptotischen Signalwegen ist zu berücksichtigen, dass es sich um ein

fein abgestimmtes System von Aktivatoren, Inhibitoren und Modulatoren handelt und Abweichungen stets im Gesamtkontext betrachtet werden müssen.

In der vorliegenden Arbeit konnten 18 Apoptose-assoziierte Gene identifiziert werden, die infolge einer Kurzzeitapplikation von BMP-2 differentiell exprimiert wurden. Eine Überprüfung dieser Gene mittels realtime-PCR konnte die Veränderungen von 10 Genen bestätigen. In weitergehenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass mit einer anderen Konzentration von BMP-2 (50 ng/ml) ebenfalls 10 der 18 Apoptose-Gene verifiziert werden konnten, jedoch nicht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei einer Inkubation mit 100 ng/ml BMP-2. Diese Resultate bestätigen auch die Konzentrationsabhängigkeit der BMP-2 Wirkung, wobei sich wiederum die Frage stellt, ob es sich um einen sukzessiven Übergang in Abhängigkeit der Konzentration handelt oder das Über-/Unterschreiten von Schwellenwerten für die divergenten Effekte verantwortlich ist.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist der Zusammenhang der untersuchten Gene zu dem biologischen Prozess Apoptose zu berücksichtigen. Unter den veränderten Genen finden sich solche, die direkt mit dem Apoptose-Signalweg in Verbindung stehen wie Bax, Bag5 und CASP8AP. Eine weitere Gruppe von Genen ist mit Apoptose im weiteren Sinn assoziiert. So steht DOCK1 mit der Beseitigung apoptotischer Zellen im Zusammenhang (Kinchen und Ravichandran, 2007) und ARHT1 spielt eine Rolle in der Regulation der mitochondrialen Homöostase (Fransson et al., 2003). TIA-1 reguliert die Expression von Fas über alternatives Spleißen, wobei die membrangebundene Form von Fas pro-apoptotisch wirkt und die lösliche Form anti-apoptotisch (Förch et al., 2000). Diese Beispiele verdeutlichen die Komplexität des Prozesses Apoptose und die Herausforderungen bei der Interpretation der Ergebnisse. Nur auf Grundlage der Microarray- und realtime-PCR Daten ist eine Aussage über die Art und Weise des Einfluss von BMP-2 auf die Apoptose nicht möglich. Es stellt sich die Frage, ob sich die gefundenen Veränderungen ebenfalls auf der Protein- und Aktivitätsebene niederschlagen und wenn nicht, welche anderen regulatorischen Mechanismen dafür die Ursache sind. So sind alternatives Spleißen, Veränderungen der mRNA-Stabilität, Modulation der Proteinbiosynthese und der Proteinstabilität sowie Variationen in der Aktivität der entsprechenden Moleküle denkbar. Die so gewonnenen Erkenntnisse liefern einen Beitrag zum Verständnis, der durch BMP-2 hervorgerufenen Veränderungen. Des Weiteren ist zu klären, ob es sich bei den beobachteten Effekten um eine direkte oder indirekte BMP-2 Wirkung handelt. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, ob die Expression der Gene durch den BMP-Signalweg moduliert wird oder Downstream-Effektoren von BMP-2 in die Regulation involviert sind. Ein weiterer Aspekt ist die Einteilung der veränderten Gene in pro- und anti-apoptotisch. Für

13 der 18 Apoptose-Gene konnte eine solche Klassifizierung auf Grundlage der Literatur vorgenommen werden. Neun der Gene wurden als pro-apoptotisch eingestuft und für 6 dieser Gene (67%) zeigte sich eine Hochregulation. Drei der vier anti-apoptotischen Gene sind ebenfalls hochreguliert. Diese Ergebnisse besitzen noch nicht genügend Aussagekraft, um eine pro- oder anti-apoptotische Wirkung infolge einer BMP-2 Inkubation abzuschätzen. Auch an diesem Punkt sei nochmals auf die Komplexität der Apoptose und die vielfältigen Regulations- und Modulationsmechanismen verwiesen. Dabei ist besonders die Wertigkeit pro- bzw. anti-apoptotischer Signale zu berücksichtigen, die man in schwache und starke Signale unterteilen kann. So können kleine Abweichungen starker Signale zu dramatischen Veränderungen führen und große Unterschiede in der Expression schwacher Signale neutral bleiben. Aus diesem Grund sind zellbiologische Methoden zur Bestimmung von Apoptose und/oder Proliferation unerlässlich. Eine veränderte Apoptoserate in den BMP-2 inkubierten Zellen konnte nicht nachgewiesen werden (Taubert, 2007) und bedarf weiterer Untersuchungen. Ein Zusammenhang zwischen BMP-2 und Apoptose für MCF-7 wurde bereits dargestellt. Alarmo und Kollegen zeigten, dass BMP-2 nur eine schwache Expression in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 aufweist. Sie vermuteten einen anti-proliferativen respektive einen pro-apoptotischen Effekt von BMP-2, der durch die Herunterregulation in den MCF-7 Zellen kompensiert wird (Alarmo et al., 2007). Weitere Publikationen berichten sowohl von wachstumshemmenden als auch wachstumsfördernden Effekten von BMP-2. Während das Wachstum der Lungenkarzinomzelllinie A549 *in vitro* durch rhBMP-2 gehemmt wird, zeigte sich im *in vivo* Modell eine wachstumsfördernde Wirkung von rhBMP-2 (Langenfeld et al., 2003). Antiproliferative Effekte von rhBMP-2 wurden beispielsweise für humane Myelomazellen, Kolonkarzinome und Medulloblastome beschrieben (Kawamura et al., 2000, Hallahan et al., 2003, Kodach et al., 2007). Dabei zeigt die beobachtete BMP-2 Wirkung eine starke Abhängigkeit vom Zustand und den Charakteristika der verwendeten Zellsysteme sowie von der Rezeptorausstattung, dem Vorhandensein von BMP-Inhibitoren und den angesprochenen intrazellulären Signalwegen (Pouliot et al., 2003, Sneddon et al., 2006, Beck et al., 2006, Deng et al., 2007). Die humane Prostatakrebszelllinie LNCaP beispielsweise zeigt unter dem Einfluss von BMP-2 und in Anwesenheit von Androgen eine gesteigerte BMPR-IB Expression, die zu einer Wachstumsinhibition führt. In Abwesenheit von Androgen jedoch kommt es zu einer Herunterregulation von BMPR-IB, was wiederum zu einer Stimulation des Wachstums führt (Ide et al., 1997). Ähnliche Mechanismen könnten die Ursache für die divergenten Effekte von BMP-2 im Mammakarzinom sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass BMP-2 das hormonunabhängige Tumorwachstum im *Xenograft*-Modell

stimuliert (Clement et al., 2005). Ein weiterer Hinweis auf eine modulierende Wirkung des Hormonstatus im Mammakarzinom auf die BMP-2 Wirkung ist die negative Korrelation zwischen BMP-2 und dem Östrogenrezeptor, der in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. Einige Untersuchungen deuten auf einen primär BMP-2 induzierten Wachstumsstillstand hin, der sowohl zur Apoptose als auch zur Differenzierung der Zellen führen kann (Kawamura et al., 2000, Nakamura et al., 2003). Diese Wirkung wird unter anderem durch eine BMP-2 induzierte Hochregulation von p27, einem Inhibitor des G1/S-Phase Überganges, vermittelt. Dieser Zusammenhang konnte in den Microarray-Experimenten der vorliegenden Arbeit für die Gruppe „Inkubation“ ebenfalls gezeigt werden. Des Weiteren konnte eine positive Korrelation zwischen der BMP-2 und der p27 Expression mittels Immunhistochemie von Tumorproben hergestellt werden. Diese Daten korrespondieren mit der unveränderten Apoptoserate BMP-2 inkubierter MCF-7 und geben einen Hinweis auf die zugrunde liegenden Mechanismen (Taubert, 2007).

Grundsätzlich sind bei der Beurteilung von Microarray-Experimenten die möglichen Fehlerquellen zu berücksichtigen. Angefangen bei der Probenentnahme bis hin zum Prozessieren und Auslesen der Microarray-Daten kann das Versuchsergebnis in Form von Artefakten, falsch positiven oder falsche negativen Genen beeinflusst werden. Um diese Fehlerquellen zu minimieren wurden nur Ergebnisse berücksichtigt, die in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt werden konnten. Des Weiteren wurden nur Gene in weitere Analysen einbezogen, bei denen sich die gleiche Veränderung bei allen Spots, die dieses Gen repräsentieren, bestätigte. Alle Gene, die diese Kriterien erfüllen und eine mindestens zweifache Veränderung aufweisen, wurden für die funktionelle Klassifizierung berücksichtigt. Diese Grenze wurde bewusst gesetzt, da eine Verdopplung/Halbierung der Expression als ausreichende Veränderung erachtet wurde. Eine Erhöhung dieser Begrenzung ist möglicherweise angebracht, um nur die stärksten Alterationen herauszuarbeiten. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass eine differentielle Genexpression nicht zwangsläufig zu Veränderungen auf der Proteinebene führt. Des Weiteren können bereits minimale Abweichungen in der mRNA-Konzentration zu dramatischen Effekten in der Menge und Aktivität des entsprechenden Proteins führen. Die Restriktionen bei der Analyse der Microarray-Daten dienen einem ersten Überblick über die Veränderungen infolge einer Kurzzeit- bzw. Langzeitapplikation von BMP-2. Anhand dieser allgemeinen Betrachtung können weitergehende Untersuchungen gezielt fokussiert werden und deren Ergebnisse wiederum mit den Genen, die aufgrund des Schwellenwertes vorerst nicht berücksichtigt wurden, in Verbindung gesetzt werden. Diese systematische Vorgehensweise ist unerlässlich,



wenn man der enormen, durch einen Microarray produzierten, Datenmenge gerecht werden will.

Bei der vertieften Untersuchung der veränderten Gene infolge einer Kurzzeitgabe von BMP-2 wurde die starke Hochregulation der Interferon-induzierten, dsRNA-aktivierten Proteinkinase PKR herausgearbeitet. PKR wurde ursprünglich als wichtige Komponente der Interferon-stimulierten antiviralen Abwehr identifiziert (Samuel et al., 1997). Des Weiteren vermittelt PKR in Abhängigkeit der nachgeschalteten Signalwege pro- und anti-apoptotische Effekte (Scheuner et al., 2006). Erhöhte Mengen von PKR wurden in verschiedenen Tumorentitäten detektiert und deuten auf eine inverse Beziehung zwischen PKR und der Proliferation hin (Review: Jagus et al., 1999). Die Induktion der Apoptose durch PKR erfolgt durch Translationsinhibition. Die phosphorylierte und somit aktivierte Form von PKR phosphoryliert die  $\alpha$ -Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 2 (eIF2 $\alpha$ ) am Ser<sup>51</sup>. Dadurch wird die Bindung der Initiator-tRNA an die kleine ribosomale Untereinheit verhindert, da eIF2 durch die Hemmung des Guaninnukleotid-Austauschfaktors eIF2B nicht mehr in die aktive, GTP-gebundene Form überführt werden kann und eine Inhibition der Translation herbeigeführt wird (Ron und Walter, 2007).

Die beobachtete Hochregulation der PKR-mRNA zeigte keine adäquate Veränderung auf der Proteinebene. Ursache hierfür kann die bereits erhöhte Proteinmenge von PKR in MCF-7 im Vergleich zu primären Brustzelllinien sein (Savinova et al., 1999). Diese hohen PKR-Level machen eine weitere Erhöhung der Proteinmenge durch eine gesteigerte PKR-Expression unwahrscheinlich. Des Weiteren zeigte PKR in den MCF-7 Zellen nur eine minimale Aktivität und ein schwaches Ansprechen auf eine Induktion durch Interferon (Savinova et al., 1999). Als Ursache dafür wurde das Vorhandensein eines dominanten, intrazellulären Inhibitors postuliert, welcher keine RNA, keine Protease oder Phosphatase ist. In der vorliegenden Arbeit konnte auf der Aktivitätsebene sowohl eine Veränderung des Phosphorylierungsstatus von PKR als auch seines Downstream-Effektors eIF2 $\alpha$  festgestellt werden. Dieser Phosphorylierungseffekt infolge einer BMP-2 Inkubation ist möglicherweise ein noch unbekannter Modulationsmechanismus der PKR-Aktivität. Die zeitversetzte Phosphorylierung von PKR und eIF2 $\alpha$  spricht für eine Aktivierung von eIF2 $\alpha$  durch PKR, kann jedoch auch durch andere intrazelluläre Veränderungen hervorgerufen werden. eIF2 $\alpha$  kann durch vier verschiedenen Kinasen phosphoryliert werden, wobei jede Kinase auf eine andere Stresssituation reagiert (Wek et al., 2006). Die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  als Reaktion auf verschiedene exo- und endogene Stresstimuli wird als ISR (integrated stress response) bezeichnet und ist ein Bestandteil der UPR (unfolded protein response). Unter dem

Begriff UPR werden verschiedene intrazelluläre Signalwege zusammengefasst, die durch ER-Stress ausgelöst werden (Ron und Walter, 2007). Unter ER-Stress versteht man eine Verschiebung des Gleichgewichtes im ER-Lumen hin zu ungefalteten Proteinen, die durch die zellulären Mechanismen nicht mehr bewältigt werden können. Die aktivierte UPR kann zur Eliminierung der Zelle durch Apoptose oder zum Überleben durch Restabilisierung führen. Welche der Stresskinasen für die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  infolge einer Kurzzeitgabe von BMP-2 verantwortlich ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Ebenfalls ist fraglich, ob diese Stressantwort direkt durch BMP-2 aktiviert wird, oder ob BMP-2 modulierend in die UPR eingreift. An dieser Stelle ist anzumerken, dass auch andere differentiell exprimierte Gene in der Gruppe „Inkubation“, die mit Apoptose-assoziiert sind, im Zusammenhang mit der UPR beschrieben wurden. TCTP ist durch die Bildung von Sekundärstrukturen seiner eigenen mRNA an der Aktivierung von PKR beteiligt ist (Bommer et al., 2002) und TIA-1 ist ein downstream-Effektor von eIF2, der in die Bildung von Stress-Granula involviert ist (Anderson und Kedersha, 2002).

Die dramatischen Unterschiede in der Genexpression zwischen der Kurzzeit- und Langzeitapplikation von BMP-2 warfen die Frage auf, ob diese miteinander in Verbindung stehen und eine graduelle Veränderung der Expositionsdauer einen Übergang von dem einen in das andere Extrem bewirkt oder ob bestimmte Schwellenwerte in der Dauer und Konzentration von BMP-2 für die divergenten Effekte verantwortlich sind. Ein für solche Untersuchungen geeignetes System ist eine induzierbare BMP-2 Expression auf Basis des Tet-Systems. In der vorliegenden Arbeit konnte eine MCF-7 Mammakarzinomzelllinie mit einer Tetracyclin-induzierbaren BMP-2 Expression etabliert werden. Dabei wurde sowohl die transiente als auch die stabile Integration des induzierbaren Vektors pTRE2hyg + BMP-2 in MCF-7 und die Kontrollzelllinie U2-OS Luc Tet-On untersucht. In beiden Zellsystemen konnte der Vektor erfolgreich eingebracht werden und eine Induktion der BMP-2 Expression nach Zugabe des Induktors Doxycyclin detektiert werden. Somit konnte die prinzipielle Funktionalität des Tet-Systems nachgewiesen werden. Der Vergleich dieses experimentellen Systems mit der Kontrollzelllinie U2-OS Luc Tet-On und deren Induzierbarkeit zeigte einige Unterschiede auf. So wurde die über 500fache Induktion der Luciferase-Aktivität in den U2-OS Luc Tet-On Zellen für die BMP-2 Expression in den MCF-7 Tet-On nicht erreicht. Zum einen gründet sich diese Diskrepanz auf die verschiedenen Nachweismethoden der Induktion: die Expression der Luciferase wurde mittels eines funktionellen Assays basierend auf der enzymatischen Aktivität der Luciferase bestimmt, während die Induktion der BMP-2 Expression auf mRNA-Ebene ermittelt wurde. Der durchgeführte Luciferase-Assay ist eine

etablierte und gut funktionierende Nachweismethode mit einer hohen Sensitivität, die mit der einer rt-PCR nur schwer vergleichbar ist. Zum anderen deuten die Bilder der Agarosegelelektrophorese der BMP-2 spezifischen PCR darauf hin, dass sich die PCR-Reaktion in der Sättigung befand und die semiquantitative Auswertung durch diesen Fakt limitiert war. Betrachtet man jedoch die Ergebnisse der transienten Transfektion von pTRE2hyg + BMP-2 in die U2-OS Luc Tet-On Zellen so zeigt sich kaum ein Unterschied in der Induzierbarkeit zu dem analogen Experiment mit den MCF-7 Tet-On Zellen. Dieser Befund spricht dafür, dass das Maß der Induzierbarkeit stark abhängig von dem jeweils eingebrachten Gen ist. Darüber hinaus wird die Funktionalität des Tet-Systems vom jeweiligen Zelltyp bestimmt. Dafür sprechen die Ergebnisse der Transfektion von MCF-7 Tet-On mit dem Kontrollvektor pTRE2hyg Luc, bei denen gezeigt werden konnte, dass auch mit dem gut charakterisierten Luciferase-System eine deutlich schwächere Induktion detektierbar ist. Somit ist die nur mäßige Induktion der BMP-2 Expression in den MCF-7 Tet-On Zellen sowohl auf das BMP-2 selbst als auch auf den Zelltyp zurückzuführen. Ein weiteren Anhaltspunkt für die Rolle des BMP-2 bei den aufgetretenen Schwierigkeiten liefert der Befund, dass auch mit Leervektor (pTRE2hyg) transfizierte Zellen eine erhöhte BMP-2 Expression im Vergleich zu den untransfizierten Zellen aufweisen. Besonders stark war dieser Effekt bei der Etablierung stabiler Zellklone und selbst Zellen, die nur als Negativkontrollen (ohne Zugabe von DNA) die Transfektion durchlaufen haben, zeigten eine deutliche Steigerung in der BMP-2 Expression. Dies deutet auf eine Hochregulation des intrinsischen BMP-2 infolge der Transfektionsprozedur hin und legt die Vermutung nahe, dass BMP-2 ein wichtiger Überlebensfaktor für die Zellen ist. Diese Vermutung wird durch andere Untersuchungen gestützt, die die Expression von BMPs mit dem Schutz vor Hitze- oder Hypoxie induzierter Apoptose in Zusammenhang bringen (Raida et al., 2005, Deng et al., 2007). Betrachtet man dieses Ergebnis vor dem Hintergrund der Untersuchungen zur Regulation and Aktivität von PKR und deren Beteiligung an der zellulären Stressantwort, so stellt sich folgende Frage: Wird die intrinsische BMP-2 Expression durch den Transfektionsstress stimuliert und aktiviert BMP-2 wiederum PKR, um eine zelluläre Stressantwort auszulösen?

Möglicherweise führt die Aktivierung der intrinsischen BMP-2 Expression zu einer feedback-Hemmung und die Aktivierung des plasmidkodierten BMP-2 wird dadurch unterdrückt. Bei der Erklärung der nur schwachen Induzierbarkeit ist jedoch nicht nur das BMP-2 selbst und der Zelltyp zu berücksichtigen, sondern auch die Besonderheiten des Tet-Systems. So steht die BMP-2 Expression unter der Kontrolle eines minimalen CMV-Promotors, welcher ein so genannter starker Promotor ist. Möglicherweise ist dieser zu stark und wird durch zelluläre

Mechanismen gehemmt. Diese Vermutung wurde in Gesprächen mit der Firma Clontech bestätigt. Mittlerweile wurde die Promotorregion modifiziert und die dementsprechenden Plasmide werden von der Firma Clontech angeboten.

