

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
**zur**  
**Erlangung der Doktorwürde**  
**der**  
**Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät**  
**der**  
**Ruprecht-Karls-Universität**  
**Heidelberg**

**vorgelegt von**  
**Diplom-Biologin Birgit Wasser**  
**aus Ludwigsburg**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**Identifizierung und Charakterisierung einer  
tumorentitätspezifisch überexprimierten Protein-  
Isoform eines bisher unbekanntes Gens**

**Gutachter: Prof. Dr. Stefan Dübel**

**Prof. Dr. Werner Buselmaier**

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2001 bis Februar 2004 bei der mtm laboratories AG in Heidelberg unter der wissenschaftlichen Leitung von Dr. Rüdiger Ridder und Dr. Johannes Coy durchgeführt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Krebs.....	1
1.2	Das kolorektale Karzinom.....	1
1.2.1	Diagnose des kolorektalen Karzinoms.....	1
1.3	Das Bronchialkarzinom.....	2
1.3.1	Diagnose des Bronchialkarzinoms.....	3
1.4	Genetische Alterationen als Ursache der Karzinogenese.....	4
1.5	Methoden zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen in Tumoren.....	6
1.5.1	In dieser Arbeit eingesetzte Methoden zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen in Tumoren.....	6
1.6	Krebsdiagnostik mittels molekularer Tumormarker.....	7
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	12
<b>2</b>	<b>Material.....</b>	<b>13</b>
2.1	Chemikalien.....	13
2.2	Lösungen.....	13
2.2.1	Northern Blot Lösungen.....	14
2.2.2	Lösungen zur Herstellung einer Peptid-Säule.....	15
2.2.3	Lösungen für immunhistochemische und immunzytochemische Färbungen.....	15
2.3	Medien zur Bakterienzucht.....	15
2.4	Zellkultur-Medien.....	16
2.5	Sonstiges.....	16
2.6	Enzyme.....	17
2.7	Vektoren.....	17
2.8	Verwendete Antikörper.....	18
2.9	Versuchstiere.....	18
2.10	Klinisches Material.....	19
2.11	Primer.....	20
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>22</b>
3.1	Übersicht über die Vorgehensweise in dieser Arbeit.....	22
3.2	Kultivierung von Zelllinien.....	23
3.3	RNA-Extraktion aus Gewebe und Zellen.....	23
3.4	Reverse Transkription.....	24
3.5	Protein-Arrays.....	24
3.5.1	Hybridisierung von Protein-Arrays.....	25
3.5.2	Auswertung von hybridisierten Protein-Arrays.....	25
3.6	In-silico-Analyse von EST-Datenbanken.....	26
3.7	Quantitative Real-Time-PCR.....	27
3.7.1	Theorie der quantitativen Real-Time-PCR (TaqMan).....	27
3.7.2	Schmelzkurvenanalyse.....	27
3.7.3	Durchführung der Real-Time-PCR.....	28
3.7.4	Analyse der relativen Expression.....	28
3.8	Northern Blot.....	30