Die aufgezeigten vielfältigen Einflüsse von BMP-2 auf die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 in Abhängigkeit der Expositionsdauer und die daraus resultierenden Veränderungen tumorassoziierter Prozesse untermauern die tumorbiologische Bedeutung von BMP-2 im Mammakarzinom. Bisher lagen jedoch keine systematischen Untersuchungen zur klinischen Bedeutung des lokalen Vorkommens und der Korrelation von BMP-2 beim Mammakarzinom vor. Um diese Lücke zu schließen wurde die BMP-2 Expression mittels Immunhistochemie in Brustkrebs-Gewebeproben bestimmt. Die Etablierung der IHC erfolgte an einem kleinen Patientenkollektiv und es konnte gezeigt werden, dass 58% der untersuchten Proben eine positive Immunreaktivität bezüglich BMP-2 aufwiesen. Dabei war die zumeist schwache bis mäßige Färbung auffällig. So wiesen zwei Drittel der positiven Tumoren eine schwache Immunreaktivität (Remmele-Score 1-2) auf. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die BMP-2 Färbung eine starke Heterogenität aufweist. So finden sich in den Tumoren neben negativen Arealen auch schwach bis mäßig positive Bereiche und stark gefärbte Einzelzellen. Die so gewonnenen Erkenntnisse über die BMP-2 Expression, deren Stärke und Verteilung bildeten die Grundlage für Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven. Diese wurden mittels Multigewebearrays durchgeführt, die die simultane Bestimmung immunhistochemischer Parameter an bis zu tausend Gewebeproben ermöglichen (Kallioniemi et al., 2001). Der verwendete Multigewebearray „breast prognosis“ beinhaltete über 2200 Brusttumorphosen von denen 2007 ausgewertet werden konnten. Dabei waren 57% der Tumoren positiv bezüglich BMP-2. Dieser Wert ist konform mit der ermittelten Positivität des kleinen Patientenkollektivs. Die Stärke der Immunreaktivität konnte ebenfalls bestätigt werden. So zeigten zwei Drittel der positiven Tumoren nur eine schwache BMP-2 Expression. Diese Befunde machen deutlich, dass eine vorhandene BMP-2 Expression in Mammakarzinomen vornehmlich schwach ist.

Die BMP-2 Expression wurde anschließend auf Zusammenhänge mit etablierten Prognosefaktoren und neuen immunhistochemisch bestimmten Parametern untersucht. Dabei zeigte sich, dass BMP-2 mit prognostisch günstigen Faktoren parallel läuft. So weisen kleine (pT1) und gut differenzierte Tumoren (BRE1) einen deutlich höheren Anteil an nachweisbarem BMP-2 Protein auf. Eine negative Korrelation mit der Proliferation (Mitosen) ist ebenfalls als prognostisch günstig zu bewerten und deutet auf einen wachstumshemmenden Effekt von BMP-2 hin. Des Weiteren ist die BMP-2 Expression negativ mit dem Östrogenrezeptorstatus

korreliert. Die Expression des Östrogenrezeptors ist nur in den ersten postoperativen Jahren ein günstiger Prognosefaktor, verliert aber seine Aussagekraft bei der Beurteilung des Gesamtüberlebens. Er wird vor allem als prädiktiver Faktor für die Effektivität hormoneller Behandlungsmaßnahmen genutzt. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache und des langen Nachbeobachtungszeitraums (über 150 Monate) ist diese negative Korrelation als prognostisch günstig für das Gesamtüberleben zu bewerten. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die BMP-2 Expression mit gut etablierten, prognostisch günstigen Parametern parallel läuft.

Die Korrelationsanalysen mit den möglichen neuen, immunhistochemisch bestimmten Parametern deuten daraufhin, dass BMP-2 das Überleben von Zellen fördert. So läuft die BMP-2 Expression parallel mit der Expression von p16 und p27, Inhibitoren des G1/S-Phase-Übergangs, bcl2, einem Hemmer der Apoptose, den Tumorsuppressoren p53 und SFRP1 sowie Cyclin D1, einem Regulator des G1/S-Phase-Übergangs. Die Zellzyklusregulatoren p16, p27 und Cyclin D1 und deren Expression in Brusttumoren wurde bereits von Wong et al. (2001) untersucht und eine Abnahme der Expression mit steigendem Tumorgrad gefunden. Diese Daten konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden und somit laufen diese möglichen neuen Marker parallel mit dem etablierten Grading und deuten bei Vorhandensein auf eine günstige Prognose hin. Der Tumorsuppressor p53 ist verantwortlich für die genomische Integrität infolge von DNA-Schäden und führt zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose (Mills, 2005). Mutationen des p53 Gens führen zur Inaktivierung oder Veränderung der normalen Funktion und werden bei 20% der Mammakarzinome gefunden (Borresen-Dale, 2003). Die Komplexität der p53-Funktionen und die Vielfalt der möglichen Alterationen erschweren die Beurteilung von p53 als möglichen prognostischen Marker (Lacroix et al., 2006). Jedoch ist die Expression eines funktionsfähigen p53 primär als vorteilhaft einzustufen. Die positive Korrelation von p53 und BMP-2 ist somit ebenfalls positiv für die Prognose. Der Zusammenhang zwischen der BMP-2 und bcl2-Expression erscheint ebenfalls prognostisch günstig, wenn man die Ergebnisse vor dem Hintergrund der Literatur betrachtet. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Herunterregulation der bcl2-Expression mit einer schlechten Prognose einhergeht (Park et al., 2002). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für SFRP1, dessen Verlust mit der Tumorprogression und einer schlechten Prognose einhergeht (Klopocki et al., 2004).

Die dargelegten Assoziationen von BMP-2 mit diesen untersuchten Faktoren deuten zum einen auf einen Zusammenhang von BMP-2 mit dem Überleben der Zellen hin, der möglicherweise durch einen Proliferationsstillstand vermittelt wird. Zum anderen weisen die

Daten auf eine günstige Prognose für BMP-2 exprimierende Tumoren hin. Diese Befunde scheinen sich bei der ersten Betrachtung zu widersprechen. Bezieht man jedoch die Funktion von BMP-2 als Differenzierungsfaktor in die Interpretation ein, so liegt die Vermutung nahe, dass BMP-2 in den Brustkrebszellen die Proliferation zugunsten von Differenzierungsprozessen hemmt. Diese Transdifferenzierung der Tumorzellen hin zu einem noch unbekanntem, aber möglicherweise weniger malignen Phänotyp könnte die Korrelation mit den etablierten und prognostisch günstigen Faktoren erklären. Diese Vermutung wird von der negativen Korrelation der BMP-2 Expression mit dem Proliferationsindex (Mitosen) unterstützt. Für eine genauere Untersuchung dieses Zusammenhangs ist es notwendig die Proliferation anhand des etablierten Proliferationsmarkers Ki-67 immunhistochemisch zu bestimmen. Eine weitere Untermauerung dieser Interpretation liefern die Untersuchungen von Clement et al. (2005), in denen gezeigt werden konnte, dass die BMP-2 überexprimierende Zelllinie MCF7/BMP-2 die Tumorbildung im *Xenograft*-Modell induziert und später zur Bildung von Knorpel- und Knochenstrukturen führt.

Die Expression von BMP-2 läuft nicht nur parallel mit prognostisch günstigen Faktoren sondern ist auch mit dem Überleben korreliert. So zeigen Patienten mit BMP-2 positiven Tumoren ein signifikant erhöhtes Gesamtüberleben im Vergleich zu BMP-2 negativen Tumoren. Die Gruppierung des Patientenkollektivs nach klinisch-pathologischen Gesichtspunkten zeigte, dass duktal-invasive und lobuläre Karzinome besonders von der BMP-2 Expression hinsichtlich des Überlebens profitieren. Bei weiteren Untergruppierungen wird dies besonders bei duktal-invasiven, nodal-negativen Tumoren deutlich. Die Bedeutung von BMP-2 für das Gesamtüberleben konnte mittels einer Cox-Regression weiter unterstrichen werden. Dabei zeigte sich, dass BMP-2 auch unter Berücksichtigung starker Prognosefaktoren wie der Tumorgöße, dem Grading und dem Nodalstatus einen weiteren positiven Beitrag zum Gesamtüberleben leistet. Bei dieser statistischen Analyse wurden nur die Mitosen als nicht signifikant am Überleben beteiligter Parameter ermittelt. Dieser Befund unterstützt den bereits ausgeführten Zusammenhang zwischen BMP-2 und dem Proliferationsindex. Anhand dieser Analysen konnte BMP-2 als unabhängiger prognostischer Faktor für das Mammakarzinom ermittelt werden. Weitergehende Untersuchungen sind notwendig, um die zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären und mögliche Ansatzpunkte für therapeutische Maßnahmen aufzuspüren. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der BMP-2 Expression und dem Überleben von Mammakarzinompatienten hergestellt werden. Gleichzeitig konnte eine Korrelation der BMP-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern hergestellt werden.

Bisher konnte lediglich für einen weiteren Faktor in der BMP-Signalkaskade, den BMPRII ein vergleichbarer Zusammenhang, allerdings nur bei Östrogen-Rezeptor positiven Mammakarzinomen gezeigt werden (Helms et al., 2005). Die prognostische Relevanz von BMP-2 im Mammakarzinom gab Anlass zu umfassenden Untersuchungen der BMP-2 Expression in anderen Geweben mittels eines Multitumor-Gewebearrays. Mit den durchgeführten Analysen konnte gezeigt werden, dass BMP-2 auch in einer Vielzahl anderer Tumorentitäten nachgewiesen werden kann. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede in der BMP-2 Expression zwischen Tumor- und Normalgewebe. Auf Basis einer quantitativen und qualitativen Beurteilung der BMP-Expression konnten Tumorentitäten herausgearbeitet werden, die für weitere Untersuchungen interessant erscheinen. Dazu gehören Tumoren des Magens, des Pankreas, der Leber und des Kolons. Besonders hervorzuheben ist dabei das Kolon, für das eine Abnahme der BMP-2 Expression mit steigendem Malignitätsgrad gezeigt werden konnte. Diese Erkenntnis geht konform mit der negativen Korrelation des Gradings und der BMP-2 Expression im Mammakarzinom und ist ein spannender Aspekt für weitergehende Untersuchungen zur tumorbiologischen Bedeutung von BMP-2 in anderen Tumorentitäten. Die Ergebnisse dieser Analysen sind vor dem Hintergrund fehlender klinischer Daten und den bereits gewonnenen Erfahrungen mit dem Brustkrebs-spezifischen Gewebearray „breast prognosis“ zu interpretieren. So wurden mit den erstellten Expressionsprofilen verschiedene Tumorentitäten identifiziert, die nun in tumorspezifischen Gewebearrays an größeren Patientenkollektiven untersucht und mit klinischen Parametern korreliert werden müssen. Des Weiteren waren die Probenzahlen mitunter sehr klein und so konnte der Prozentsatz BMP-2 positiver Tumoren von ca. 60% aus dem „breast prognosis“ Gewebearray in dem Multitumor-Gewebearray nicht bestätigt werden. Dies sollte bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden und es ist gut möglich, dass BMP-2 auch bei Tumorentitäten mit einer kleinen Anzahl positiver Proben eine klinische Bedeutung besitzt.

In der vorliegenden Arbeit konnten neue Aspekte zur tumorbiologischen Relevanz von BMP-2 im Mammakarzinom gewonnen werden. Die generierten Daten geben neue Einsichten in die BMP-2 Wirkung sowohl aus molekularbiologischer als auch aus klinischer Sicht. Der globale experimentelle Ansatz zur zeitabhängigen Wirkung von BMP-2 und der Expression in Mammakarzinomen führte zu vielfältigen Ergebnissen und einem breiten Spektrum neuer Ansätze für weitergehende Untersuchungen.

Die derzeitigen Daten zur tumorbiologischen Rolle von BMP-2 im Mammakarzinom deuten sowohl auf einen pro- als auch einen anti-tumorigenen Effekt hin. Die Migration von Mammakarzinomzellen in Richtung einer BMP-2 Quelle sprechen für eine Funktion als Tumorpromotor, da die Migration ein entscheidender Prozess der Metastasierung ist. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, ob die Tumorzellen selbst oder andere Zellen diese BMP-2 Quelle darstellen. So ist ein modulierender Einfluss des umliegenden Gewebes oder tumorassoziierter Fibroblasten denkbar. Im Hinblick auf die Bildung von Metastasen scheint es möglich, dass die Metastasierungsorte und deren BMP-2 Expression für die Ansiedlung von Tumorzellen verantwortlich sind. Diese Vermutung ist nahe liegend, da Brustkrebs häufig zu Knochenmetastasen neigt und BMP-2 aufgrund seiner Funktion als Regulator der Knochenbildung und des Knochenstoffwechsels in diesem Gewebe exprimiert wird. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass künstlich mit BMP-2 hergestellter Knochen (Tissue Engineering) als Ziel für Metastasenbildung von Mammakarzinomen fungiert (Moreau et al., 2007). Für eine Funktion von BMP-2 als Tumorsuppressor spricht die Korrelation von BMP-2 mit prognostisch günstigen Markern und der unabhängige Beitrag zum Gesamtüberleben. Die Expression von BMP-2 in Tumoren scheint zu einem Wachstumsstillstand zu führen und anschließend zu einer Transdifferenzierung, wie bereits im *Xenograft*-Modell gezeigt werden konnte (Clement et al., 2005). Diese Daten könnten die Grundlage für die Anwendung von BMP-2 als Differenzierungstherapeutikum sein, mit dem Tumoren in eine Transdifferenzierung hin zu einem weniger malignen Phänotyp gelenkt werden.

Zusammenfassend sprechen diese Befunde für eine duale Rolle von BMP-2, ähnlich der von TGF- $\beta$  (Muraoka-Cook et al., 2005), in der Tumorigenese. Diese Dualität kann sowohl durch Zeit- und Konzentrationseinflüsse als auch durch Veränderungen der genetischen Situation während der Progression des Mammakarzinoms hervorgerufen werden.



## 5. Literaturverzeichnis

**Adachi T, Takanaga H, Kunimoto M, Asou H (2005)**

Influence of LIF and BMP-2 on differentiation and development of glial cells in primary cultures of embryonic rat cerebral hemisphere  
J Neurosci Res. 79(5):608-615

**Alarmo E-L, Kuukasjärvi T, Karhu R, Kallioniemi A (2007)**

A comprehensive expression survey of bone morphogenetic proteins in breast cancer highlights the importance of *BMP4* and *BMP7*  
Breast Cancer Res Treat 103: 239-246

**Al-Shahrour F, Díaz-Uriarte R, Dopazo J (2004)**

FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes  
Bioinformatics. 20(4):578-580

**Anderson P und Kedersha N (2002)**

Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation  
Cell Stress Chaperones. 7(2):213-221

**Aono A, Hazama M, Notoya K, Taketomi S, Yamasaki H, Tsukuda R, Sasaki S, Fujisawa Y (1995)**

Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer  
Biochem Biophys Res Commun. 210(3):670-677

**Arnold SF, Tims E, McGrath BE (1999)**

Identification of Bone Morphogenetic Proteins and their Receptors in Human Breast Cancer Cell Lines: Importance of BMP2  
Cytokine, Vol. 11, No. 12: 1031-1037

**Attisano L und Wrana JL (2002)**

Signal transduction by the TGF-beta superfamily  
Science 296(5573):1646-47

**Baskin DS, Ryan P, Sonntag V, Westmark R, Widmayer MA (2003)**

A prospective, randomized, controlled cervical fusion study using recombinant human bone morphogenetic protein-2 with the CORNERSTONE-SR allograft ring and the ATLANTIS anterior cervical plate  
Spine. 28(12):1219-24

**Bässler R (1998)**

Histopathologie und aktuelle Klassifikation des Mammakarzinoms  
Onkologie 4: 878-895

**Bastida MF, Delgado MD, Wang B, Fallon JF, Fernandez-Teran M, Ros MA (2004)**

Levels of Gli3 repressor correlate with Bmp4 expression and apoptosis during limb development  
Dev Dyn. 231(1):148-160

- Beck SE, Jung BH, Fiorino A, Gomez J, Rosario ED, Cabrera BL, Huang SC, Chow JY, Carethers JM (2006)**  
Bone morphogenetic protein signaling and growth suppression in colon cancer  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 291(1):G135-145
- Bommer UA und Thiele BJ (2004)**  
The translationally controlled tumour protein (TCTP).  
Int J Biochem Cell Biol. 36(3):379-385
- Børresen-Dale AL (2003)**  
TP53 and breast cancer  
Hum Mutat. 21(3):292-300
- Boyne PJ, Lilly LC, Marx RE, Moy PK, Nevins M, Spagnoli DB, Triplett RG (2005)**  
De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation  
J Oral Maxillofac Surg. 63(12):1693-1707
- Bradford MM (1976)**  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding  
Anal Biochem 72: 248-254
- Burkus JK, Transfeldt EE, Kitchel SH, Watkins RG, Balderston RA (2002)**  
Clinical and radiographic outcomes of anterior lumbar interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2  
Spine. 27(21):2396-2408
- Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, Wozney JM (1990)**  
Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone  
Proc Natl Acad Sci USA 87(24): 9843-9847
- Chang-Claude J (1997)**  
Genetische Disposition bei Krebserkrankungen von Frauen  
Forum der Deutschen Krebsgesellschaft e.V., Omnimed Verlagsgesellschaft 12(8): 595-597
- Chen D, Zhao M, Mundy GR (2004)**  
Bone Morphogenetic Proteins  
Growth Factors 22(4): 233-241
- Chen Y, Cheung KM, Kung HF, Leong JC, Lu WW, Luk KD (2002)**  
In vivo new bone formation by direct transfer of adenoviral-mediated bone morphogenetic protein-4 gene  
Biochem Biophys Res Commun. 298(1):121-127
- Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC (2003)**  
Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs)  
J Bone Joint Surg Am. 85-A(8):1544-1552

**Clement JH, Fettes P, Knöchel S, Lef J, Knöchel W (1995)**

Bone morphogenetic protein 2 in the early development of *Xenopus laevis*  
Mech Dev. 52(2-3):357-370

**Clement JH, Marr N, Meissner A, Schwalbe M, Sebald W, Kliche KO, Höffken K, Wölfl S (2000)**

Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces sequential changes of Id gene expression in the breast cancer cell line MCF-7  
J Cancer Res Clin Oncol. 126(5):271-279

**Clement JH, Raida M, Sängler J, Bicknell R, Liu J, Naumann A, Geyer A, Waldau A, Hortschansky P, Schmidt A, Höffken K, Wölfl S, Harris AL (2005)**

Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces in vitro invasion and in vivo hormone independent growth of breast carcinoma cells  
Int J Oncol. 27(2):401-407

**Clement JH, Sängler J, Höffken K (1999)**

Expression of bone morphogenetic protein 6 in normal mammary tissue and breast cancer cell lines and its regulation by epidermal growth factor  
Int J Cancer. 1999 Jan 18;80(2):250-256

**Cook SD (1999)**

Preclinical and clinical evaluation of osteogenic protein-1 (BMP-7) in bony sites  
Orthopedics. 22(7):669-671

**Cunningham NS, Paralkar V, Reddi AH (1992)**

Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression  
Proc Natl Acad Sci U S A. 89(24):11740-11744

**Dai Z, Popkie AP, Zhu WG, Timmers CD, Raval A, Tannehill-Gregg S, Morrison CD, Auer H, Kratzke RA, Niehans G, Amatschek S, Sommergruber W, Leone GW, Rosol T, Otterson GA, Plass C (2004)**

Bone morphogenetic protein 3B silencing in non-small-cell lung cancer  
Oncogene. 23(20):3521-3529

**Dale L, Howes G, Price BM, Smith JC (1992)**

Bone morphogenetic protein 4: a ventralizing factor in early *Xenopus* development  
Development 115(2):573-585

**Daopin S, Piez KA, Ogawa Y, Davies DR (1992)**

Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily  
Science 257(5068):369-373

**Deng H, Makizumi R, Ravikumar TS, Dong H, Yang W, Yang WL (2007)**

Bone morphogenetic protein-4 is overexpressed in colonic adenocarcinomas and promotes migration and invasion of HCT116 cells  
Exp Cell Res. 313(5):1033-1044

**Deng H, Ravikumar TS, Yang WL (2007)**

Bone morphogenetic protein-4 inhibits heat-induced apoptosis by modulating MAPK pathways in human colon cancer HCT116 cells  
Cancer Lett 256(2):207-217

**Doherty MJ, Young PR, Cohen PT (1996)**

Amino acid sequence of a novel protein phosphatase 1 binding protein (R5) which is related to the liver- and muscle-specific glycogen binding subunits of protein phosphatase 1  
FEBS Lett. 399(3):339-343

**Drozdoff V, Wall NA, Pledger WJ (1994)**

Expression and growth inhibitory effect of decapentaplegic Vg-related protein 6: evidence for a regulatory role in keratinocyte differentiation  
Proc Natl Acad Sci U S A. 91(12):5528-5532

**Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ (1995)**

A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye  
Genes Dev. 9(22):2795-2807

**Ebisawa T, Tada K, Kitajima I, Tojo K, Sampath TK, Kawabata M, Miyazono K, Imamura T (1999)**

Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation  
J Cell Sci. 112 ( Pt 20):3519-3527

**Fiedler J, Röderer G, Günther KP, Brenner RE (2002)**

BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells  
J Cell Biochem. 87(3):305-312

**Förch P und Valcárcel J (2001)**

Molecular mechanisms of gene expression regulation by the apoptosis-promoting protein TIA-1  
Apoptosis 6(6):463-468

**Förch P, Puig O, Kedersha N, Martínez C, Granneman S, Séraphin B, Anderson P, Valcárcel J (2000)**

The apoptosis-promoting factor TIA-1 is a regulator of alternative pre-mRNA splicing  
Mol Cell. 6(5):1089-1098

**Fransson A, Ruusala A, Aspenström P (2003)**

Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis  
J Biol Chem. 278(8):6495-6502

**Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForte AJ, Yin S (2001)**

Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions  
J Bone Joint Surg Am. 83-A Suppl 1(Pt 2):S151-158

**Fujita F, Taniguchi Y, Kato T, Narita Y, Furuya A, Ogawa T, Sakurai H, Joh T, Itoh M, Delhase M, Karin M, Nakanishi M (2003)**

Identification of NAP1, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling  
Mol Cell Biol. 23(21):7780-7793

**Gabbitas B und Canalis E (1995)**

Bone morphogenetic protein-2 inhibits the synthesis of insulin-like growth factor-binding protein-5 in bone cell cultures  
Endocrinology 136(6):2397-2403

**Gamer LW, Nove J, Levin M, Rosen V (2005)**

BMP-3 is a novel inhibitor of both activin and BMP-4 signaling in *Xenopus* embryos  
Dev Biol. 285(1):156-168

**García-Cao I, Duran A, Collado M, Carrascosa MJ, Martín-Caballero J, Flores JM, Diaz-Meco MT, Moscat J, Serrano M (2005)**

Tumour-suppression activity of the proapoptotic regulator Par4  
EMBO Rep. 6(6):577-583

**Gazzerro E und Canalis E (2006)**

Bone morphogenetic proteins and their antagonists.  
Rev Endocr Metab Disord. 7(1-2):51-65

**Ghosh-Choudhury N, Ghosh-Choudhury G, Celeste A, Ghosh PM, Moyer M, Abboud SL, Kreisberg J (2000)**

Bone morphogenetic protein-2 induces cyclin kinase inhibitor p21 and hypophosphorylation of retinoblastoma protein in estradiol-treated MCF-7 human breast cancer cells  
Biochim Biophys Acta. 1497(2):186-196

**Gitelman SE, Kobrin MS, Ye JQ, Lopez AR, Lee A, Derynck R (1994)**

Recombinant Vgr-1/BMP-6-expressing tumors induce fibrosis and endochondral bone formation in vivo  
J Cell Biol. 126(6):1595-1609

**Godin RE, Robertson EJ, Dudley AT (1999)**

Role of BMP family members during kidney development  
Int J Dev Biol. 43(5):405-411

**Gossen M und Bujard H (1992)**

Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline responsive promoters  
Proc Natl Acad Sci USA 89: 5547-5551

**Gouédard L, Chen YG, Thevenet L, Racine C, Borie S, Lamarre I, Josso N, Massague J, di Clemente N (2000)**

Engagement of bone morphogenetic protein type IB receptor and Smad1 signaling by anti-Müllerian hormone and its type II receptor  
J Biol Chem. 275(36):27973-27978

**Griner EM und Kazanietz MG (2007)**

Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer  
Nat Rev Cancer. 7(4):281-294

**Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W, Affolter M, Vale WW, Belmonte JC, Choe S (2002)**

Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin  
Nature 420(6916):636-642

**Guha U, Gomes WA, Kobayashi T, Pestell RG, Kessler JA (2002)**

In vivo evidence that BMP signaling is necessary for apoptosis in the mouse limb  
Dev Biol. 249(1):108-120

**Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE (1996)**

DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1  
Science 271(5247):350-353

**Hallahan AR, Pritchard JI, Chandraratna RA, Ellenbogen RG, Geyer JR, Overland RP, Strand AD, Tapscott SJ, Olson JM (2003)**

BMP-2 mediates retinoid-induced apoptosis in medulloblastoma cells through a paracrine effect  
Nat Med 9(8):1033-8

**Hardwick JC, Van Den Brink GR, Bleuming SA, Ballester I, Van Den Brande JM, Keller JJ, Offerhaus GJ, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP (2004)**

Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon  
Gastroenterology. 126(1):111-121

**Harris SE, Harris MA, Mahy P, Wozney J, Feng JQ, Mundy GR (1994)**

Expression of bone morphogenetic protein messenger RNAs by normal rat and human prostate and prostate cancer cells  
Prostate. 24(4):204-211

**Hayashi A, Seki N, Hattori A, Kozuma S, Saito T (1999)**

PKCnu, a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKCmu  
Biochim Biophys Acta. 1450(1):99-106

**Helms MW, Packeisen J, August C, Schittek B, Boecker W, Brandt BH, Buerger H (2005)**

First evidence supporting a potential role for the BMP/SMAD pathway in the progression of oestrogen receptor-positive breast cancer  
J Pathol. 206(3):366-376

**Hillen W und Berens C (1994)**

Mechanisms underlying expression of Tn10-encoded tetracycline resistance  
Annual. Rev. Microbiol. 48: 345-369

**Hogan, BLM (1996)**

Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development  
Genes & Development 10: 1580-1594

**Hoodless PA und Wrana JL (1998)**

Mechanism and function of signaling by the TGF beta superfamily  
Curr Top Microbiol Immunol. 228:235-272

**Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM (1998)**

The Xenopus dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities  
Mol Cell. 1(5):673-683

**Hsu MY, Rovinsky S, Penmatcha S, Herlyn M, Muirhead D (2005)**

Bone morphogenetic proteins in melanoma: angel or devil?  
Cancer Metastasis Rev. 24(2):251-263

**Hsu SM, Raine L et al. (1981)**

Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC und unlabeled antibody (PAP)procedures  
J Histochem Cytochem 29(4): 577-580

**Ide H, Yoshida T, Matsumoto N, Aoki K, Osada Y, Sugimura T, Terada M (1997)**

Growth regulation of human prostate cancer cells by bone morphogenetic protein-2  
Cancer Res. 57(22):5022-5027

**Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, Miyazono K (1997)**

Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily  
Nature 389(6651):622-626

**Israel DI, Nove J, Kerns KM, Kaufman RJ, Rosen V, Cox KA and Wozney JM (1996)**

Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo  
Growth Factors Vol. 13: 291-300

**Izumi M, Masaki M, Hiramoto Y, Sugiyama S, Kuroda T, Terai K, Hori M, Kawase I, Hirota H (2006)**

Cross-talk between bone morphogenetic protein 2 and leukemia inhibitory factor through ERK 1/2 and Smad1 in protection against doxorubicin-induced injury of cardiomyocytes  
J Mol Cell Cardiol. 40(2):224-233

**Jagus R, Joshi B, Barber GN (1999)**

PKR, apoptosis and cancer  
Int J Biochem Cell Biol. 31(1):123-138

**Johnsson R, Strömqvist B, Aspenberg P (2002)**

Randomized radiostereometric study comparing osteogenic protein-1 (BMP-7) and autograft bone in human noninstrumented posterolateral lumbar fusion: 2002 Volvo Award in clinical studies  
Spine. 27(23):2654-2661

**Jones WK, Richmond EA, White K, Sasak H, Kusmik W, Smart J, Oppermann H, Rueger DC, Tucker RF** (1994)

Osteogenic protein-1 (OP-1) expression and processing in Chinese hamster ovary cells: isolation of a soluble complex containing the mature and pro-domains of OP-1  
Growth Factors 11: 215-225

**Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G** (2001)

Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer  
Hum Mol Genet. 10(7):657-662

**Kaplan FS, Fiori J, DE LA Peña LS, Ahn J, Billings PC, Shore EM** (2006)

Dysregulation of the BMP-4 signaling pathway in fibrodysplasia ossificans progressiva  
Ann N Y Acad Sci. 1068:54-65

**Karzenowski D, Potter DW, Padidam M** (2005)

Inducible control of transgene expression with ecdysone receptor: gene switches with high sensitivity, robust expression, and reduced size  
Biotechniques. 39(2):191-192

**Katagiri T, Yamaguchi A, Ikeda T, Yoshiki S, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Tanaka H, Omura S, Suda T** (1990)

The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2  
Biochem Biophys Res Commun. 172(1):295-9

**Katoh M** (2007)

Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis  
Stem Cell Rev. 3(1):30-38

**Katoh M und Terada M** (1996)

Overexpression of bone morphogenetic protein (BMP)-4 mRNA in gastric cancer cell lines of poorly differentiated type  
J Gastroenterol. 31(1):137-139

**Kaufmann SH und Gores GJ** (2000)

Apoptosis in cancer: cause and cure  
Bioessays. 22(11):1007-1017

**Kawamura C, Kizaki M, Ikeda Y** (2002)

Bone morphogenetic protein (BMP)-2 induces apoptosis in human myeloma cells  
Leuk Lymphoma. 43(3):635-639

**Kawamura C, Kizaki M, Yamato K, Uchida H, Fukuchi Y, Hattori Y, Koseki T, Nishihara T, Ikeda Y** (2000)

Bone morphogenetic protein-2 induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3  
Blood 96(6):2005-2011



**Khyse-Anderson J (1984)**

Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose  
J Biochem Biophys Meth 10: 203-209

**Kim IY, Lee DH, Lee DK, Ahn HJ, Kim MM, Kim SJ, Morton RA (2004a)**

Loss of expression of bone morphogenetic protein receptor type II in human prostate cancer cells  
Oncogene. 23(46):7651-7659

**Kim IY, Lee DH, Lee DK, Kim WJ, Kim MM, Morton RA, Lerner SP, Kim SJ (2004)**

Restoration of bone morphogenetic protein receptor type II expression leads to a decreased rate of tumor growth in bladder transitional cell carcinoma cell line TSU-Pr1  
Cancer Res. 2004 64(20):7355-7360

**Kim WJ, Mohan RR, Mohan RR, Wilson SE (1999)**

Effect of PDGF, IL-1alpha, and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: expression of the platelet-derived growth factor system in the cornea  
Invest Ophthalmol Vis Sci. 40(7):1364-1372

**Kinchen JM und Ravichandran KS (2007)**

Journey to the grave: signaling events regulating removal of apoptotic cells  
J Cell Sci. 120(Pt 13):2143-2149

**Kleeff J, Maruyama H, Ishiwata T, Sawhney H, Friess H, Büchler MW, Korc M (1999)**

Bone morphogenetic protein 2 exerts diverse effects on cell growth in vitro and is expressed in human pancreatic cancer in vivo  
Gastroenterology. 116(5):1202-1216

**Klopocki E, Kristiansen G, Wild PJ, Klamann I, Castanos-Velez E, Singer G, Stöhr R, Simon R, Sauter G, Leibiger H, Essers L, Weber B, Hermann K, Rosenthal A, Hartmann A, Dahl E (2004)**

Loss of SFRP1 is associated with breast cancer progression and poor prognosis in early stage tumors  
Int J Oncol. 25(3):641-649

**Kodach LL, Bleuming SA, Peppelenbosch MP, Hommes DW, van den Brink GR, Hardwick JC (2007)**

The effect of statins in colorectal cancer is mediated through the bone morphogenetic protein pathway  
Gastroenterology 133(4):1272-1281

**Köster M, Plessow S, Clement JH, Lorenz A, Tiedemann H, Knöchel W (1991)**

Bone morphogenetic protein 4 (BMP-4), a member of the TGF-beta family, in early embryos of *Xenopus laevis*: analysis of mesoderm inducing activity  
Mech Dev. 33(3):191-199

**Kretschmar M, Doody J, Massagué (1997)**

Opposing BMP und EGF signalling pathways converge on the TGF- $\beta$  family mediator Smad1  
Nature Vol. 389: 618-622

- Kübler NR, Reinhart E, Pistner H, Bill JS, Reuther JF** (1998)  
Clinical application of osteoinductive implants in craniofacial surgery  
Mund Kiefer Gesichtschir. 2 Suppl 1:S32-36
- Kumanov P, Nandipati KC, Tomova A, Robeva R, Agarwal A** (2005)  
Significance of inhibin in reproductive pathophysiology and current clinical applications  
Reprod Biomed Online. 10(6):786-812
- Kusafuka K, Yamaguchi A, Kayano T, Fujiwara M, Takemura T** (1998)  
Expression of bone morphogenetic proteins in salivary pleomorphic adenomas  
Virchows Arch. 432(3):247-253
- Kusumoto K, Bessho K, Fujimura K, Akioka J, Ogawa Y, Iizuka T** (1997)  
Comparison of ectopic osteoinduction in vivo by recombinant human BMP-2 and recombinant Xenopus BMP-4/7 heterodimer  
Biochem Biophys Res Commun. 239(2):575-579
- Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G** (2006)  
p53 and breast cancer, an update  
Endocr Relat Cancer. 13(2):293-325
- Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massagué J** (1996)  
Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways  
Nature 383(6603):832-836
- Langenfeld EM und Langenfeld J** (2004)  
Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors  
Mol Cancer Res. 2(3):141-149
- Langenfeld EM, Bojnowski J, Perone J, Langenfeld J** (2005)  
Expression of bone morphogenetic proteins in human lung carcinomas  
Ann Thorac Surg. 80(3):1028-1032
- Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Lowry SF, Amenta P, Langenfeld J** (2003)  
The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells  
Carcinogenesis Vol. 24 No. 9: 1445-1454
- Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF** (1992)  
Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase  
Cell 68(4):775-785
- Liu W, Selever J, Murali D, Sun X, Brugger SM, Ma L, Schwartz RJ, Maxson R, Furuta Y, Martin JF** (2005)  
Threshold-specific requirements for Bmp4 in mandibular development  
Dev Biol. 283(2):282-293

**Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, Muthukumaran N, Hammonds RG, Nevins WB, Woods WI, Reddi AH** (1989)

Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation

Journal of Biological Chemistry 264: 13377-13380

**Ma L, Lu MF, Schwartz RJ, Martin JF** (2005)

Bmp2 is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning

Development. 132(24):5601-5611

**Macías-Silva M, Hoodless PA, Tang SJ, Buchwald M, Wrana JL** (1998)

Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2

J Biol Chem. 273(40):25628-36

**Massague J** (1998)

TGF- $\beta$  signal transduction

Annu. Rev. Biochem. 67: 753-791

**Massague J** (2000)

How cells read TGF- $\beta$  signals

Nature Rev. Mol. Cell Biol. 1: 169-178

**Mercurio AM, Lipscomb EA, Bachelder RE** (2005)

Non-angiogenic functions of VEGF in breast cancer

J Mammary Gland Biol Neoplasia. 10(4):283-290

**Mills AA** (2005)

p53: link to the past, bridge to the future

Genes Dev. 19(18):2091-2099

**Miyazono K, Suzuki H, Imamura T** (2003)

Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors

Cancer Sci. 94(3):230-234

**Miyazono K, ten Dijke P, Heldin CH** (2002)

TGF-beta signaling by Smad proteins

Adv Immunol. 75:115-157

**Mizutani CM, Meyer N, Roelink H, Bier E** (2006)

Threshold-dependent BMP-mediated repression: a model for a conserved mechanism that patterns the neuroectoderm

PLoS Biol. 4(10):e313

**Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S** (2003)

Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells

J Biol Chem. 278(1):304-310

- Moreau JE, Anderson K, Mauney JR, Nguyen T, Kaplan DL, Rosenblatt M (2007)**  
Tissue-engineered bone serves as a target for metastasis of human breast cancer in a mouse model  
*Cancer Res* 67(21):10304-10308
- Muraoka-Cook RS, Dumont N, Arteaga CL (2005)**  
Dual role of transforming growth factor beta in mammary tumorigenesis and metastatic progression.  
*Clin Cancer Res.* 11(2 Pt 2):937s-43s
- Nakamura K, Shirai T, Morishita S, Uchida S, Saeki-Miura K, Makishima F (1999)**  
p38 mitogen-activated protein kinase functionally contributes to chondrogenesis induced by growth/differentiation factor-5 in ATDC5 cells  
*Exp Cell Res.* 250(2):351-363
- Nakamura Y, Ozaki T, Koseki H, Nakagawara A, Sakiyama S (2003)**  
Accumulation of p27 KIP1 is associated with BMP2-induced growth arrest and neuronal differentiation of human neuroblastoma-derived cell lines  
*Biochem Biophys Res Commun* 307(1):206-213
- Nakashima K, Yanagisawa M, Arakawa H, Taga T (1999)**  
Astrocyte differentiation mediated by LIF in cooperation with BMP2  
*FEBS Lett.* 457(1):43-46
- Nakayama N, Han CE, Scully S, Nishinakamura R, He C, Zeni L, Yamane H, Chang D, Yu D, Yokota T, Wen D (2001)**  
A novel chordin-like protein inhibitor for bone morphogenetic proteins expressed preferentially in mesenchymal cell lineages  
*Dev Biol.* 232(2):372-387
- Nishitoh H, Ichijo H, Kimura M, Matsumoto T, Makishima F, Yamaguchi A, Yamashita H, Enomoto S, Miyazono K (1996)**  
Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5  
*J Biol Chem.* 271(35):21345-21352
- Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massagué J, Niehrs C (1999)**  
Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI  
*Nature* 401(6752):480-485
- Ottaiano A, Pisano C, De Chiara A, Ascierio PA, Botti G, Barletta E, Apice G, Gridelli C, Iaffaioli VR (2002)**  
CD40 activation as potential tool in malignant neoplasms  
*Tumori* 88(5):361-366
- Park SH, Kim H, Song BJ (2002)**  
Down regulation of bcl2 expression in invasive ductal carcinomas is both estrogen- and progesterone-receptor dependent and associated with poor prognostic factors  
*Pathol Oncol Res.* 8(1):26-30

**Pearce JJ, Penny G, Rossant J (1999)**

A mouse cerberus/Dan-related gene family  
Dev Biol. 209(1):98-110

**Phippard DJ, Weber-Hall SJ, Sharpe PT, Naylor MS, Jayatalake H, Maas R, Woo I, Roberts-Clark D, Francis-West PH, Liu Y-H, Maxson R, Hill RE, Dale TC (1996)**

Regulation of Msx-1, Msx-2, Bmp-2 and Bmp-4 during foetal and postnatal mammary gland development  
Development 122: 2729-2737

**Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM (1996)**

Dorsoventral patterning in Xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4  
Cell 86(4):589-598

**Ponti D, Zaffaroni N, Capelli C, Daidone MG (2006)**

Breast cancer stem cells: an overview  
Eur J Cancer. 42(9):1219-1224

**Pouliot F, Blais A, Labrie C (2003)**

Overexpression of a dominant negative type II bone morphogenetic protein receptor inhibits the growth of human breast cancer cells  
Cancer Res 63(2):277-281