3.8.1	Herstellung einer Sonde mittels Digoxigenin-Markierung.....	30
3.8.2	Northern Blot Hybridisierung.....	31
3.9	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	31
3.10	Präparative Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Isolierung.....	32
3.11	5'-RACE.....	32
3.11.1	Klonierung der 5'-RACE-Produkte und Transformation.....	33
3.11.2	Kolonie-PCR mit 5'-RACE-Klonen.....	33
3.12	Sequenzanalysen.....	34
3.13	Rekombinante Expression.....	34
3.13.1	Long-Range-PCR.....	34
3.13.2	Expressionsklonierung und Transformation.....	35
3.13.3	DNA-Präparation aus Plasmiden.....	35
3.13.4	Restriktionsanalyse.....	35
3.13.5	Expression von rekombinatem Protein.....	36
3.13.6	Aufreinigung von rekombinatem Protein aus der unlöslichen Proteinfraktion mittels HPLC ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ).....	36
3.14	Herstellung monoklonaler Antikörper.....	37
3.14.1	Immunisierung.....	37
3.14.2	Fusion von murinen Milzzellen mit Myelomzellen zu Hybridomen.....	38
3.14.3	Reklonierung von Hybridomen.....	38
3.14.4	Kultivierung von Hybridomen.....	39
3.14.5	Isotypisierung von monoklonalen Antikörpern.....	40
3.14.6	Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern aus Hybridom- Überständen.....	40
3.15	Herstellung polyklonaler Antikörper.....	41
3.15.1	Immunisierung.....	41
3.15.2	Aufreinigung von Antikörpern aus polyklonalen Seren mittels Affinitätschromatographie über Peptid-Sepharose.....	41
3.15.2.1	Kopplung von Peptid an eine Affinitätsmatrix.....	41
3.15.2.2	Voraufreinigung der finalen Seren.....	42
3.15.2.3	Aufreinigung der Peptid-spezifischen polyklonalen Antikörper.....	42
3.16	Peptid-ELISA ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ).....	42
3.16.1	Beschichten der ELISA-Platten.....	42
3.16.2	Durchführung des Peptid-ELISA.....	43
3.17	Aufarbeitung von Proteinen für die SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese.....	43
3.18	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
3.18.1	Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie Brilliant Blue.....	44
3.19	Western Blot.....	44
3.20	Immunhistochemie und Immunzytochemie.....	45
3.20.1	Herstellung von zytologischen Dünnschichtpräparaten.....	45
3.20.2	Herstellung von zytologischen Ausstrichen.....	45
3.20.3	Herstellung von Paraffinschnitten.....	46
3.20.4	Vorbehandlung von histologischen und zytologischen Präparaten.	46
3.20.5	Immunhistochemische und immunzytochemische Färbung.....	46
3.20.6	Immunzytochemische Doppelfärbung.....	48
3.20.7	Haltbarmachen von histologischen und zytologischen Präparaten..	49

3.20.8	Auswertung von immunhistochemischen und -zytochemischen Färbungen.....	49
3.20.9	Auswertung von Multi-Tissue-Arrays.....	49
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>51</b>
4.1	Übersicht.....	51
4.2	RNA-Qualität.....	51
4.3	Primerqualität.....	52
4.4	Identifizierung von tumorassoziierten Genen.....	53
4.4.1	Serumbasierte Hybridisierung von Protein-Arrays.....	53
4.4.2	In-silico-Analyse von EST-Datenbanken.....	54
4.5	Analyse der differentiellen Genexpression von Kandidaten-Genen aus der Protein-Array Hybridisierung und der in-silico-Analyse von EST-Datenbanken mittels quantitativer Real-Time-PCR.....	54
4.6	Auswahl eines Gens zur weiteren Charakterisierung.....	58
4.7	Charakterisierung des bisher unbekanntes Gens <i>LUMA</i> .....	59
4.7.1	Gengröße und Expressionsanalyse.....	59
4.7.2	Darstellung der vollen Länge der <i>LUMA</i> -cDNA.....	60
4.7.2.1	Überprüfen von vorhergesagten Exons.....	60
4.7.2.2	5'-RACE.....	61
4.7.2.3	Überprüfen von ESTs im 5'-Bereich des Gens.....	62
4.7.3	Genomische Struktur des <i>LUMA</i> -Gens.....	62
4.7.4	Alternatives Spleißen und Identifizierung von Protein-Isoformen..	64
4.7.5	Sequenzkonservierung und Homologien zu anderen Organismen..	68
4.7.6	Ansätze zur Funktionsanalyse.....	70
4.8	Bestimmung gewebeübergreifender und spleißing-spezifischer <i>LUMA</i> -RNA-Expressionsprofile.....	73
4.9	Expressionsanalyse von <i>LUMA</i> -Protein-Isoformen.....	77
4.9.1	Rekombinante Expression von <i>LUMA</i> .....	77
4.9.2	Generierung polyklonaler und monoklonaler <i>LUMA</i> -Antikörper...	78
4.9.3	Nachweis und Lokalisation des <i>LUMA</i> -Proteins.....	81
4.9.4	Immunhistochemische Expressionsanalyse der Protein-Isoformen <i>LUMA</i> -10 und <i>LUMA</i> -15A in Lungengeweben.....	83
4.9.5	Immunhistochemische Validierung von <i>LUMA</i> -15A als möglicher Marker zur Diagnose von Bronchialkarzinomen.....	84
4.9.6	Immunhistochemische Expressionsanalyse von <i>LUMA</i> -15A in verschiedenen Tumorentitäten.....	94
4.9.7	Immunzytochemischer Nachweis von <i>LUMA</i> -15A in Bronchialsekreten.....	95
4.9.8	Immunzytochemische Doppelfärbung von <i>LUMA</i> -15A und Ki67 in Bronchialsekreten.....	98
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>100</b>
5.1	Real-Time-PCR-basierende Quantifizierung von Transkripten aus Tumor- und Normalgewebe.....	100
5.2	Vergleich der Ansätze zur Identifizierung von tumorassoziierten Genen mittels Hybridisierung von Protein-Arrays und in-silico-Analyse von EST-Datenbanken.....	101
5.3	Bewertung der identifizierten differentiell exprimierten Gene.....	104
5.4	Charakterisierung des bisher unbekanntes Gens <i>LUMA</i> .....	106