**Raida M, Clement JH, Ameri K, Han C, Leek RD, Harris AL (2005)**

Expression of bone morphogenetic protein 2 in breast cancer cells inhibits hypoxic cell death  
Int J Oncol 26(6):1465-1470

**Raida M, Clement JH, Leek RD, Ameri K, Bicknell R, Niederwieser D, Harris AL (2005)**

Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and induction of tumor angiogenesis  
J Cancer Res Clin Oncol. 131(11):741-750

**Raida M, Sarbia M, Clement JH, Adam S, Gabbert HE, Höffken K (1999)**

Expression, regulation and clinical significance of bone morphogenetic protein 6 in esophageal squamous-cell carcinoma  
Int J Cancer. 83(1):38-44

**Reed JC (1998)**

Bcl-2 family proteins  
Oncogene. 17(25):3225-3236

**Remmele W und Stegner HE (1987)**

Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue  
Pathologe. 8(3):138-140

**Ron D und Walter P (2007)**

Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response  
Nat Rev Mol Cell Biol. 8(7):519-529

- Rosenzweig BL, Imamura T, Okadome T, Cox GN, Yamashita H, ten Dijke P, Heldin CH, Miyazono K (1995)**  
Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins  
Proc Natl Acad Sci U S A. 92(17):7632-7636
- Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF, White KH, Coughlin JE, Tucker MM, Pang RH, et al (1992)**  
Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro  
J Biol Chem. 267(28):20352-20362
- Samuel CE, Kuhlen KL, George CX, Ortega LG, Rende-Fournier R, Tanaka H (1997)**  
The PKR protein kinase--an interferon-inducible regulator of cell growth and differentiation  
Int J Hematol. 65(3):227-237
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977)**  
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors  
Proc Natl Acad Sci U S A. 74(12):5463-5467
- Savinova O, Joshi B, Jagus R (1999)**  
Abnormal levels and minimal activity of the dsRNA-activated protein kinase, PKR, in breast carcinoma cells  
Int J Biochem Cell Biol. 31(1):175-189
- Scheufler C, Sebald W, Hülsmeier M (1999)**  
Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution  
J Mol Biol. 287(1):103-115
- Scheuner D, Patel R, Wang F, Lee K, Kumar K, Wu J, Nilsson A, Karin M, Kaufman RJ (2006)**  
Double-stranded RNA-dependent protein kinase phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis  
J Biol Chem. 281(30):21458-21468
- Schneider TJ, Fischer GM, Donohoe TJ, Colarusso TP, Rothstein TL (1999)**  
A novel gene coding for a Fas apoptosis inhibitory molecule (FAIM) isolated from inducibly Fas-resistant B lymphocytes  
J Exp Med. 189(6):949-956
- Schorr K, Li M, Krajewski S, Reed JC, Furth PA (1999)**  
Bcl-2 gene family and related proteins in mammary gland involution and breast cancer  
J Mammary Gland Biol Neoplasia 4(2):153-164
- Schwalbe M, Sanger J, Eggers R, Naumann A, Schmidt A, Höffken K, Clement JH (2003)**  
Differential expression and regulation of bone morphogenetic protein 7 in breast cancer  
Int J Oncol. 23(1):89-95

**Schwaller B, Meyer-Monard S, Gander JC, Pugin P, Celio MR, Ludwig C (1998)**  
The calcium-binding protein calretinin-22k is detectable in the serum and specific cells of cancer patients  
Anticancer Res. 18(5B):3661-3667

**Shannan B, Seifert M, Leskov K, Willis J, Boothman D, Tilgen W, Reichrath J (2006)**  
Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer  
Cell Death Differ. 13(1):12-19

**Shi Y (2006)**  
Mechanical aspects of apoptosome assembly  
Curr Opin Cell Biol. 18(6):677-684

**Shi Y und Massague J (2003)**  
Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus  
Cell 113(6):685-700

**Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF (2004)**  
The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction  
Endocrine Reviews 25(1): 72-101

**Simon M, Maresh JG, Harris SE, Hernandez JD, Arar M, Olson MS, Abboud HE (1999)**  
Expression of bone morphogenetic protein-7 mRNA in normal and ischemic adult rat kidney  
Am J Physiol. 276(3 Pt 2):F382-389

**Sjödäl M, Edlund T, Gunhaga L (2007)**  
Time of exposure to BMP signals plays a key role in the specification of the olfactory and lens placodes *ex vivo*  
Dev Cell. 13(1):141-149

**Smith WC und Harland RM (1992)**  
Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos  
Cell 70(5):829-840

**Sneddon JB, Zhen HH, Montgomery K, van de Rijn M, Tward AD, West R, Gladstone H, Chang HY, Morganroth GS, Oro AE, Brown PO (2006)**  
Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation  
Proc Natl Acad Sci U S A 103(40):14842-14847

**Soengas MS, Alarcón RM, Yoshida H, Giaccia AJ, Hakem R, Mak TW, Lowe SW (1999)**  
Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition  
Science. 284(5411):156-159

**Steinert S, Ludwig M, Naumann A, Geyer A, Clement JH (2005)**  
BMP-2 reguliert das Migrationsverhalten von Mammakarzinomzellen *in vitro*  
BIOspektrum 11: 470-471

**Taubert, I** (2007)

BMP-2 reguliert die Expression Apoptose-assoziiierter Gene  
Diplomarbeit

**ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S** (2002)

Regulation of cell proliferation by Smad proteins  
J Cell Physiol 191(1): 1-16

**ten Dijke P, Yamashita H, Ichijo H, Franzén P, Laiho M, Miyazono K, Heldin CH** (1994)

Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin  
Science 264(5155):101-104

**The Gene Ontology Consortium** (2000)

Gene Ontology: tool for the unification of biology  
Nature Genetics Vol25: 25-29

**Thériault BL, Shepherd TG, Mujoomdar ML, Nachtigal MW** (2007)

BMP4 induces EMT and Rho GTPase activation in human ovarian cancer cells  
Carcinogenesis. 28(6):1153-1162

**Thesleff I, Vaahtokari A, Partanen AM** (1995)

Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs  
Int J Dev Biol. 39(1):35-50

**Thomadaki H, Talieri M, Scorilas A** (2007)

Prognostic value of the apoptosis related genes BCL2 and BCL2L12 in breast cancer  
Cancer Lett. 247(1):48-55

**Thomas JT, Kilpatrick MW, Lin K, Erlacher L, Lembessis P, Costa T, Tsipouras P, Luyten FP** (1997)

Disruption of human limb morphogenesis by a dominant negative mutation in CDMP1  
Nat Genet. 17(1):58-64

**Thorey F, Witte F, Nellesen J, Griep-Raming N, Menzel H, Gross G, Hoffmann A, Seufert J, Windhagen H** (2005)

Improved osseointegration of titanium implants after surface coating with polymers in a rabbit model  
Orthopade. 34(11):1112, 1114-7

**Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979)

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications  
Proc Natl Aced Sci USA 76: 4350-4354

**Tribulo C, Aybar MJ, Nguyen VH, Mullins MC, Mayor R** (2003)

Regulation of Msx genes by a Bmp gradient is essential for neural crest specification  
Development 130(26):6441-6452



**Tuynder M, Fiucci G, Prieur S, Lespagnol A, Géant A, Beaucourt S, Duflaut D, Besse S, Susini L, Cavarelli J, Moras D, Amson R, Telerman A (2004)**

Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion  
Proc Natl Acad Sci U S A 101(43):15364-15369

**Tuynder M, Susini L, Prieur S, Besse S, Fiucci G, Amson R, Telerman A (2002)**

Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1  
Proc Natl Acad Sci U S A 99(23):14976-14981

**Urist MR (1965)**

Bone formation by autoinduction  
Science 150(698): 893-899

**Varga AC und Wrana JL (2005)**

The disparate role of BMP in stem cell biology  
Oncogene. 24(37):5713-5721

**Vitt UA, Mazerbourg S, Klein C, Hsueh AJ (2002)**

Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9  
Biol Reprod. 67(2):473-480

**von Bubnoff A und Cho KWY (2001)**

Intracellular BMP signalling regulation in vertebrates: pathway or network?  
Developmental Biology 239: 1-14

**Wagner TU (2007)**

Bone morphogenetic protein signaling in stem cells--one signal, many consequences  
FEBS J. 274(12):2968-2976.

**Wan M und Cao X (2004)**

BMP signaling in skeletal development  
Biochem Biophys Res Commun. 328(3):651-657

**Wang EA, Israel DI, Kelly S, Luxenberg DP (1993)**

Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells  
Growth Factors. 9(1):57-71

**Wek RC, Jiang HY, Anthony TG (2006)**

Coping with stress: eIF2 kinases and translational control  
Biochem Soc Trans. 34(Pt 1):7-11

**Wiater E und Vale W (2003)**

Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling  
J Biol Chem. 278(10):7934-7941

**Wikesjö UM, Huang YH, Polimeni G, Qahash M (2007)**

Bone morphogenetic proteins: a realistic alternative to bone grafting for alveolar reconstruction  
Oral Maxillofac Surg Clin North Am. 19(4):535-551

**Willette RN, Gu JL, Lysko PG, Anderson KM, Minehart H, Yue T (1999)**  
BMP-2 gene expression and effects on human vascular smooth muscle cells  
J Vasc Res.;36(2):120-125

**Williams BR (1999)**  
PKR; a sentinel kinase for cellular stress  
Oncogene. 18(45):6112-6120

**Wong SC, Chan JK, Lee KC, Hsiao WL (2001)**  
Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3, and their relationships to cell proliferation, apoptosis, and tumour progression in invasive ductal carcinoma of the breast  
J Pathol. 194(1):35-42

**Wozney JM (1989)**  
Bone morphogenetic proteins  
Progress in Growth Factor Research 1: 267-280

**Wozney JM (2002)**  
Overview of bone morphogenetic proteins  
Spine. 27(16 Suppl 1):S2-8

**Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988)**  
Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities  
Science 242: 1528-1534

**Wrana JL, Tran H, Attisano L, Arora K, Childs SR, Massagué J, O'Connor MB (1994)**  
Two distinct transmembrane serine/threonine kinases from *Drosophila melanogaster* form an activin receptor complex  
Mol Cell Biol. 14(2):944-50

**Xiao Z, Watson N, Rodriguez C, Lodish HF (2001)**  
Nucleocytoplasmic shuttling of Smad1 conferred by its nuclear localization and nuclear export signals  
J Biol Chem. 276(42):39404-39410

**Yamada N, Kato M, ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Heldin C-H, Miyazono K, Funahashi K. (1996)**  
Bone morphogenetic protein type IB receptor is progressively expressed in malignant glioma tumours  
British Journal of Cancer Vol. 73: 624-629

**Yamaguchi A, Ishizuya T, Kintou N, Wada Y, Katagiri T, Wozney JM, Rosen V, Yoshiki S (1996)**  
Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6  
Biochem Biophys Res Commun. 220(2):366-371

**Yamaji N, Celeste AJ, Thies RS, Song JJ, Bernier SM, Goltzman D, Lyons KM, Nove J, Rosen V, Wozney JM (1994)**

A mammalian serine/threonine kinase receptor specifically binds BMP-2 and BMP-4  
Biochem Biophys Res Commun. 205(3):1944-1951

**Yamamoto Y und Oelgeschläger M (2004)**

Regulation of bone morphogenetic proteins in early embryonic development  
Naturwissenschaften 91(11):519-34

**Younes A und Kadin ME (2003)**

Emerging applications of the tumor necrosis factor family of ligands and receptors in cancer therapy

J Clin Oncol 21(18):3526-3534

**Zheng L, Schickling O, Peter ME, Lenardo MJ (2001)**

The death effector domain-associated factor plays distinct regulatory roles in the nucleus and cytoplasm

J Biol Chem. 276(34):31945-31952

**Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH (1999)**

A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation  
Nature 400(6745):687-693

## 6. Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1.1.</b>	Beziehungen zwischen Liganden, Rezeptoren und Smads in der TGF- $\beta$ Superfamilie (nach Shimasaki et al., 2004).....	4
<b>Tab. 3.1.</b>	Liste der veränderten, Apoptose-assoziierte Gene in der Gruppe „Inkubation“ .....	45
<b>Tab. 3.2.</b>	Vergleich der Microarray-Daten mit den Ergebnissen der realtime-PCR nach Inkubation mit unterschiedlichen BMP-2 Konzentrationen.....	47
<b>Tab. 3.3.</b>	Kreuztabelle BMP-2/pT, n = 938.....	74
<b>Tab. 3.4.</b>	Kreuztabelle BMP-2/Grading, n = 1847.....	75
<b>Tab. 3.5.</b>	Kreuztabelle BMP-2/Mitosen, n = 1847.....	76
<b>Tab. 3.6.</b>	Kreuztabelle BMP-2/Cyclin D1, n = 1801.....	76
<b>Tab. 3.7.</b>	Kreuztabelle BMP-2/Bcl2, n = 1656.....	77
<b>Tab. 3.8.</b>	Kreuztabelle BMP-2/SFRP1, n = 1871.....	77
<b>Tab. 3.9.</b>	Zusammenstellung der Kaplan-Meier-Überlebensanalysen bezüglich BMP-2 A – in Abhängigkeit der Histologie B- nur duktal-invasive Karzinome bezüglich des Nodalstatus.....	79
<b>Tab. 3.10.</b>	Gruppierung der BMP-Expression nach dem Remmele Score.....	82
<b>Tab. 3.11.</b>	Vergleich der BMP-2 Expressionsstärke zwischen Tumor- (TG) und Normalgewebe (NG).....	83

## 7. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.1.</b>	Sekundärstruktur des BMP-2 Monomers (Scheuffler et al., 1999).....	3
<b>Abb. 1.2.</b>	Signaltransduktion der BMPs (Shimasaki et al., 2004).....	5
<b>Abb. 3.1.</b>	Darstellung der veränderten Gene in der jeweiligen Subgruppe unterteilt in hoch-(grün) und herunterregulierte (rot) Gene.....	37
<b>Abb. 3.2.</b>	Ergebnisse der funktionellen Analyse nach Gene Ontology (Level 3).....	39
<b>Abb. 3.3.</b>	Darstellung der tumorassoziierten Prozesse auf Basis der funktionellen Klassifizierung mittels Gene Ontology für die Level 3-6 und Vergleich des prozentualen Anteils der veränderten Gene in den beiden Gruppen „Inkubation“ und „Überexpression“ im jeweiligen Prozess mit der Verteilung laut Gene Ontology.....	40
<b>Abb. 3.4.</b>	Stammbaum des biologischen Prozesses Apoptose laut Gene Ontology.....	41
<b>Abb. 3.5.</b>	Darstellung des prozentualen Anteils der veränderten Gene in den Gruppen „Inkubation“ und „Überexpression“ im Vergleich zu Gene Ontology für die Apoptose-assoziierten Prozesse laut Stammbaum für die Level 3-8.....	41
<b>Abb. 3.6.</b>	Vergleich der Microarray-Daten und der Ergebnisse der realtime-PCR ausgewählter Gene für die Gruppe „Überexpression“.....	42
<b>Abb. 3.7.</b>	Vergleich der Microarray- und realtime-PCR-Daten Apoptose- assoziiierter-Gene in der Gruppe „Inkubation“.....	46
<b>Abb. 3.8.</b>	Westernblot-Analysen von PKR und der aktivierten, phosphorylierten Form p-PKR sowie seinem Substrat eIF2alpha und der phosphorylierten Form p-eIF2alpha zum Vergleich BMP-2 inkubierter MCF-7 (B) und serumfreier Kontrollen (SF) über einen Zeitraum von 24h.....	49
<b>Abb. 3.9.</b>	Bild der Agarosegelelektrophorese des EcoRV-Verdau.....	50
<b>Abb. 3.10.</b>	EcoRV-Verdau zur Analyse ausgewählter Klone auf Insertion von BMP-2	50
<b>Abb. 3.11.</b>	Differentieller Restriktionsverdau mit BamHI von identifizierten BMP-2 Klonen.....	51
<b>Abb. 3.12.</b>	Dosis-Wirkungs-Kurve von Doxycyclin bestimmt in U2-OS Luc Tet-On anhand der Luciferaseaktivität (angegeben in RLU).....	52
<b>Abb. 3.13.</b>	Bestimmung des Grades der Induktion der Luciferaseaktivität in U2-OS Luc Tet-On.....	52

<b>Abb. 3.14.</b>	Bilder der transienten Transfektion von MCF-7 Tet-On mit eGFP.....	53
<b>Abb. 3.15.</b>	Bilder der transienten Transfektion von U2-OS Luc Tet-On mit eGFP.....	54
<b>Abb. 3.16.</b>	Bilder der Agarosegelelektrophoresen der durchgeführten rt-PCRs mit den transient transfizierten U2-OS Luc Tet-On Zellen.....	55
<b>Abb. 3.17.</b>	Semiquantitative Auswertung der PCR-Reaktion der BMP-2 transfizierten U2-OS Luc Tet-On mit AIDA.....	56
<b>Abb. 3.18.</b>	Ergebnisse des Luciferase Assays von MCF-7+ pTRE-Luc.....	57
<b>Abb. 3.19.</b>	Bilder der Agarosegelelektrophoresen der durchgeführten rt-PCRs mit den transient transfizierten MCF-7 Tet-On.....	58
<b>Abb. 3.20.</b>	Semiquantitative Auswertung der PCR-Reaktion der BMP-2 transfizierten MCF-7 Tet-On mit AIDA.....	58
<b>Abb. 3.21.</b>	Bilder der stabilen Transfektion von MCF-7 Tet-On mit eGFP.....	59
<b>Abb. 3.22.</b>	Morphologie der MCF-7 Tet-on Zellen nach der Transfektion.....	60
<b>Abb. 3.23.</b>	Phasenkontrastaufnahmen während der Etablierung stabiler Klon.....	61
<b>Abb. 3.24.</b>	Bilder der Agarosegelelektrophorese der durchgeführten PCRs zur Analyse der stabilen Klone.....	61
<b>Abb. 3.25.</b>	Auswertung der Ergebnisse der realtime-PCR für ausgewählte stabile Klone.....	62
<b>Abb. 3.26.</b>	Häufigkeiten der BMP-2 Expression auf Grundlage des Remmele Scores	64
<b>Abb. 3.27.</b>	Bilder der BMP-2 Immunhistochemie eines invasiv-duktales Mammakarzinoms einer 70-jährigen Patientin, pT2N1MX, Vergrößerung 60x.....	64
<b>Abb. 3.28.</b>	heterogene Verteilung der BMP-2 Immunreaktivität.....	65
<b>Abb. 3.29.</b>	Verteilung der BMP-2 Expression, Vergrößerung 60x.....	65
<b>Abb. 3.30.</b>	Altersverteilung des Patientenkollektivs.....	66
<b>Abb. 3.31.</b>	Histologie der Mammakarzinome.....	67
<b>Abb. 3.32.</b>	Häufigkeitsverteilung der Tumorgröße nach der pTNM-Klassifikation.....	68
<b>Abb. 3.33.</b>	Häufigkeitsverteilung der Lymphknotenmetastasierung nach der pTNM-Klassifikation.....	68
<b>Abb. 3.34.</b>	Häufigkeitsverteilung des Gradings.....	69
<b>Abb. 3.35.</b>	Häufigkeiten der Östrogenrezeptor-Expression anhand des Remmele-Scores.....	69
<b>Abb. 3.36.</b>	Häufigkeiten der Progesteronrezeptor-Expression anhand des Remmele-Scores.....	70
<b>Abb. 3.37.</b>	Häufigkeiten der Her2/neu-Expression anhand des DAKO-Score.....	70

<b>Abb. 3.38.</b>	Kaplan-Meier Überlebenskurve in Abhängigkeit etablierter Prognosefaktoren.....	72
<b>Abb. 3.39.</b>	BMP-2 Immunhistochmie der Tumoren auf dem Multigewebearray „breast prognosis“.....	73
<b>Abb. 3.40.</b>	Häufigkeiten der BMP-2 Expression anhand des Remmele Scores.....	73
<b>Abb. 3.41.</b>	Kaplan-Meier-Überlebensanalyse in Abhängigkeit der BMP-2 Expression	78
<b>Abb. 3.42.</b>	Quantitative Auswertung der BMP-2 Expression bezogen auf die Probenanzahl (A) und auf die Anzahl der Gewebe (B).....	81
<b>Abb. 3.43.</b>	TOP10 der BMP-2 exprimierenden Gewebe.....	83
<b>Abb. 3.44.</b>	Zusammenhang zwischen der BMP-2 Expressionsstärke und der Tumorprogression.....	84

## 8. Material

### 8.1. Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

1x TAE	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA, pH 8,5
5x M-MLV Reaktionspuffer (Invitrogen, Karlsruhe)	250 mM Tris-HCl, pH 8,3 375 mM KCl 15 mM MgCl <sub>2</sub>
10x PCR-Puffer (QIAGEN, Hilden)	enthält 15 mM MgCl <sub>2</sub>
Citratpuffer	0,01 M, pH 6,0
Diluent-Puffer	1% Rinderserumalbumin ( $\gamma$ -globulinfrei) 0,05 M Tris/HCl 0,1% Tween 1 mg/ml Natriumazid
Dithiothreitol (DTT)-Lösung für cDNA-Synthese	0,1M
DNA-Ladungspuffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA 0,1% (w/v) SDS 30% (v/v) Glycerin 0,005% (w/v) Bromphenolblau
Einfriermedium für Zellen	80% DMEM 20% FCS 10% DMSO (Dimethylsulfoxid)
Laufpuffer für SDS-PAGE	25 mM Trisbase 0,19 M Glycin 1% (w/v) SDS
LB-Agarplatten	400 ml LB-Medium 6,5 g Agar-Agar 400 $\mu$ l Ampicillin
LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)	10 g Bacto-Trypton 5g Bacto-Yeastextrakt 10 g NaCl → mit Aqua dest.auf 1 l aufgefüllt Autoklavieren



---

PBS für IHC	0,05 M, pH 7,5 17 g NaCl 0,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O mit Aqua dest. auf 2l
PBS-T	0,025% (v/v) Tween-20 1x D-PBS
Proteinladepuffer	65 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,01% (w/v) Bromphenolblau 5% (v/v) Mercaptoethanol 10% (v/v) Glycerol 2% (w/v) Natriumdodecylsulfat
Proteinlysepuffer	20 mM HEPES, pH 7,5 150mM NaCl 10 mM EDTA, pH 8,0 2 mM EGTA, pH 8,0 1% (v/v) Triton-X-100 10mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 50mM NaF 2mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (0,1M, 15min bei 95°C) <i>Proteaseinhibitoren:</i> 10µg/ml Aprotinin 1µM Pepstatin 10µM Leupeptin 500 µg/ml PefaBloc
Rehydridisierungspuffer	100 mM Mercaptoethanol 2% (w/v) SDS 6,25 mM Tris-HCl, pH 8,0
Substrat-Chromogen-Reagenz	1,5 µmol/l DAB 10 mmol/l H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,05 M PBS, pH 7,5
Transferpuffer	25 mM Tris 0,19 M Glycin 20% Methanol 0,037% (w/v) SDS

## 8.2. Chemikalien

1 kb Längenstandard	Invitrogen, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, München

---

Bacto-Trypton	BD, Heidelberg
Bacto-Yeastextrakt	BD, Heidelberg
Bradford-Reagenz	Sigma, München
Bromphenolblau	Sigma, München
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DAB (3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid)	Sigma, München
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Sigma, München
dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	NEB, Ipswich/GB
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma, München
Ethanol	J.T. Baker, Griesheim
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Sigma, München
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hämalaun	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isoton II	Beckmann Coulter, Krefeld
Kanadabalsam	Laborchemie, Apolda
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Sigma, München
Methanol	Roth, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma, München
Natriumazid	Sigma, München
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Oligo-(dT) <sub>15</sub> -Primer (0,2 mg/ml)	Roche, Mannheim
PCR-grade Wasser	Roche, Mannheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
Rainbow-Marker	BioRad, München
Random-Hexamerprimer (0,2 mg/ml)	Fermentas, St. Leon-Rot
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, München
RNaseOUT™-Ribonuklease(40U/μ)	Invitrogen, Karlsruhe
Cruz-Marker™ MW Standards	Santa Cruz, Heidelberg
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma, München
Trisbase	Sigma, München
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma, München
Tween-20	Sigma, München
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
Xylol	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe
EGTA	Sigma, München
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Sigma, München
NaF	ICN, Eschwege
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma, München
Aprotinin	Roche, Mannheim
Pepstatin	Roche, Mannheim
Leupeptin	Roche, Mannheim
PefaBloc	Roche, Mannheim
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, München

### 8.3. Chemikalien für Zellkultur

Doxycyclin	BD Clontech, Heidelberg
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung (D-PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS) 10% (v/v)	Biochrom Seromed, Berlin
Hygromycin	BD, Heidelberg
Tet-System approved FCS (USDA) 10% (v/v)	BD Clontech, Heidelberg
Trypsin-EDTA (0,25% Trypsin, 1mM EDTA)	Invitrogen, Karlsruhe

### 8.4. verwendete Kits

Affymetrix Array HG-U133A	Affymetrix, Santa Clara/USA
BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kit	Enzo Life Science, Farmington/USA
DTCS (Dye terminator cycle sequencing) Kits	Beckmann Coulter, Krefeld
ECL-Kit (Enhanced Chemolumineszenz)	Amersham Bioscience, Freiburg
Gelextraktionskit QIAEX <sup>®</sup> II	QIAGEN, Hilden
innuPREP RNA Mini Kit	AnalytikJena, Jena
One Shot TOP 10F' (chemically competent E.coli)	Invitrogen, Karlsruhe
Luciferase Reporter Assay Kit	BD Clontech, Heidelberg
Nucleofektionskit V	amaxa, Köln
QIAGEN Plasmid-Aufreinigungskit	QIAGEN, Hilden
realtime kit	Roche, Mannheim
SuperScript Choice System	Invitrogen, Karlsruhe
Vectastein Elite <sup>®</sup> ABC-Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame/USA

### 8.5. Enzyme

BamHI	Invitrogen, Karlsruhe
EcoRV	Invitrogen, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase (200U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	QIAGEN, Hilden

### 8.6. Verbrauchsmaterialien

0,2 μm Sterilfilter	Millipore, Schwalbach
6-, 12-, 24-, 48, 96-well Platten	Greiner, Frickenhausen
96-well PCR-Platten	Eppendorf, Hamburg
CapStrips	Eppendorf, Hamburg
Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Falcon, Heidelberg
Filterpapiere für Western blot	Bio-Rad, München
Folien für PCR	Eppendorf, Hamburg
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen

PVDF-Membran  
 Objektträger Super-Frost Plus  
 Polyacrylamidgele  
 Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2ml)  
 serologische Pipetten  
 Zellkulturflaschen (25cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>)

Bio-Rad, München  
 Menzel, Braunschweig  
 Bio-Rad, München  
 Eppendorf, Hamburg  
 Greiner, Frickenhausen  
 Greiner, Frickenhausen

## 8.7. Laborgeräte

Bakterienschüttler GFL-3031  
 Beckmann Coulter Z1  
 Brutschränke  
 Fluidics Station  
 Gelapparatur  
 Geldokumentation Gel Jet Imager  
 HeatSealer  
 Laminarboxen  
 LAS-3000 (Luminescent Image Analysis System)  
 Luminometer LUMISar  
 Mastercycler<sup>®</sup> ep *realplex*  
 Mikroarray-Chip-Lesegerät,  
 Gene Chip Instrument System  
 Mikroskop Axiovert 25  
 NanoDrop-1000

Nucleofektor  
 Schlittenmikrotom  
 Schüttler Eppendorf  
 „Semi-Dry“-Westernblot-Apparatur  
 Sequenzierer CEQ 8000  
 SpeedVac  
 Trio Thermoblock  
 Zentrifuge 5415 D  
 Zentrifuge 5810 R  
 Zentrifuge 5417 C  
 CoverPlates  
 Zentrifuge 5417 R

hilab, Düsseldorf  
 Beckmann Coulter, Krefeld  
 Heraeus, Hanau  
 Affymetrix, Santa Clara/USA  
 Bio-Rad, München  
 Intas, Göttingen  
 Eppendorf, Hamburg  
 Heraeus, Hanau  
 Fujifilm, Düsseldorf  
 BMG Labtech, Offenburg  
 Eppendorf, Hamburg  
 Affymetrix, Santa Clara/USA

Carl Zeiss, Jena  
 NanoDrop Technologies,  
 Wilmington/USA  
 amaxa, Köln  
 PFM, Köln  
 Eppendorf, Hamburg  
 Bio-Rad, München  
 Beckmann Coulter, Krefeld  
 Savant, Ramsey/USA  
 Biometra, Göttingen  
 Eppendorf, Hamburg  
 Eppendorf, Hamburg  
 Eppendorf, Hamburg  
 Shandon, Frankfurt  
 Eppendorf, Hamburg

## 8.8. Primer

Sequenzen der verwendeten Primer

Primername	Länge PCR- Produkt	Annealing- Temp.	Primersequenzen (s – sense, a – antisense)
ARHT1	230 bp	60°C	s: AAGCAATTAGCAGAGGCGTTA a: AACACTTGGTGACACATGCAG
BAG5	228 bp	60°C	s: AAGGCCTGATTGGTCCTACC a: TGCTGGTCCTTTATCCCTTC
BAX	148 bp	60°C	s: TTCATCCAGGATCGAGCAG a: TCCTCTGCAGCTCCATGTTA
BCL7C	257 bp	61°C	s: CCTCTCATCCTGCTGGATCTT a: TCTGGAACAGGCTCCTCCT
beta-Aktin	712 bp	60,5°C	s: CGG GAA ATC GTG CGT GAC AT a: GAA CTT TGG GGG ATG CTC GC
BMP-2	671 bp	60°C	s: TCATAAAACCTGCAACAGCCACATCG a: GCTGTACTAGCGACACCCAC
BTF	160 bp	60°C	s: CTCCTCCTCCCTGTTTGTC a: TCAAAAATCAGTCACCCTACGA
CASP8AP2	289 bp	60°C	s: CCAAAATGAAAGCAACAGTGA a: GCTAGGCAAAGCCGTTTATG
CD24	151 bp	60°C	s: AAGGTGGAGCAAACACAACC a: AGCTTTTTCTTCTGCCACA
DOCK1	298 bp	60°C	s: CTCCTGATTTCCCCTGCATA a: ATCATTGGTGGACGCCTATT
FAIM	260 bp	60°C	s: TCCAGAGATTGCAAGTTAATG a: GGTCCATATCTTATTTGCCATTTG
IGFBP5	190 bp	58°C	s: TAGCCACATGGATAGCACA a: GGAGAGAACAGAGTTATGGTATGAA
LIF	184 bp	59°C	s: TCTCCGGGCCCTTATTTATT a: GCTCCAACCCACACACTAT
NCKAP1	217 bp	60°C	s: TGGATGTGCATTTCTGTGATG a: ACAGGGCACCATGGAAGTTA
PAWR	219 bp	59°C	s: TTCCTATGCTGCAATACATTA a: AACGGCTGTGACTTTAAACCAT

PKR	260 bp	60°C	s: GCCACCCACCCAATAATTT a: TGGCCTAAAAGCGGTAGAAA
PPP1R3C	231 bp	59°C	s: CCATCCCTTGCCTATTTTCA a: TACTTTTCCACCATGGCACA
PRKCN	151 bp	59°C	s: TTTTCCCTGTGATAGAGGATGA a: GCAAACAAACATCGTTCCAG
pTet_neo	164 bp	56°C	s: GCTCTTCGTCCAGATCATCC a: TGCTCCTGCCGAGAAAGTAT
pTet-On	163 bp	54°C	s: ACGCGTTATATGCACTCAGC a: TCTGCACCTTGGTGATCAAA
pTRE_hyg	199 bp	54°C	s: ACATTGTTGGAGCCGAAATC a: CGCAAGGAATCGGTCAATAC
RYBP	239 bp	60°C	s: TTTGCCCAGAAAGACAGCTT a: GTCGTGCACATGCCAGTAAC
Sequenzierungs- primer			s: CGGGGATCCTCTAGTCAGC a: CAACAGATGGCTGGCAACTA
TIA1	215 bp	60°C	s: CGTGCCCAGTCTGATCTTTA a: AGTCCGAACTCCATGAGACG
TNFRSF5	300 bp	60°C	s: TACGAGTGAGGCCTGTGAGA a: ACCAAGAGGATGGCAAACAG
TPT1	203 bp	60°C	s: ATGAATCCAGATGGCATGGT a: TGACATCAGTCCCGTTTGTC
VEGF	168 bp	57°C	s: TCTCCCTGATCGGTGACAGT a: CACAAATACAAGTTGCCCAAT

---

## 8.9. Antikörper

### 8.9.1. Primäre Antikörper

<b>Antikörper (Proteingröße)</b>	<b>Hersteller</b>
beta-Aktin (43 kDa) goat polyclonal antibody (I-19, sc-1616)	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
BMP-2 (18 kDa) goat polyclonal antibody (N-14, sc-6895)	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
eIF2alpha (36 kDa) rabbit polyclonal antibody (FL-315, sc-11386)	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
p-eIF2alpha (36 kDa) (Ser 52): goat polyclonal antibody (sc-12412)	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
PKR (68 kDa) rabbit polyclonal antibody (N-18, sc-709)	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
p-PKR (68 kDa) (Thr 451): goat polyclonal antibody (sc-16815)	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg

### 8.9.2. Sekundäre Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
donkey anti-goat IgG-HRP (sc-2020)	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
goat anti-rabbit IgG-HRP (sc-2004)	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg

## 9. Anhang

### 9.1. Liste veränderter Gene

#### 9.1.1. Liste veränderter Gene in der Gruppe „Inkubation“

Veränderte Gene aus 4h Inkubation von MCF-7 mit BMP-2 gegen serumfrei

- die Gene müssen auf beiden Arrays eindeutig meß- und quantifizierbar sein
- Grenzwert: 2-fach verändert; gleiche Spot-Loci müssen Tendenz bestätigen

Affymetrix-ID	BMP2 4h/SF	Gensymbol	Name des Gens
221798_x_at	0,11	RPS2	ribosomal protein S2
207783_x_at	0,14	TPT1	tumor protein, translationally-controlled 1
203416_at	0,21	CD53	CD53 antigen
211339_s_at	0,27	ITK	IL2-inducible T-cell kinase
207865_s_at	0,30	BMP8B	bone morphogenetic protein 8b (osteogenic protein 2)
203735_x_at	0,36	PPFIBP1	PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1)
203412_at	0,36	LZTR1	leucine-zipper-like transcriptional regulator, 1
204509_at	0,36	FLJ20151	hypothetical protein FLJ20151
221881_s_at	0,36	CLIC4	chloride intracellular channel 4
35150_at	0,37	TNFRSF5	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5
214594_x_at	0,37	ATP8B1	ATPase, Class I, type 8B, member 1
218196_at	0,38	OSTM1	osteopetrosis associated transmembrane protein 1
206353_at	0,38	COX6A2	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2
218342_s_at	0,39	KIAA1815	KIAA1815
220173_at	0,39	C14orf45	chromosome 14 open reading frame 45
221155_x_at	0,39	PRO1496	hypothetical protein PRO1496
207684_at	0,40	TBX6	T-box 6
208523_x_at	0,41	HIST1H2BI	histone 1, H2bi
213897_s_at	0,41	MRPL23	mitochondrial ribosomal protein L23
202140_s_at	0,41	CLK3	CDC-like kinase 3
203187_at	0,41	DOCK1	dedicator of cytokinesis 1
200814_at	0,42	PSME1	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1 (PA28 alpha)
208410_x_at	0,42	AMELX	amelogenin (amelogenesis imperfecta 1, X-linked)
206900_x_at	0,42	LOC114977	hypothetical protein BC014148
220368_s_at	0,42	KIAA2010	KIAA2010
48117_at	0,43	LOC112869	hypothetical protein BC011981
220366_at	0,43	ELSPBP1	epididymal sperm binding protein 1
206134_at	0,43	ADAMDEC1	ADAM-like, decysin 1
207159_x_at	0,43	MECT1	mucoepidermoid carcinoma translocated 1
207318_s_at	0,43	CDC2L5	cell division cycle 2-like 5 (cholinesterase-related cell division controller)
218291_at	0,45	MAPBPIP	mitogen-activated protein-binding protein-interacting protein
217164_at	0,45	TIA1	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein
220032_at	0,45	FLJ21986	hypothetical protein FLJ21986
201083_s_at	0,45	BTF	Bcl-2-associated transcription factor
211504_x_at	0,46	ROCK2	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2
216680_s_at	0,46	EPHB4	EphB4
218737_at	0,46	SBNO1	sno, strawberry notch homolog 1 (Drosophila)
202251_at	0,46	PRPF3	PRP3 pre-mRNA processing factor 3 homolog (yeast)



211114_x_at	0,46	SIP1	survival of motor neuron protein interacting protein 1
219072_at	0,47	BCL7C	B-cell CLL/lymphoma 7C
221196_x_at	0,47	C6.1A	c6.1A
213149_at	0,47	DLAT	dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex)
201310_s_at	0,47	C5orf13	chromosome 5 open reading frame 13
205016_at	0,48	TGFA	transforming growth factor, alpha
212350_at	0,48	TBC1D1	TBC1 (tre-2/USP6, BUB2, cdc16) domain family, member 1
202995_s_at	0,48	FBLN1	fibulin 1
204490_s_at	0,48	CD44	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)
204985_s_at	0,48	MGC2650	hypothetical protein MGC2650
210651_s_at	0,48	EPHB2	EphB2
219535_at	0,49	HUNK	hormonally upregulated Neu-associated kinase
214847_s_at	0,49	C6orf9	chromosome 6 open reading frame 9
214421_x_at	0,49	CYP2C9	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9
221729_at	0,49	COL5A2	collagen, type V, alpha 2
212119_at	0,49	ARHQ	ras homolog gene family, member Q
202648_at	0,49	RPS19	ribosomal protein S19
211696_x_at	0,49	HBB	hemoglobin, beta /// hemoglobin, beta
203514_at	0,49	MAP3K3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3
214017_s_at	0,49	DHX34	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 34
220202_s_at	0,49	MNAB	membrane-associated nucleic acid binding protein
212109_at	0,49	C16orf34	chromosome 16 open reading frame 34
204145_at	0,49	FRG1	FSHD region gene 1
206108_s_at	0,49	SFRS6	splicing factor, arginine/serine-rich 6
210314_x_at	0,50	TNFSF13	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13
203433_at	0,50	MTHFS	5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase (5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase)
214946_x_at	0,50	FLJ10824	hypothetical protein FLJ10824
204788_s_at	0,50	PPOX	protoporphyrinogen oxidase
200793_s_at	0,50	ACO2	aconitase 2, mitochondrial
209259_s_at	2,00	CSPG6	chondroitin sulfate proteoglycan 6 (bamacan)
221012_s_at	2,00	TRIM8	tripartite motif-containing 8 /// tripartite motif-containing 8
203983_at	2,00	TSNAX	translin-associated factor X
203097_s_at	2,00	PDZGEF1	PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1
221652_s_at	2,00	FLJ10637	hypothetical protein FLJ10637
220422_at	2,00	UBQLN3	ubiquilin 3
202439_s_at	2,00	IDS	iduronate 2-sulfatase (Hunter syndrome)
218877_s_at	2,00	C6orf75	chromosome 6 open reading frame 75
210141_s_at	2,00	INHA	inhibin, alpha
213549_at	2,01	SLC18A2	solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2
212847_at	2,01	nexilin	likely ortholog of rat F-actin binding protein nexilin
209963_s_at	2,02	EPOR	erythropoietin receptor
208882_s_at	2,03	DD5	progesterin induced protein
213056_at	2,04	GRSP1	GRP1-binding protein GRSP1
213025_at	2,04	FLJ20274	hypothetical protein FLJ20274
209903_s_at	2,05	ATR	ataxia telangiectasia and Rad3 related
202984_s_at	2,06	BAG5	BCL2-associated athanogene 5
201845_s_at	2,06	RYBP	RING1 and YY1 binding protein
209750_at	2,06	NR1D2	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
221104_s_at	2,06	NIPSNAP3B	nipsnap homolog 3B (C. elegans)