5.4.1	Gen- und Proteinstruktur.....	106
5.4.2	RNA- und Protein-Expression.....	107
5.4.3	Alternativ gespleißte <i>LUMA</i> -Transkripte und deren mögliche Rolle bei der Karzinogenese.....	111
5.5	<i>LUMA</i> -15A als potentieller molekularer Diagnostik-Marker.....	113
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>Referenzen.....</b>	<b>120</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungen.....</b>	<b>131</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>134</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebs

Nach Angaben der WHO (*World Health Organisation*) stellen Krebserkrankungen weltweit die dritthäufigste Todesursache, mit 6 Millionen Todesfällen jährlich dar. Allein in Deutschland erkranken jährlich etwa 350.000 Menschen an malignen Tumoren, mit steigender Inzidenz. Zu den am häufigsten auftretenden Krebsformen zählen hierbei das kolorektale Karzinom und das Bronchialkarzinom.

Krebserkrankungen entstehen infolge ungehinderter Proliferation von Zellen, die aufgrund von genetischen Defekten zur Fehlsteuerung des Zellwachstums führen. Als Tumor im engeren Sinne (Neoplasie) bezeichnet man eine Gewebeneubildung in Form eines spontanen, verschiedengradig enthemmten, autonom und irreversiblen Überschusswachstums von körpereigenem Gewebe, das in der Regel mit unterschiedlich ausgeprägtem Verlust spezifischer Zell- und Gewebefunktionen verbunden ist. Im Laufe der Tumorentstehung lassen sich morphologische Umwandlungen der vorhandenen Gewebestrukturen beobachten, die über die Stadien der Hyperplasie, Dysplasie des präinvasiven und invasiven Karzinoms bis hin zur Fernmetastasierung führen (Fearon und Vogelstein, 1990).

## 1.2 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist in den westlichen Industrienationen die zweithäufigste Krebsform nach dem Bronchialkarzinom. In ca. 10 % der Fälle liegt eine genetische Prädisposition vor, wohingegen es sich bei ca. 90 % der Patienten um sporadisch auftretende Kolonkarzinome handelt.

Kolorektale Karzinome entstehen aus normalen Epithelzellen im Bereich des sigmoiden Dickdarms sowie des Rektums. Die erste Manifestation einer kolorektalen Neoplasie, die klinisch festgestellt werden kann, ist gewöhnlich ein adenomatöser Polyp. Mit voranschreitendem Wachstum werden diese Polypen dysplastisch, das heißt sie zeigen einen abnormalen intra- und interzellulären Aufbau und können sich weiter zum malignen Karzinom entwickeln, das die Fähigkeit zur Bildung von Metastasen besitzt.

### 1.2.1 Diagnose des kolorektalen Karzinoms

Beim kolorektalen Karzinom besteht bei rechtzeitiger Diagnose eine relativ günstige Prognose. Die Mehrzahl der Patienten ist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung operabel und die 5-



Jahresüberlebensraten betragen ca. 90 % bei lokal begrenzten Tumoren und unter 60 % bei metastasierten Karzinomen (Burke und Allen-Mersh, 1996; Kato *et al.*, 2001; Merrill *et al.*, 1998). Das Screening erfolgt anhand des Nachweises von okkultem Blut im Stuhl (FOBT, *fecal occult blood test*), Koloskopie, Sigmoidoskopie und Computer-Tomographie (CT). Mittels des FOBT kann das durch Karzinome verursachte Blut im Stuhl durch die Peroxidase-Aktivität des Hämoglobins, welche die Oxidation eines Chromogens zu einem Farbstoff katalysiert, nachgewiesen werden. Fällt der Test positiv aus, wird eine Koloskopie durchgeführt. Das Problem des FOBT besteht zum einen in einer verminderten Detektion von Adenomen und premalignen Stadien, zum anderen in unspezifischen Befunden, die durch Entzündungen der Darmschleimhaut oder variierende Ernährung verursacht werden können. Dies führt zu wiederholten Anwendungen des FOBT und zu unnötigen und teuren Koloskopien (Towler *et al.*, 1998).