204076_at	2,07	LYSAL1	lysosomal apyrase-like 1 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4)
218344_s_at	2,08	FLJ10876	hypothetical protein FLJ10876
218404_at	2,08	SNX10	sorting nexin 10
47560_at	2,08	LPHN1	latrophilin 1
202855_s_at	2,08	SLC16A3	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3
202850_at	2,09	ABCD3	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3
202181_at	2,10	KIAA0247	KIAA0247
214093_s_at	2,10	FUBP1	far upstream element (FUSE) binding protein 1
212476_at	2,10	CENTB2	centaurin, beta 2
209152_s_at	2,11	TCF3	transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)
209430_at	2,11	BTAF1	BTAF1 RNA polymerase II, B-TFIID transcription factor-associated, 170kDa (Mot1 homolog, <i>S. cerevisiae</i> )
213701_at	2,12	DKFZp434N2030	hypothetical protein DKFZp434N2030
203845_at	2,12	PCAF	p300/CBP-associated factor
212566_at	2,13	MAP4	microtubule-associated protein 4
210512_s_at	2,14	VEGF	vascular endothelial growth factor
212499_s_at	2,14	C14orf32	chromosome 14 open reading frame 32
214658_at	2,15	CGI-109	CGI-109 protein
204054_at	2,15	PTEN	phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)
201153_s_at	2,16	MBNL1	muscleblind-like ( <i>Drosophila</i> )
1053_at	2,16	RFC2	replication factor C (activator 1) 2, 40kDa
213017_at	2,17	ABHD3	abhydrolase domain containing 3
201713_s_at	2,17	RANBP2	RAN binding protein 2
217678_at	2,18	SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11
207738_s_at	2,18	NCKAP1	NCK-associated protein 1
213070_at	2,18	PIK3C2A	phosphoinositide-3-kinase, class 2, alpha polypeptide
201816_s_at	2,18	GBAS	glioblastoma amplified sequence
204190_at	2,19	D13S106E	highly charged protein
204165_at	2,19	WASF1	WAS protein family, member 1
212867_at	2,19	NCOA2	nuclear receptor coactivator 2
214077_x_at	2,19	MEIS3	Meis1, myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog 3 (mouse)
209628_at	2,19	NXT2	nuclear transport factor 2-like export factor 2
218598_at	2,20	FLJ11785	Rad50-interacting protein 1
222201_s_at	2,20	CASP8AP2	CASP8 associated protein 2
215245_x_at	2,21	FMR1	fragile X mental retardation 1
218304_s_at	2,22	OSBPL11	oxysterol binding protein-like 11
218236_s_at	2,23	PRKCN	protein kinase C, nu
204314_s_at	2,23	CREB1	cAMP responsive element binding protein 1
221561_at	2,23	SOAT1	sterol O-acyltransferase (acyl-Coenzyme A: cholesterol acyltransferase) 1
208021_s_at	2,24	RFC1	replication factor C (activator 1) 1, 145kDa /// replication factor C (activator 1) 1, 145kDa
218323_at	2,24	ARHT1	ras homolog gene family, member T1
209896_s_at	2,24	PTPN11	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 (Noonan syndrome 1)
221845_s_at	2,24	SKD3	suppressor of potassium transport defect 3
203216_s_at	2,24	MYO6	myosin VI

218197_s_at	2,25	OXR1	oxidation resistance 1
214835_s_at	2,26	SUCLG2	succinate-CoA ligase, GDP-forming, beta subunit
218820_at	2,27	C14orf132	chromosome 14 open reading frame 132
208184_s_at	2,27	TMEM1	transmembrane protein 1
220643_s_at	2,27	FAIM	Fas apoptotic inhibitory molecule
213297_at	2,27	NOLA2	nucleolar protein family A, member 2 (H/ACA small nucleolar RNPs)
201541_s_at	2,27	ZNHIT1	zinc finger, HIT domain containing 1
218588_s_at	2,27	C5orf3	chromosome 5 open reading frame 3
211379_x_at	2,28	B3GALT3	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 3
208673_s_at	2,28	SFRS3	splicing factor, arginine/serine-rich 3
203956_at	2,28	ZCWCC1	zinc finger, CW-type with coiled-coil domain 1
206653_at	2,30	RPC32	polymerase (RNA) III (DNA directed) (32kD)
217501_at	2,30	CIAO1	WD40 protein Ciao1
203403_s_at	2,30	RNF6	ring finger protein (C3H2C3 type) 6
207798_s_at	2,31	A2LP	ataxin 2 related protein
211038_s_at	2,31	MGC12760	hypothetical protein MGC12760
219960_s_at	2,33	UCHL5	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5
213578_at	2,34	BMPR1A	bone morphogenetic protein receptor, type IA
212726_at	2,34	PHF2	PHD finger protein 2
208478_s_at	2,35	BAX	BCL2-associated X protein
201448_at	2,35	TIA1	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein
215735_s_at	2,37	TSC2	tuberous sclerosis 2
213956_at	2,37	CAP350	centrosome-associated protein 350
201382_at	2,38	SIP	Siah-interacting protein
213624_at	2,38	SMPDL3A	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A
202502_at	2,39	ACADM	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain
203044_at	2,40	CHSY1	carbohydrate (chondroitin) synthase 1
218694_at	2,42	ALEX1	ALEX1 protein
203898_at	2,43	RCP9	calcitonin gene-related peptide-receptor component protein
218397_at	2,44	FANCL	Fanconi anemia, complementation group L
213374_x_at	2,45	HIBCH	3-hydroxyisobutyryl-Coenzyme A hydrolase
207986_x_at	2,46	CYB561	cytochrome b-561
209635_at	2,46	AP1S1	adaptor-related protein complex 1, sigma 1 subunit
202114_at	2,47	SNX2	sorting nexin 2
202784_s_at	2,48	NNT	nicotinamide nucleotide transhydrogenase
218713_at	2,49	NARG2	NMDA receptor-regulated gene 2
218166_s_at	2,50	HBXAP	hepatitis B virus x associated protein
204113_at	2,50	CUGBP1	CUG triplet repeat, RNA binding protein 1
203775_at	2,53	SLC25A13	solute carrier family 25, member 13 (citrin)
221899_at	2,55	CG005	hypothetical protein from BCRA2 region
213307_at	2,57	SHANK2	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2
202146_at	2,59	IFRD1	interferon-related developmental regulator 1
219177_at	2,59	BRIX	BRIX
209600_s_at	2,59	ACOX1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl
207430_s_at	2,59	MSMB	microseminoprotein, beta-
212148_at	2,60	PBX1	pre-B-cell leukemia transcription factor 1
213705_at	2,63	MAT2A	methionine adenosyltransferase II, alpha
218712_at	2,63	FLJ20508	hypothetical protein FLJ20508
213795_s_at	2,66	PTPRA	protein tyrosine phosphatase, receptor type, A
204120_s_at	2,67	ADK	adenosine kinase
207405_s_at	2,70	RAD17	RAD17 homolog (S. pombe)

211764_s_at	2,72	UBE2D1	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 1 (UBC4/5 homolog, yeast)
219156_at	2,75	SYNJ2BP	synaptojanin 2 binding protein
205251_at	2,77	PER2	period homolog 2 (Drosophila)
201027_s_at	2,79	IF2	translation initiation factor IF2
218212_s_at	2,84	MOCS2	molybdenum cofactor synthesis 2
210946_at	2,87	PPAP2A	phosphatidic acid phosphatase type 2A
204005_s_at	2,87	PAWR	PRKC, apoptosis, WT1, regulator
204291_at	2,91	KIAA0335	KIAA0335 gene product
213483_at	2,93	KIAA0073	KIAA0073 protein
213526_s_at	3,05	F25965	protein F25965
220305_at	3,12	KIAA1271	KIAA1271 protein
219540_at	3,13	ZNF267	zinc finger protein 267
218774_at	3,24	DCPS	mRNA decapping enzyme
221761_at	3,25	ADSS	adenylosuccinate synthase
204211_x_at	3,28	PRKR	protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent
201304_at	3,29	NDUFA5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 5, 13kDa
210111_s_at	3,31	KIAA0265	KIAA0265 protein
204333_s_at	3,39	AGA	aspartylglucosaminidase
201218_at	3,49	CTBP2	C-terminal binding protein 2
220703_at	3,59	HT009	uncharacterized hypothalamus protein HT009
213743_at	3,64	CCNT2	cyclin T2
212255_s_at	3,80	ATP2C1	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, type 2C, member 1
215050_x_at	4,40	MAPKAPK2	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2
211698_at	5,08	CRI1	CREBBP/EP300 inhibitory protein 1
52285_f_at	5,18	FLJ12542	hypothetical protein FLJ12542

### 9.1.2. Liste veränderter Gene in der Gruppe „Überexpression“

Veränderte Gene aus v3.1 (Leervektor) MCF-7 gegen BMP-2 überexprimierende (vBMP-2) MCF-7

- die Gene müssen auf beiden Arrays eindeutig meß- und quantifizierbar sein
- Grenzwert: 2-fach verändert; gleiche Spot-Loci müssen Tendenz bestätigen

Affymetrix-ID	vBMP2/v3.1	Gensymbol	Gene Title
209813_x_at	0,01	TRGV9	T cell receptor gamma variable 9
207302_at	0,03	SGCG	sarcoglycan, gamma (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)
215806_x_at	0,05		
211144_x_at	0,05		
216920_s_at	0,06	TRG@	T cell receptor gamma locus
202664_at	0,06		
202663_at	0,22		
202665_s_at	0,49	WASPIP	Wiskott-Aldrich syndrome protein interacting protein
205498_at	0,07	GHR	growth hormone receptor
202391_at	0,09	BASP1	brain abundant, membrane attached signal protein 1
203638_s_at	0,10	FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2 (bacteria-expressed kinase, keratinocyte growth factor receptor, craniofacial dysostosis 1, Crouzon syndrome, Pfeiffer syndrome, Jackson-Weiss syndrome)

57588_at	0,14	SLC24A3	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 3
201718_s_at	0,15	EPB41L2	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2
204041_at	0,15	MAOB	monoamine oxidase B
204597_x_at	0,15		
204595_s_at	0,24	STC1	stanniocalcin 1
217528_at	0,16		
206166_s_at	0,43	CLCA2	chloride channel, calcium activated, family member 2
209581_at	0,17	HRASLS3	HRAS-like suppressor 3
206230_at	0,17	LHX1	LIM homeobox 1
209443_at	0,17	SERPINA3	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3
204044_at	0,18	QPRT	quinolinate phosphoribosyltransferase (nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase (carboxylating))
205870_at	0,20	BDKRB2	bradykinin receptor B2
214953_s_at	0,21		amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease)
200602_at	0,22	APP	
212977_at	0,21	CMKOR1	chemokine orphan receptor 1
206440_at	0,21	LIN7A	lin-7 homolog A (C. elegans)
204971_at	0,22	CSTA	cystatin A (stefin A)
202376_at	0,23	SERPINA3	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3
221024_s_at	0,23	SLC2A10	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 10
202575_at	0,24	CRABP2	cellular retinoic acid binding protein 2
206463_s_at	0,24		
214079_at	0,29	DHRS2	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2
205097_at	0,25	SLC26A2	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2
219932_at	0,25	SLC27A6	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 6
206165_s_at	0,26	CLCA2	chloride channel, calcium activated, family member 2
205527_s_at	0,26	GEMIN4	gem (nuclear organelle) associated protein 4
204284_at	0,26	PPP1R3C	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C
49452_at	0,27		
43427_at	0,27	ACACB	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta
207716_at	0,27	KRTHA8	keratin, hair, acidic, 8
222108_at	0,28	AMIGO2	amphoterin induced gene 2
200982_s_at	0,28	ANXA6	annexin A6
208963_x_at	0,28	FADS1	fatty acid desaturase 1
205066_s_at	0,29	ENPP1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
221766_s_at	0,31	C6orf37	chromosome 6 open reading frame 37
210640_s_at	0,31	GPR30	G protein-coupled receptor 30
202976_s_at	0,31		
202975_s_at	0,40		
216048_s_at	0,44	RHOBTB3	Rho-related BTB domain containing 3
215465_at	0,32	ABCA12	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 12
201825_s_at	0,32		
201826_s_at	0,36	CGI-49	CGI-49 protein
213316_at	0,34	---	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586L0120 (from clone DKFZp586L0120)
209357_at	0,34	CITED2	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2
211712_s_at	0,35		
210085_s_at	0,40	ANXA9	annexin A9

204237_at	0,35		
204235_s_at	0,39	CED-6	PTB domain adaptor protein CED-6
206070_s_at	0,35	EPHA3	EphA3
217911_s_at	0,37	BAG3	BCL2-associated athanogene 3
220087_at	0,37	BCDO1	beta-carotene 15, 15'-dioxygenase
204584_at	0,37	L1CAM	L1 cell adhesion molecule (hydrocephalus, stenosis of aqueduct of Sylvius 1, MASA (mental retardation, aphasia, shuffling gait and adducted thumbs) syndrome, spastic paraplegia 1)
203372_s_at	0,37		
203373_at	0,50	SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2
209715_at	0,38	CBX5	chromobox homolog 5 (HP1 alpha homolog, Drosophila)
205590_at	0,38	RASGRP1	RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)
46665_at	0,38	SEMA4C	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4C
201641_at	0,39	BST2	bone marrow stromal cell antigen 2
203060_s_at	0,39	PAPSS2	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2
202236_s_at	0,39	SLC16A1	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 1
218309_at	0,40	CaMKIINalpha	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
201662_s_at	0,40	FACL3	fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 3
212046_x_at	0,40	MAPK3	mitogen-activated protein kinase 3
201670_s_at	0,40	MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
209092_s_at	0,41	CGI-150	CGI-150 protein
209083_at	0,41	CORO1A	coronin, actin binding protein, 1A
208962_s_at	0,41	FADS1	fatty acid desaturase 1
202718_at	0,41	IGFBP2	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa
212364_at	0,42	MYO1B	myosin IB
213110_s_at	0,43	COL4A5	collagen, type IV, alpha 5 (Alport syndrome)
204194_at	0,43	BACH1	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1
210299_s_at	0,43	FHL1	four and a half LIM domains 1
201669_s_at	0,43	MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
210317_s_at	0,43	YWHAE	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide
209735_at	0,44	ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2
208792_s_at	0,44		clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)
208791_at	0,44	CLU	
209398_at	0,44	HIST1H1C	histone 1, H1c
209298_s_at	0,44	ITSN1	intersectin 1 (SH3 domain protein)
210731_s_at	0,44	LGALS8	lectin, galactoside-binding, soluble, 8 (galectin 8)
218303_x_at	0,44	LOC51315	hypothetical protein LOC51315
212646_at	0,44	RAFTLIN	raft-linking protein
214960_at	0,45	API5	apoptosis inhibitor 5
266_s_at	0,45		
208650_s_at	0,45	CD24	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)
212830_at	0,45	EGFL5	EGF-like-domain, multiple 5
218333_at	0,45	F-LANa	carcinoma related gene
202605_at	0,45	GUSB	glucuronidase, beta
212614_at	0,45	MRF2	modulator recognition factor 2
213302_at	0,45	PFAS	phosphoribosylformylglycinamide synthase (FGAR amidotransferase)
204688_at	0,45	SGCE	sarcoglycan, epsilon
209459_s_at	0,46	ABAT	4-aminobutyrate aminotransferase

219768_at	0,46	B7-H4	immune costimulatory protein B7-H4
212952_at	0,46	CALR	calreticulin
220999_s_at	0,46	CYFIP2	cytoplasmic FMR1 interacting protein 2
203464_s_at	0,46	EPN2	epsin 2
210028_s_at	0,46	ORC3L	origin recognition complex, subunit 3-like (yeast)
203910_at	0,46	PARG1	PTPL1-associated RhoGAP 1
203845_at	0,46	PCAF	p300/CBP-associated factor
204542_at	0,46	STHM	sialyltransferase
208831_x_at	0,46	SUPT6H	suppressor of Ty 6 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
221641_s_at	0,47	ACATE2	likely ortholog of mouse acyl-Coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial
218701_at	0,47	CGI-83	lactamase, beta 2
219615_s_at	0,47	KCNK5	potassium channel, subfamily K, member 5
204790_at	0,47	MADH7	MAD, mothers against decapentaplegic homolog 7 ( <i>Drosophila</i> )
206116_s_at	0,45		
210986_s_at	0,47	TPM1	tropomyosin 1 (alpha)
203722_at	0,48	ALDH4A1	aldehyde dehydrogenase 4 family, member A1
220329_s_at	0,48	C6orf96	chromosome 6 open reading frame 96
200873_s_at	0,48	CCT8	chaperonin containing TCP1, subunit 8 (theta)
202257_s_at	0,48	CD2BP2	CD2 antigen (cytoplasmic tail) binding protein 2
209602_s_at	0,48		
209603_at	0,49	GATA3	GATA binding protein 3
212445_s_at	0,48	NEDD4L	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like
202375_at	0,48	SEC24D	SEC24 related gene family, member D ( <i>S. cerevisiae</i> )
214033_at	0,49	ABCC6	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6
219063_at	0,49	C1orf35	chromosome 1 open reading frame 35
220176_at	0,49	C14orf127	chromosome 14 open reading frame 127
220941_s_at	0,49	C21orf91	chromosome 21 open reading frame 91
209522_s_at	0,49	CRAT	carnitine acetyltransferase
219767_s_at	0,49	CRYZL1	crystallin, zeta (quinone reductase)-like 1
218819_at	0,49	DDX26	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 26
218871_x_at	0,49	GALNACT-2	chondroitin sulfate GalNAcT-2
204078_at	0,49	SC65	synaptonemal complex protein SC65
205993_s_at	0,49	TBX2	T-box 2
203085_s_at	0,49	TGFB1	transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease)
211760_s_at	0,49	VAMP4	vesicle-associated membrane protein 4
209885_at	0,50	ARHD	ras homolog gene family, member D
213746_s_at	0,50	FLNA	filamin A, alpha (actin binding protein 280)
212675_s_at	0,50	KIAA0582	KIAA0582 protein
218558_s_at	0,50	MRPL39	mitochondrial ribosomal protein L39
213448_at	0,50	MTX1	metaxin 1
218386_x_at	0,50	USP16	ubiquitin specific protease 16
209016_s_at	2,00	KRT7	keratin 7
201411_s_at	2,04	PLEKHB2	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 2
204567_s_at	2,05	ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1
206023_at	2,05	NMU	neuromedin U
201921_at	2,06	GNG10	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 10
78047_s_at	2,07		
49679_s_at	2,31	MMP24	matrix metalloproteinase 24 (membrane-inserted)
209146_at	2,08	SC4MOL	sterol-C4-methyl oxidase-like
218793_s_at	2,10	SCML1	sex comb on midleg-like 1 ( <i>Drosophila</i> )