### 1.3 Das Bronchialkarzinom

Bronchialkarzinome zählen zu den am häufigsten diagnostizierten Krebsformen des Menschen weltweit, gleichzeitig ist dieser Tumortyp mit der höchsten Sterblichkeitsrate verbunden (Brescia, 2001; McWilliams und Lam, 2002). Den Entwicklungen der letzten dreißig Jahre folgend gilt dies gleichermaßen für Männer wie Frauen (Carbone, 1997). 1,3 Millionen Neuerkrankungen und über eine Million Todesfälle treten jährlich weltweit nach Angaben der WHO auf. In den vergangenen drei Jahrzehnten wurde ein starker Anstieg der Inzidenz- und Mortalitätsrate beobachtet. In Deutschland wurde der Prostatakrebs erstmalig 1998 vom Lungenkrebs als häufigste Krebserkrankung bei Männern abgelöst.

Bronchialkarzinome entstehen aus normalen Epithelzellen nach einer Serie von morphologischen und progressiven pathologischen genetischen Veränderungen, die teilweise Jahre dauern können. Aufgrund deutlicher histologischer Merkmale erfolgt eine Einteilung von Lungentumoren in kleinzellige (SCLC, *small cell lung cancer*) und nicht-kleinzellige Tumoren (NSCLC, *non small cell lung cancer*). Häufig wird jedoch beobachtet, dass beide Formen innerhalb eines Tumors ineinander übergehen oder coexistieren. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass alle Subtypen des Bronchialkarzinoms einen gemeinsamen Ursprung haben. Kleinzellige Tumortypen stellen etwa 20 % aller diagnostizierten Lungentumoren dar und treten meistens in zentralen Bereichen der Lunge auf. Sie zeichnen sich durch schnelles Wachstum und frühe Metastasierung aus. Histologisch sind kleinzellige Karzinome durch ein hohes Kern/Zytoplasma Verhältnis charakterisiert. Nach der Klassifikation der WHO von 1999

werden die nicht-kleinzelligen Karzinome auf der Grundlage histologischer Kriterien in weitere, unterschiedliche Subtypen eingeteilt. Diese Gruppe, die ungefähr 80 % der Bronchialkarzinome ausmacht, besteht aus Plattenepithelkarzinomen, Adenokarzinomen, großzelligen Karzinomen, Karzinoiden, adenosquamösen Karzinomen und Bronchialdrüsenkarzinomen. Die Haupttypen der nicht-kleinzelligen Karzinome sind mit jeweils ungefähr 40 % Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome. Die Gruppe der Adenokarzinome, die sich bevorzugt in der Lungenperipherie entwickelt, umfasst diverse Tumoren mit variierendem Grade der Differenzierung und einer hohen Metastasierungsrate. Hier unterscheidet man zwischen azinären, papillären und soliden Varianten, sowie Bronchioalveolar-Karzinomen. Plattenepithelkarzinome sind maligne, meist aus Epithelverbänden bestehende Tumoren mit einer häufig stark auftretenden Keratinexpression (Roth, 1995). Weitere nicht-kleinzellige Lungentumor-Subtypen sind mesotheliale Tumoren, Weichgewebe-Tumoren und Lungensekundärtumoren, die durch Metastasen anderer Tumorentitäten entstehen.