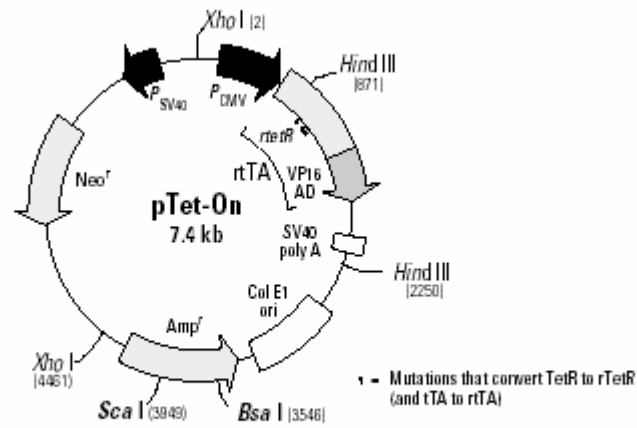
201289_at	2,12	CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
207223_s_at	2,13		
214698_at	2,46		
214697_s_at	2,71	ROD1	ROD1 regulator of differentiation 1 (S. pombe)
203192_at	2,14	ABCB6	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 6
205719_s_at	2,14	PAH	phenylalanine hydroxylase
209307_at	2,15	SWAP70	SWAP-70 protein
216594_x_at	2,16		aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)
204151_x_at	2,23	AKR1C1	
200796_s_at	2,16	MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
213261_at	2,17	KIAA0342	KIAA0342 gene product
214337_at	2,18	COPA	coatomer protein complex, subunit alpha
203426_s_at	2,02		
203425_s_at	2,19		
211958_at	2,60		
211959_at	3,97	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5
219347_at	2,20	NUDT15	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 15
209988_s_at	2,21	ASCL1	achaete-scute complex-like 1 (Drosophila)
208056_s_at	2,23	CBFA2T3	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to 3
36830_at	2,24	MIPEP	mitochondrial intermediate peptidase
202737_s_at	2,25		
202736_s_at	3,15	LSM4	LSM4 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)
215489_x_at	2,26	HOMER3	homer homolog 3 (Drosophila)
212788_x_at	2,28		
213187_x_at	2,53	FTL	ferritin, light polypeptide
204908_s_at	2,29	BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3
219522_at	2,29	FJX1	four jointed box 1 (Drosophila)
201694_s_at	2,30	EGR1	early growth response 1
205110_s_at	2,30	FGF13	fibroblast growth factor 13
206106_at	2,30	MAPK12	mitogen-activated protein kinase 12
205062_x_at	2,30	RBBP1	retinoblastoma binding protein 1
201510_at	2,31	ELF3	E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific )
212325_at	2,33	KIAA1102	KIAA1102 protein
202719_s_at	2,34	TES	testis derived transcript (3 LIM domains)
203610_s_at	2,39	TRIM38	tripartite motif-containing 38
204351_at	2,41	S100P	S100 calcium binding protein P
202437_s_at	2,42		
202436_s_at	2,71		
202435_s_at	2,95	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
219115_s_at	2,43	IL20RA	interleukin 20 receptor, alpha
203665_at	2,45	HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1
201506_at	2,46	TGFBI	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa
209587_at	2,47	PITX1	paired-like homeodomain transcription factor 1
219737_s_at	2,51	---	Homo sapiens transcribed sequence with strong similarity to protein ref:NP_065136.1 (H.sapiens) protocadherin 9 precursor; cadherin superfamily protein VR4-11 [Homo sapiens]
208885_at	2,57	LCP1	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)
205380_at	2,59	PDZK1	PDZ domain containing 1
207761_s_at	2,73	DKFZP586A0522	DKFZP586A0522 protein
218236_s_at	2,79	PRKCN	protein kinase C, nu
204623_at	2,79	TFF3	trefoil factor 3 (intestinal)



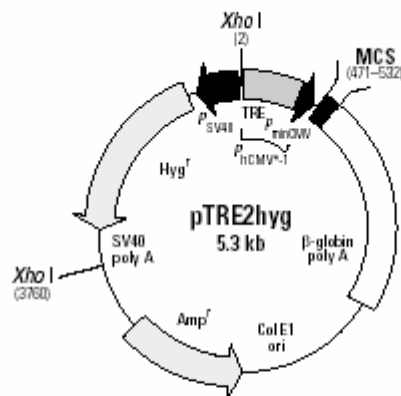
220414_at	2,87	CALML5	calmodulin-like 5
205266_at	2,97	LIF	leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)
202096_s_at	3,08	BZRP	benzodiazapine receptor (peripheral)
212599_at	3,13	AUTS2	autism susceptibility candidate 2
214590_s_at	3,20	UBE2D1	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 1 (UBC4/5 homolog, yeast)
204995_at	3,30	CDK5R1	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)
201141_at	3,35	GPNMB	glycoprotein (transmembrane) nmb
211657_at	3,36	CEACAM6	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)
36711_at	3,62	MAFF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)
201752_s_at	3,76		
201753_s_at	5,29		
205882_x_at	5,30		
201034_at	13,08	ADD3	adducin 3 (gamma)
201578_at	3,84	PODXL	podocalyxin-like
221577_x_at	4,06	PLAB	prostate differentiation factor
203453_at	4,29	SCNN1A	sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha /// sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha
203757_s_at	4,50	CEACAM6	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)
209309_at	4,93	AZGP1	alpha-2-glycoprotein 1, zinc
215625_at	5,30	---	Homo sapiens cDNA FLJ10586 fis, clone NT2RP2003986
204948_s_at	6,58	FST	follistatin
216623_x_at	8,07	TNRC9	trinucleotide repeat containing 9
214774_x_at	9,25	TNRC9	trinucleotide repeat containing 9
212531_at	9,76	LCN2	lipocalin 2 (oncogene 24p3)
217771_at	13,36	GOLPH2	golgi phosphoprotein 2
219795_at	17,03	SLC6A14	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 14
205290_s_at	21,20	BMP2	bone morphogenetic protein 2
205749_at	21,34	CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
201215_at	28,63	PLS3	plastin 3 (T isoform)
217728_at	30,70	S100A6	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)

## 9.2. Vektorkarten

### pTet-On Plasmid



### pTRE2hyg



470 480 490 500 510 520 530  
 GGGATCCTCTAGTCAGCTGACGCGTGCCTAGCGCGGCCGCATCGATAAGCTTGTCCGACGATATCTCTAG  
 BamHI PvuII MluI NheI NotI ClaI Sall EcoRV  
 Accl

## 9.3. Sequenzen

### 9.3.1. Sequenz des pTRE2hyg + BMP-2 Konstruktes

CTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGA  
AAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAG  
TGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACT  
CCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAG  
CTCGGTACCCGGGTCGAGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGA  
TCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCCG  
AATTCGAGCTCGGTACC**CGGGGATCCTCTAGTCAGC**TGACGCGGTGCTAGCGCGGCCGCATCGATAAGCTTGTCTGA  
**CGATACT**CGCA**GAATTCAGGAGGT**CGACC**ATGGTGGCCGGGACCCGCTGTCTTCTAGCGTTGCTGCT**  
**TCCCCAGGTCCTCCTGGGCGGCGCGGCTGGCCTCGTTCGGAGCTGGGCCGCAGGAAGTTCG**  
**CGGCGGCGTCGTCGGGCCGCCCTCATCCAGCCCTCTGACGAGGTCCTGAGCGAGTTCGAG**  
**TTGCGGCTGCTCAGCATGTTTCGGCCTGAAACAGAGACCCACCCCCAGCAGGGACGCCGTGGT**  
**GCCCCCTACATGCTAGACCTGTATCGCAGGCACTCAGGTCAGCCGGGCTCACCCGCCCCAG**  
**ACCACCGTTCGGAGAGGGCAGCCAGCCAGCCAACACTGTGCGCAGCTTCACCATGAAGAA**  
**TCTTTGGAAGAACTACCAGAAACGAGTGGGAAAACAACCCGGAGATTCTTCTTTAATTTAAG**  
**TTCTATCCCCACGGAGGAGTTTATCACCTCAGCAGAGCTTCAGGTTTTCCGAGAACAGATGC**  
**AAGATGCTTTAGGAAACAATAGCAGTTTCCATCACCGAATTAATATTTATGAAATCATAAAA**  
**CCTGCAACAGCCAACCTCGAAATTCCCCGTGACCAGACTTTTGGACACCAGGTTGGTGAATCA**  
**GAATGCAAGCAGGTGGGAAAGTTTTGATGTCACCCCGCTGTGATGCGGTGGACTGCACAGG**  
**GACACGCCAACCATGGATTTCGTGGTGGAAAGTGCCCACTTGGAGGAGAAACAAGGTGTCTCC**  
**AAGAGACATGTTAGGATAAGCAGGCTTTTGCACCAAGATGAACACAGCTGGTACAGATAAG**  
**GCCATTGCTAGTAACTTTTGGCCATGATGGAAAAGGGCATCCTCTCCACAAAAGAGAAAAAC**  
**GTCAAGCCAAACACAAACAGCGGAAACGCCTTAAGTCCAGCTGTAAGAGACACCCTTTGTAC**  
**GTGGACTTCAGTGACGTGGGGTGGAAATGACTGGATTGTGGCTCC**CCCGGG**GATCACGCCTT**  
**TTACTGCCACGGAGAATGCCCTTTTCTCTGGCTGATCATCTGAACTCCACTAATCATGCCA**  
**TTGTTACAGACGTTGGTCAACTCTGTTAACTCTAAGATTCTTAAGGCATGCTGTGTCCCAGACA**  
**GAACTCAGTGCTATCTCGATGCTGTACCTTGACGAGAATGAAAAGGTTGTATTAAAGAACTA**  
**TCAGGACATGGTTGTGGAGGGTGTGGGTGTCGC***TAGTACAGCAAAAATTAAATACATAAAATATATATA*  
**TANNNNNCTGCAGGAT**CCCGG**GAT**CT**CTAGAGCTGAGAACTTCAGGGTGAGTTGGGGACCCCTGATTGTTCT**  
TTTTTTTTTCGCTATTGTAATAATTCA**TGTTATATGGAGGGGGCAA**AGTTTTCAGGGTGTGTTTAGAATGGGGAAG  
ATGTCCTTGTATCACCATGGACCCTCATGATAATTTTGTCTTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATTGTC  
TCCTCTTATTTTCTTTTCACTTTCTGTAACCTTTTTCGTTAACTTTAGCTTGCATTTGTAACGAATTTTAAAT  
TCACTTTCTGTTTATTTGTCAGATTGTAAGTACTTTCTTAATCACTTTTTTTTCAAGGCAATCAGGGTAATTATA  
TTGTACTTCAGCACAGTTTTAGAGAACAATTGTTATAATTAATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTC  
TGGCTGGCGTGGAATATTCTTATTGGTAGAAACAACACTACATCCTGGTAATCATCTGCTTTCTCTTTATGGTT  
ACAATGATATACTGTTTGGATGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCTCTGCTAACCATGTTCA  
TGCCTTCTTCTTTTCTTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTGTTGIGCTGCTCATCATTTTGGCAAAGAAAT  
CACTCCTCAGGTGCAGGCTGCCTATCAGAAGGTGGTGGCTGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCACAAAATACCACTG  
AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGGTAATAAAG  
GAAATTTATTTTCAATTGCAATAGTGTGTGGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAA  
TCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAA  
GGTGGCTATAAAGAGGTTCATCAGTATATGAAACAGCCCTGCTGTCCATTCTTATCCATAGAAAAGCCTTGA  
CTTGAGGTTAGATTTTTTATATTTTGTGTTATTTTTTCTTTTAAACATCCCTAAAATTTCTTACATG  
TTTTACTAGCCAGATTTTTCTCTCTCTGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTTATGAACCTCGAC  
TGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATTTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTG  
ACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAG  
AATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGT  
TGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAA  
ACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGC  
CGTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATC  
TCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCCT  
TATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACA

GGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAA  
 GGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCA  
 AACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAG  
 AAGATCCTTTGATCTTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGA  
 GATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAATATATATG  
 AGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCAT  
 CCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAA  
 TGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCA  
 GAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCG  
 CAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGCTT  
 CATTTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCT  
 TCGGTCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATT  
 CTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGT  
 GTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCTGGGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAG  
 TGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGT  
 AACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAA  
 GGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTTCAATATT  
 ATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAG  
 GGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATA  
 AAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTCGAGGCGAGTGAATAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCT  
 ATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACCAAGTTAACAAACAATTCGATTCATTTTTATGTTTCAG  
 GTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCCT  
 CTAGAACTCTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGTGGGGCGTCCGTTTCCACTATCGGCGAGTACTTCTACACAG  
 CCATCGGTCCAGACGGCCGCGCTTCTGCGGGCGATTTGTGTACGCCCAGTCCCAGGCTCCGGATCGGACGATT  
 GCGTCGCATCGACCCCTGCGCCCAAGCTGCATCATCGAAATTCGCGTCAACCAAGCTCTGATAGAGTTGGTCAAGA  
 CCAATGCGGAGCATATACGCCCCGAGCCGCGGCGATCTGCAAGTCCGGATGCTCCGTCGAAGTAGCGCGTGC  
 TGCTGTCCATACAAGCCAACCACGGCCTCCAGAAGAAGATGTTGGCGACCTCGTATTGGGAATCCCCGAACATC  
 GCCTCGCTCCAGTCAATGACCGCTGTTATGCGGCCATTGTCCGTCAGGACATTGTTGGAGCCGAAATCCGCGTGC  
 ACGAGGTGCCGACTTCGGGGCAGTCTCGGCCCAAAGCATCAGCTCATCGAGAGCCTGCGCGACGGACGCACTG  
 ACGGTGTGCTCCATCACAGTTTGCAGTGATACACATGGGGATCAGCAATCGCGCATATGAAATCACGCCATGTA  
 GTGTATTGACCGATTCTTTCGCGTCCGAATGGGCCGAACCCGCTCGTCTGGCTAAGATCGGCCGACGCGATCGCA  
 TCCATGGCCTCCGCGACCGGCTGCAGAACAGCGGGCAGTTCGGTTTTAGGCAGGTCTTGCAACGTGACACCCCTGT  
 GCACGGCGGGAGATGCAATAGGTGAGGCTCTCGCTGAATTCCTCAATGTCAAGCACTTCCGGAATCGGGAGCGCG  
 GCCGATGCAAAGTGCCGATAAACATAACGATCTTTGTAGAAACCATCGGCGCAGCTATTTACCCGACGACATAT  
 CCACGCCCTCCTACATCGAAGCTGAAAGCACGAGATTCTTCGCCCTCCGAGAGCTGCATCAGGTCGGAGACGCTG  
 TCGAACTTTTTCGATCAGAAACTTCTCGACAGACGTCGCGGTGAGTTCAGGCTTTTTTCATGGAAGCTTTTTGCAA  
 AGCCTAGGCCTCCAAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCGGCTCGGCCCTGTCAT  
 AAATAAAAAAATAGTACAGCCATGGGGCGGAGAATGGGCGGAACTGGGCGGAGTTAGGGGCGGGATGGGCGGAG  
 TTAGGGGCGGGACTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGG  
 ACTTTCCACACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACT  
 TTCCACACCCTAACTGACACA

ACGTAGCT

GATATC

GATATC

....GGAGGTC.....

....ATGGTGGC...

...CGGGATC...

pTRE2hyg-Sequenz

EcoRV-Schnittstelle (Vektor)

EcoRV-Schnittstelle (Insert)

**BMP2-Sequenz**

**translatierter BMP2-Bereich**

**Primer für Sequenzierung**

### 9.3.2. Ergebnisse Sequenzierung

#### pTRE2hyg + BMP-2 Forward-Primer (1)

AAAACGCGACCCATATTGNCCGTCCGCTGAANTGCGTGCACGACTGTGCTGCAGATTACCGAGNGGTGCANCACTGGTAGGCCGGGACCCGCTGTCTTCTAGACGTTGCTGCTTCCCCTTGGTCCTCCTGGGCGGCGCGGCTGGCCTCGTTCGGGAGCTGGGCCGCAGGAAGTTCGCGGCGGCGTTCGTCGGGCCGCCCTCATCCCAGCCCTCTGACGAGGTCCTGGGCGAGTTCGAGTTGCGGCTGCTCAGCATGTTTCGGCCTGAAACAGAGACCCACCCAGCAGGGACGCCGTGGTGCCCCCTACATGCTAGACCTGTATCGCAGGCACTCAGGTCAGCCGGGCTCACCCGCCCCAGACCACCGGTTGGAGAGGGCAGCCAGCCGAGCCAACACTGTGCGCAGCTTCCACCATGAAGAATCTTTGGAAGAACTAAGAAACGAGTGGGAAAACAACCCGGAGATTCTTCTTTAATTTAAGTTCTATCCACCGGAGGAGTTTATCACCTCAGCAGAGCTTCAGGTTTTCCGAGAACAGATGCAAGATGCTTTAGGAAACAATAGCAGTTTCCATCACCGAATTAATATTTATGAAATCATAAAACCTGCAACAGCCAACCTCGAAATCCCCGTGACCAGACTTTTGGACACCAAGTTGGTGAATCAA

#### pTRE2hyg + BMP-2 Forward-Primer (2)

AAAACGCGACCAAATATTCCGCTCGCTAAGTCTGTACGACGATCTCTNGTTAGATTACCGGANGGTGCACCATGGTGAGCCGGGACCCGCTGTCTTCTAGCGTTGCTGCTTCCCAGGTCCTCCTGGGCGGCGCGGCTGGCCTCGTTCGGGAGCTGGGCCGCAGGAAGTTCGCGGCGGCGTTCGTCGGGCCGCCCTCATCCCAGCCCTCTGACGAGGTCCTGGGCGAGTTCGAGTTGCGGCTGCTCAGCATGTTTCGGCCTGAAACAGAGACCCACCCAGCAGGGACGCCGTGGTGCCCCCTACATGCTAGACCTGTATCGCAGGCACTCAGGTCAGCCGGGCTCACCCGCCCCAGACCACCGGTTGGAGAGGGCAGCCAGCCGAGCCAACACTGTGCGCAGCTTCCACCATGAAGAATCTTTGGAAGAACTACCAAGAAACGAGTGGGAAAACAACCCGGAGATTCTTCTTTAATTTAAGTTCTATCCCCACGGAGGAGTTTATCACCTCAGCAGAGCTTCAGGTTTTCCGAGAACAGATGCAAGATGCTTTAGGAAACAATAGCAGTTTCCATCACCGAATTAATATTTATGAAATCATAAACCTGCAACAGCCACTCGAAATCCCCGTGACAGACTTTTGGACACAGGTGGTGATCAGAAAA

#### pTRE2hyg + BMP-2 Reverse-Primer (1)

CTCCGACGAACATCGGGGGTCCCCACACACTTTCCTGAACCTTCTACNGCTCTAGAGATATCCCGGGATCCTGCAGCTGTACTAGCGACACCCACAACCTCTCCACAACCATGTCCTGATAGTTCTTTAATAACAACCTTTTCATTCTCGTCAAGGTACAGCATCGAGTAGCACTGAGTTCTGTCCGGACACAGCATGCCTTAGGAATCTTAGAGTTAACAAGTTGACCAACGTCTGAACAATGGCATGATTAGTGGAGTTCAGATGATCAGCCAAGGAAAAGGGCATTCTCCGTGGCAGTAAAAGGCGTGATACCCCGGGGGAGCCAATCCAGTCATTCCACCCACGTCCTGAAGTCCACGTACAAAGGGTGTCTCTTACAGCTGGACTTAAGGCGTTTCCGCTGTTTGTGTTTGGCTTGACGTTTTTCTCTTTGTGGAGAGGATGCCTTTTCCATCATGGCCAAAAGTTACTAGCAATGGCCTTATCTGTGACCAGCTGTGTTTCATCTTGGTGCAAAGACCTGCTTATCCTAACATGTCTTTGGAGACACCTTGTTTCTCCTACAAGTGGGCCACTTCCACCACGAATTCATGGTTGGCGTGTCCCTGTGCAGTCCACCGCATCACAGCGGGGGGTGACATCAAAAACCTTCCACCTGCCTTGCATTCTGATTCACCAACCC

pTRE2hyg + BMP-2 Reverse-Primer (2)

CAGAAGACTAANGGTGCCCAAACCTTCGCCTCGACCTTCTCAGCTCTAGAGATAT  
 CCCGGGATCCTGCAGCTGTACTAGACGACACCCACAATCCCTCCACAACCATGTC  
 CTGATAGTTCTTTAATAACAACCTTTTCATTCTCGTCAAGGTACAGCATCGAGATAG  
 CACTGAGTTCTGTCCGGACACAGCATGCCTTAGGAATCTTAGAGTTAACAGAGTT  
 GACCAACGTCTGAACAATGGCATGATTAGTGGAGTTCAGATGATCAGCCAGAGG  
 AAAAGGGCATTCTCCGTGGCAGTAAAAGGCGTGATACCCCGGGGGAGCCACAAT  
 CCAGTCATTCCACCCACGTCACTGAAGTCCACGTACAAAGGGTGTCTCTTACAG  
 CTGGACTTAAGGCGTTTCCGCTGTTTGTGTTTGGCTTGACGTTTTTCTCTTTTGTGG  
 AGAGGATGCCCTTTTCCATCATGGCCAAAAGTTACTAGCAATGGCCTTATCTGTG  
 ACCAGCTGTGTTTATCTTGGTGCAAAGACCTGCTTATT

### 9.4. Korrelationen von BMP-2

1. Korrelation von BMP-2 mit der Tumorgroße

		BMP-2		Gesamt
		0	1	
pT	1-3	730	1041	1771
	4	111	114	225
Gesamt		841	1155	1996

$\chi^2 = 5,390, p = 0,022$
$r_s = -0,052, p = 0,020$

Abb. Kreuztabelle, BMP-2/pT, n = 938

2. Korrelation von BMP-2 mit dem Östrogenrezeptorstatus

		BMP-2		Gesamt
		0-2	3-12	
ER	0	357	102	459
	9-12	374	58	432
Gesamt		731	160	891

$\chi^2 = 11,688, p < 0,001$
$r_s = -0,115, p < 0,001$

Abb. Kreuztabelle BMP-2/Östrogenrezeptor (ER), n = 891

3. Korrelation von BMP-2 mit p16

		BMP-2		Gesamt
		0	1	
p16	0	323	359	682
	1	456	680	1136
Gesamt		779	1039	1818

$\chi^2 = 9,071, p = 0,003$
$r_s = 0,071, p = 0,003$

Abb. Kreuztabelle BMP-2/p16, n = 1818

4. Korrelation von BMP-2 mit p27

		BMP-2		Gesamt
		0	1	
p27	0-2	101	110	211
	6-12	549	835	1384
Gesamt		650	945	1595

$\chi^2 = 5,098, p = 0,029$
$r_s = 0,057, p = 0,024$

Abb. Kreuztabelle BMP-2/p27, n = 1595

5. Korrelation von BMP-2 mit p53

		BMP-2		Gesamt
		0-2	3-12	
p53	0-2	1235	252	1487
	3-12	305	105	410
Gesamt		1540	357	1897

$\chi^2 = 15,787, p < 0,000$
$r_s = 0,091, p < 0,000$

Abb: Kreuztabelle BMP-2/p53, n = 1879

## 9.5. Cox-Regression

### Auswertung der Fallverarbeitung

		N	Prozent
Für Analyse verfügbare Fälle	Ereignis <sup>a</sup> Zensiert Insgesamt	460 1068 1528	22,9% 53,2% 76,1%
Nicht verwendete Fälle	Fälle mit fehlenden Werten Fälle mit negativer Zeit Zensierte Fälle vor dem frühesten Ereignis in einer Schicht Insgesamt	480 0 0 480	23,9% ,0% ,0% 23,9%
Insgesamt		2008	100,0%

a. Abhängige Variable: months surv

### Codierungen für kategoriale Variable<sup>d,e,f,g</sup>

		Häufigkeit	(1) <sup>a</sup>	(2)	(3)
pT <sup>b</sup>	1	553	1	0	0
	2	734	0	1	0
	3	91	0	0	1
	4	150	0	0	0
pN <sup>b</sup>	0	765	1	0	
	1	664	0	1	
	2	99	0	0	
BREgrade <sup>b</sup>	1	404	1	0	
	2	619	0	1	
	3	505	0	0	
BMP24YN <sup>c</sup>	0	645	1		
	1	883	0		
mitoses <sup>b</sup>	1	815	1	0	
	2	271	0	1	
	3	442	0	0	

a. Die Variable (0,1) wurde umkodiert. Die Koeffizienten stimmen daher nicht mit den Koeffizienten für die Indikatorcodierung (0,1) überein.

b. Kodierung für Indikatorparameter

c. Kategorie-Variable: pT

d. Kategorie-Variable: pN

e. Kategorie-Variable: BREgrade (BRE grade)

f. Kategorie-Variable: BMP24YN (BMP2-4 Y/N)

g. Kategorie-Variable: mitoses



### Block 0: Anfangsblock

Omnibus-Tests der Modellkoeffizienten

-2
Log-Likelihood
6307,883

### Block 1: Methode = Rückwärts schrittweise (Wald)

Omnibus-Tests der Modellkoeffizienten<sup>d</sup>

Schritt	-2 Log-Likelihood	Gesamt (Wert)			Änderung aus vorangegangenem Schritt			Änderung aus vorangegangenem Block		
		Chi-Quadrat	df	Signifikanz	Chi-Quadrat	df	Signifikanz	Chi-Quadrat	df	Signifikanz
1 <sup>a</sup>	5963,947	425,720	10	,000	343,936	10	,000	343,936	10	,000
2 <sup>b</sup>	5964,109	425,551	8	,000	,162	2	,922	343,775	8	,000

- a. Variable(n) eingegeben in Schritt Nr. 1: pT pN BREgrade mitoses BMP24YN
- b. Variable entfernt in Schritt Nr. 2: mitoses
- c. Anfangsblocknummer 0, anfängliche Log-Likelihood-Funktion: -2 Log-Likelihood: 6307,883
- d. Beginnen mit Block-Nr. 1. Methode = Rückwärts schrittweise (Wald)

Variablen in der Gleichung

Schritt	Variable	B	SE	Wald	df	Signifikanz	Exp(B)	95,0% Konfidenzinterv. für Exp(B)	
								Untere	Obere
Schritt 1	pT			22,253	3	,000			
	pT(1)	-,737	,157	22,147	1	,000	,478	,352	,650
	pT(2)	-,423	,134	9,944	1	,002	,655	,503	,852
	pT(3)	-,427	,191	4,993	1	,025	,652	,449	,949
	pN			136,172	2	,000			
	pN(1)	-1,835	,162	128,604	1	,000	,160	,116	,219
	pN(2)	-,892	,140	40,909	1	,000	,410	,312	,539
	BREgrade			22,141	2	,000			
	BREgrade(1)	-1,099	,236	21,760	1	,000	,333	,210	,529
	BREgrade(2)	-,673	,175	14,821	1	,000	,510	,362	,719
	mitoses			,163	2	,922			
	mitoses(1)	-,081	,202	,162	1	,687	,922	,620	1,370
	mitoses(2)	-,029	,144	,041	1	,840	,971	,732	1,288
BMP24YN	,193	,094	4,220	1	,040	1,213	1,009	1,459	
Schritt 2	pT			22,339	3	,000			
	pT(1)	-,737	,156	22,201	1	,000	,479	,352	,650
	pT(2)	-,423	,134	9,991	1	,002	,655	,504	,851
	pT(3)	-,432	,190	5,159	1	,023	,649	,447	,943
	pN			136,534	2	,000			
	pN(1)	-1,834	,162	128,708	1	,000	,160	,116	,219
	pN(2)	-,890	,139	40,798	1	,000	,411	,313	,540
	BREgrade			88,685	2	,000			
	BREgrade(1)	-1,174	,145	65,690	1	,000	,309	,233	,411
	BREgrade(2)	-,730	,104	49,074	1	,000	,482	,393	,591
	BMP24YN	,194	,094	4,267	1	,039	1,214	1,010	1,459

**Variablen nicht in der Gleichung**

		Score	df	Signifikanz
Schritt	mitoses	,163	2	,922
2	mitoses(1)	,122	1	,727
	mitoses(2)	,000	1	,982

a. Chi-Quadrat-Residuen= ,163 bei 2 df Sig. = ,922

**Kovariaten-Mittelwerte**

	Mittelwert
pT(1)	,362
pT(2)	,480
pT(3)	,060
pN(1)	,501
pN(2)	,435
BREgrade(1)	,264
BREgrade(2)	,405
mitoses(1)	,533
mitoses(2)	,177
BMP24YN	,422

## 9.6. Statistische Untersuchungen des Multitumor-Gewebearrays

Ergebnisse des Fisher Exact Tests bei einem quantitativen Vergleich von Tumor- und Normalgewebe

<b>Gewebe</b>	<b>Signifikanz Ja/Nein</b>	<b>Signifikanz REM (0-2/3-12)</b>
Cervix uteri, Normalgewebe		
Cervix uteri, Adenokarzinom	1,000	1,000
Cervix uteri, CIS, CIN III, 1A1, 1B1	0,324	0,174
Cervix uteri, Plattenepithelzellkarzinom	0,277	0,100
Gallenblase, Normalgewebe		
Gallenblase, Adenokarzinom	0,028	0,053
Colon, normale Mucosa		
Colon, Adenom, leichte Dysplasie	0,002	0,004
Colon, Adenom, mässige Dysplasie	0,000	0,000
Colon, Adenom, schwere Dysplasie	0,000	0,000
Colon, Karzinom	0,000	0,000
Magen Antrum, normale Mucosa		
Magen Corpus, normale Mucosa		
Magen, diffuses Adenokarzinom	X/0,001	X/0,001
Magen, gemischtes Adenokarzinom	X/0,1	X/0,100
Magen, intestinales Adenokarzinom	1/0,003	X/0,000
Ileum, normale Mucosa		
Dünndarm, Adenokarzinom	1,000	X
endometroides Stroma		
Endometrium, endometroides Adenokarzinom	X	X
Endometrium, seröses Adenokarzinom	1,000	X
Endometrium, Proliferation	1,000	X
Endometrium, Sekretion	X	X
Harnblase, normales Urothel		
Harnblase, kleinzelliges Karzinom	1,000	X
Harnblase, nichtinvasives Urothelkarzinom, pTa	1,000	X

Harnblase, invasives Urothelkarzinom, pT2-4	1,000	X
Harnblase, sarkomatoides Karzinom	1,000	1,000
Harnblase, Plattenepithelkarzinom	1,000	X
Harnblase, Adenokarzinom	X	X
Harnblase, invertiertes Papillom	X	X
<hr/>		
Haut, Normalgewebe		
Haut, Basiliom	1,000	X
Haut, Spinaliom	1,000	1,000
Haut, Naevuszellnaevus	1,000	1,000
Haut, malignes Melanom	1,000	1,000
Haut, Merkelzellkarzinom	1,000	1,000
benigner Hauttumor	1,000	1,000
Dermatofibroma protuberans	1,000	1,000
Glomustumor	1,000	X
<hr/>		
Hoden, Normalgewebe		
Hoden, andere Tumoren	0,110	0,357
Hoden, nicht seminomatöses Karzinom	0,093	0,181
Hoden, Seminom	0,259	0,091
Hoden, Teratom	0,182	0,455
<hr/>		
Leber, Normalgewebe		
Hepatozelluläres Karzinom	0,028	0,005
<hr/>		
Lymphknoten, Normalgewebe		
AML	X	X
CML	X	X
lymphoepithelialer Tumor	X	X
Hodgkin Lymphom, gemischtzellig	1,000	X
Hodgkin Lymphom, nodulär sklerosierend	X	X
Non Hodgkin Lymphom	X	X
MALT Lymphom	X	X
<hr/>		
Mamma, Normalgewebe		
Mamma, apokrines Karzinom	X	X
Mamma, duktales Karzinom	1,000	X
Mamma, kribriiformes Karzinom	1,000	X
Mamma, lobuläres Karzinom	1,000	X
Mamma, medulläres Karzinom	1,000	1,000
Mamma, muzinöses Karzinom	0,104	0,539
Mamma, Phylloides Tumor	X	X
Mamma, stromales Sarkom	X	X
Mamma, tubuläres Karzinom	1,000	X
<hr/>		
Mundhöhle, Normalgewebe		
Mundhöhle, Plattenepithelkarzinom	0,578	1,000
<hr/>		
Nebenschilddrüse		
Nebenschilddrüse, Adenom	1,000	1,000
Nebenschilddrüse, Karzinom	X	X
<hr/>		
Niere, Normalgewebe		
Niere, Onkozytom	0,560	X
Niere, klarzelliges Karzinom	0,196	1,000
Niere, papilläres Karzinom	0,616	1,000
Niere, chromophobes Karzinom	1,000	1,000
Angiomyolipom	1,000	X

Oesophagus, Normalgewebe		
Oesophagus, Plattenepithelkarzinom/Adenokarzinom/kleinzelliges Karzinom	0,639	0,495
Ovar, Normalgewebe		
Ovar, Brenner Tumor	0,258	0,505
Ovar, endometroides Karzinom	1,000	1,000
Ovar, muzinöses Karzinom	1,000	1,000
Ovar, seltene Tumoren	0,444	X
Ovar, seröses Karzinom	0,571	1,000
Pancreas, Normalgewebe		
Pancreas, Adenokarzinom	0,038	0,018
Parotis, Normalgewebe		
Parotis, Azinuszellkarzinom	1,000	X
Parotis, gemischtzelliges Karzinom	1,000	1,000
Parotis, karzinoider Tumor	0,385	X
Parotis, mucoepidermoides Karzinom	1,000	X
Penis, Normalgewebe		
Penis, Karzinom	0,211	1,000
Prostata, Normalgewebe		
Prostata, hormonrefraktäres Karzinom	1,000	0,395
Prostata, nicht behandeltes Karzinom	1,000	0,161
Schilddrüse, Normalgewebe		
Schilddrüse, Adenom	1,000	1,000
Schilddrüse, anaplastisches Adenom	1,000	X
Schilddrüse, follikuläres Karzinom	1,000	1,000
Schilddrüse, medulläres Adenom	0,061	1,000
Schilddrüse, papilläres Karzinom	1,000	X

---

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name:	Steinert
Vorname:	Susanne
Anschrift:	Georg-Weerth-Str. 20, 07749 Jena
Telefon:	03641/527830
E-Mail:	Susanne.Steinert@med.uni-jena.de
Geburtsdatum:	02.06.1981
Geburtsort:	Burgstädt
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

## Schulbildung

09/1988-07/1992	allgemeinbildende polytechnische Oberschule „Geschwister-Scholl“, Limbach-Oberfrohna
08/1992-02/1999	Albert-Schweitzer-Gymnasium, Limbach-Oberfrohna
02/1999-07/1999	Europäisches Gymnasium Waldenburg
07/1999	Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Hochschulbildung

10/1999-05/2004	Studium der Biochemie an der Friedrich-Schiller- Universität Jena
08/2001	Vordiplom Biochemie

10/2003-04/2004	Diplomarbeit „Studien zum Einfluss von Cellulosederivaten auf das Wachstum und die Differenzierung von Chondrozyten <i>in vitro</i> “ Waldkrankenhaus Rudolf-Elle/Eisenberg, Kompetenzzentrum Polysaccharidforschung/Jena
05/2004	Diplom Biochemie

### **Doktorarbeit**

06/2004-02/2008	Promotionsarbeit „Untersuchungen zur tumorbiologische Relevanz von BMP-2 im Mammakarzinom“
-----------------	--

### **Nebentätigkeit**

07/2002-02/2003	Studentische Hilfskraft am Hans-Knöll-Institut, Jena
-----------------	--

### **Sonstige Kenntnisse**

EDV	Anwendungsorientierte Kenntnisse im Umgang mit Microsoft Word, PowerPoint und Excel sowie SPSS
Sprache	gute Sprachkenntnisse in Englisch

Jena, den 25.02.2008

---

## Kongressbeiträge

**Pietraszczyk M, Steinert S, Hortschansky P, Wölfl S, Höffken K, Clement JH**

Analysis of the biological activity of bone morphogenetic proteins with an improved 96-well plate assay

DKGL, Jena 2005

**Steinert S, Pusch L, Kroll T, Hortschansky P, Knoth S, Wölfl S, Höffken K, Clement JH**

Comparison of chronic and single application of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) by expression profiling

29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ), Braunschweig, 29.03.-01.04.2006

**Steinert S, Pusch L, Kroll T, Hortschansky P, Knoth S, Wölfl S, Höffken K, Clement JH**

Comparison of chronic and single application of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) by expression profiling (aktualisiert)

6<sup>th</sup> International Conference on Bone Morphogenetic Proteins, Dubrovnik, 11.-15.10.2006

**Mangner N, Sängler J, Steinert S, Schwalbe M, Schmidt A, Clement JH**

Expression of BMP3 is positively correlated to the progesterone receptor level in breast cancer

6<sup>th</sup> International Conference on Bone Morphogenetic Proteins, Dubrovnik, 11.-15.10.2006

**Steinert S, Pusch L, Kroll T, Hortschansky P, Knoth S, Wölfl S, Höffken K, Clement JH**

Single dose application of BMP-2 and overexpression of BMP-2 affect different sets of genes involved in tumorigenesis

10th Joint Meeting of the Signal Transduction Society, Weimar, 02.-04.11.2006

**Steinert S, Sängler J, Schmidt A, Hartmann A, Höffken K, Clement JH**

BMP-2 is a favorable prognostic marker in nodal-negative invasive ductal breast carcinoma

52. Tagung „Thüringer Internisten“, Jena, 09.-10.11.2007

*Dieser Kongressbeitrag wurde mit dem Posterpreis für Grundlagenforschung der Gesellschaft für Innere Medizin Thüringens e.V. ausgezeichnet.*

## Publikationen

**Steinert S, Ludwig M, Naumann A, Geyer A, Clement JH (2005)**

BMP-2 reguliert das Migrationsverhalten von Mammakarzinomzellen *in vitro*

BIOspektrum 11: 470-471

**Steinert S, Kroll TC, Taubert I, Pusch L, Hortschansky P, Höffken K, Wöfl S,**

**Clement JH**

Differential expression of cancer related genes by single and permanent exposure to bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)

J Cancer Res Clin Oncol [akzeptiert]



## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. Joachim Clement, Dr. Jörg Sänger,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 25.02.2008

Susanne Steinert

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. K. Höffken für die Bereitstellung des Themas und die hervorragenden Möglichkeiten zur Bearbeitung im Onkologischen Forschungslabor.

Mein besonderer Dank gilt Dr. J.H. Clement für die hervorragende Unterstützung, seine stete Bereitschaft entstandene Fragen zu beantworten und für viele anregende wissenschaftliche Diskussionen. Ein besonderes Dankeschön auch für die immerwährende Förderung und „Rückendeckung“, die mir Kraft und Ansporn für das Gelingen dieser Arbeit gegeben haben.

Mein Dank gilt Dr. habil. A. Schmidt und Dr. J. Säger für die Bereitstellung der Tumorproben und für die ausgezeichneten Möglichkeiten zur Durchführung der Immunhistochemien und eine tolle Arbeitsatmosphäre.

Ich danke dem ganzen Team vom Onko-Labor für die freundliche Aufnahme und die Hilfe bei der Bewältigung der kleinen und großen Probleme des Laboralltags. Die gegenseitige Unterstützung und der stete Vorrat an Kuchen und Schokolade haben mir die Promotionszeit versüßt!!!

Ich möchte mich herzlichst bei meinen Prinzen und Prinzessinnen bedanken: Buhn, Franzi, Falko, Hutzel, Claudia, Holger, Krafti und Marc. Ihr habt mein Leid geteilt und meine Freude verdoppelt und mir durch die eine oder andere Ablenkung neue Kraft gegeben!

Ganz besonderer Dank gilt Gunter, Inken, Anneke und Axel für „igigel“ Spaß und Hilfe in allen Lebenslagen.

Ich möchte mich herzlichst bei meiner Familie bedanken, die immer hinter mir gestanden hat. Besonders bei meinem Bruder, der mich immer zum Lachen bringt. Und bei meiner Mutti, die mir ihre Kämpfernatur vererbt hat und mich gelehrt hat immer an mich zu glauben, niemals aufzugeben und meine Träume zu verwirklichen.

Aus tiefsten Herzen möchte ich mich bei Ronald bedanken. Trotz aller Entbehrungen und Schwierigkeiten hast du mir immer den Rücken gestärkt, mir geduldig zugehört, mich zum Lachen gebracht und nie aufgehört an uns zu glauben. Ildüa.