### **1.3.1 Diagnose des Bronchialkarzinoms**

Sowohl bei kleinzelligen als auch bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen besteht die Schwierigkeit der frühen Diagnose (Eddy, 1998; McWilliams und Lam, 2002; Mulshine und Smith, 2002;). Derzeit haben die meisten Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bereits ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium erreicht, was eine Behandlung so gut wie unmöglich macht. Diese Tatsache drückt sich in verminderten 10-Jahres-Überlebensraten von 8-10 % bei NSCLC und von 12-18 % bei SCLC aus (Fry *et al.*, 1999; Tai *et al.*, 2003). Damit gehört der Lungenkrebs zu den prognostisch ungünstigsten Krebsformen. Bei Personen mit im frühen Stadium befindlichen pulmonalen Karzinomen kann hingegen eine Behandlung in Form einer Lungenresektion erfolgen. Die Diagnoseverfahren erfolgen derzeit lediglich im Verdachtsfall auf ein Karzinom. Röntgenaufnahmen können Karzinome ab einer Größe von einem Zentimeter aber keine Karzinome im zentralen Lungenbereich detektieren. Tumoren ab einer Größe von 0,5 cm können mittels CT erkannt werden. Die zentrale diagnostische Maßnahme ist die Bronchoskopie, bei der mittels Bronchial-Lavage potentielle maligne Zellen aus den Bronchien gespült werden, bzw. Biopsien entnommen werden. Die isolierten Zellen oder Gewebestücke können nachfolgend zytologisch bzw. histologisch analysiert werden. Sputum-Zytologie kommt aufgrund geringer Sensitivität nur wenig zum Einsatz, da es sich bei den im Sputum vorhandenen Zellen bei lediglich weniger als 1 % um Tumorzellen handelt, welche schwer detektierbar sind (Rivera *et al.*, 2003; Thunnissen, 2003). Die zytologischen Analysen

von Sputum und Bronchial-Lavagen sind zudem aufgrund des Fehlens von spezifischen Tumormarkern schwierig (Brambilla *et al.*, 2003). Aus diesem Grund besteht ein vermehrtes Interesse, neue innovative Methoden zu entwickeln, die eine Frühdiagnose von Bronchialkarzinomen ermöglichen und bisherige Diagnosemethoden bezüglich der Sensitivität und Spezifität verbessern (Etzioni *et al.*, 2003; Sutedja, 2003).

#### **1.4 Genetische Alterationen als Ursache der Karzinogenese**

Die Entstehung und Progression maligner Tumoren wird heute durch eine Akkumulation genetischer Defekte in einem mehrstufigen Prozess erklärt (Fearon und Vogelstein, 1990; Hanahan und Weinberg, 2000), welche sowohl durch äußere Faktoren als auch durch die genetische Prädisposition verursacht werden. In den Prozess der malignen Transformation sind Gene involviert, die eine veränderte Form von normalen, in eukaryontischen Zellen enthaltenen Genen zeigen.

Bei den nachzuweisenden genetischen Veränderungen handelt es sich zum einen um chromosomale Aberrationen wie Translokationen, Inversionen oder Deletionen (Lengauer *et al.*, 1998). Viele Fälle zeigen dabei fast vollständige Triploidien oder Tetraploidien. Auch Polysomien und partielle Verluste einzelner Chromosomen werden beobachtet.

Neben chromosomalen Veränderungen sind aber auch Modifikationen einzelner Gene durch Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen belegt (Lengauer *et al.*, 1998). Viele dieser veränderten Gene sind direkt oder indirekt in die Regulation von Wachstum, Proliferation oder Differenzierung der Zelle involviert (Bishop, 1991). So kann die Aktivierung eines Wachstumstimulierenden Gens Folge einer DNA-Schädigung sein. Diese als dominant bezeichneten Onkogene werden durch DNA-Mutationen konstitutiv aktiviert und besitzen Funktionen als Wachstumsfaktoren, Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, zytoplasmatische Signaltransduktoren und nukleäre Transkriptionsfaktoren (Hunter, 1991). Einige der bekanntesten sind hierbei *H-RAS*, *K-RAS* und *N-RAS* (kodieren für G-Proteine), ebenso wie *C-MYC*, *N-MYC* und *L-MYC* (kodieren für Transkriptionsfaktoren), *MYB* (Kern-Onkogen), *FOS* und *JUN* (kodieren für Bestandteile des Transkriptionsfaktors AP-1) und *BCL-2* (Genprodukt ist ein Apoptoseinduktor) (Bos, 1989; Curran und Franza, 1988; De Pinho *et al.*, 1987; Hockenbery, 1992; Weston, 1990).

Ebenso können genetische Defekte eine Inaktivierung von wachstumshemmenden Genen, sogenannten Tumorsuppressorgenen, zur Folge haben. Zu einem funktionellen Verlust kommt es erst, wenn beide Allele betroffen sind. Tumorsuppressorgen-Produkte sind häufig Proteine,

die den Zellzyklus kontrollieren, die genomische Integrität aufrecht erhalten, oder sie sind funktionell wichtige Moleküle in der Zellverankerung. Prototypen von Tumorsuppressoren sind das *RB*-Gen, das für ein nukleäres Phosphoprotein kodiert, welches in der Regulation des Zellzyklusses eine wesentliche Rolle spielt, und das *p53*-Gen, das in die DNA-Reparatur, in die Regulation anderer für die Zellteilung wichtiger Gene sowie in die Induktion der Apoptose involviert ist (Vogelstein *et al.*, 2000; Yamasaki, 2003). Das Auftreten von *p53*-Mutationen wurde in vielen Karzinomen, darunter Kolon-, Brust- und Oesophagus-Karzinomen sowie Neuroblastomen beschrieben (Chino *et al.*, 2001; Kastriakis *et al.*, 1995; Ostermeyer *et al.*, 1996; Varley *et al.*, 1991).

DNA-Reparatur-Gene kontrollieren über die Detektion von DNA-Schäden und die Einleitung bzw. Ausführung einer entsprechenden Reparatur die Mutationsrate im Genom. Daher führen Mutationen dieser Gene zu genomischer Instabilität und erhöhter Mutationsrate. Die Inaktivierung von Sensoren solcher DNA-Schäden, wie beispielsweise des mutierten ATM-Proteins kann dazu führen, dass Restriktionspunkte im Zellzyklus aufgrund ausbleibender Reparaturmechanismen durchlaufen werden (Rotman und Shiloh, 1999). Durch Mutationen von DNA-Reparatur-Genen können sogenannte Mikrosatelliteninstabilitäten (MIN) verursacht werden. Hierbei handelt es sich um Expansionen oder Reduktionen von einfach repetitiven Nukleotid-Sequenzen („*Tandem Repeats*“) der DNA. DNA-Schäden der in DNA-Reparaturmechanismen involvierten Gene *MSH2* und *MLH1* führen zu Mikrosatelliteninstabilitäten, die sowohl in hereditären als auch in sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinomen nachgewiesen wurden (Fishel *et al.*, 1993; Bronner *et al.*, 1994).

Desweiteren kann eine Methylierung der Promotor-Regionen von Tumorsuppressor- und DNA-Reparatur-Genen zu einem Ausfall der Genaktivität („*gene-silencing*“) und damit zur Karzinogenese führen (Charames *et al.*, 2003).

Viele der aufgeführten genetischen Veränderungen, die zur Tumorentstehung beitragen, wirken letztendlich über ein verändertes Genexpressionsverhalten. Es wird angenommen, dass sich etwa 1-3 % der mRNAs zwischen einer Tumorzelle und der entsprechenden normalen Zelle unterscheiden (Zhang *et al.*, 1997). Die Identifizierung und Charakterisierung differentiell exprimierter Gene hilft die zum größten Teil noch unverstandenen Mechanismen der Tumorentstehung aufzuklären. Weiterhin können solche Gene als molekulare diagnostische Marker oder Zielstrukturen für innovative Therapieansätze in der Onkologie eingesetzt werden.

## **1.5 Methoden zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen in Tumoren**

Es gibt verschiedene Methoden um systematisch die differentielle Genexpression in Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe zu untersuchen. Häufig angewandte Methoden sind die Herstellung von subtraktiven Genbanken (SSH, suppressive subtraktive Hybridisierung), das „*Differential Display*“, Array-basierende Technologien, die SEREX-Methode (*Serological identification of antigens by recombinant expression cloning*), quantitative Real-Time-PCR oder die „*Serial Analysis of Gene Expression*“ (SAGE).

### **1.5.1 In dieser Arbeit eingesetzte Methoden zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen in Tumoren**

In dieser Arbeit wurden mit der Hybridisierung von Protein-Arrays und der in-silico-Analyse von EST-Datenbanken zwei Ansätze angewandt, um tumorassoziierte Gene zu identifizieren. Die dabei detektierten Kandidaten-Gene wurden anhand der quantitativen Real-Time-PCR-Technik auf eine differentielle Genexpression hin untersucht. Die Methode der quantitativen Real-Time-PCR erlaubt relative Quantitäten bestimmter mRNA-Spezies zu bestimmen und untereinander zu vergleichen (Lee et al., 1993). Aufgrund der hohen Sensitivität und der damit verbundenen geringen Template-Menge ist diese Methode zur Analyse der differentiellen Genexpression anderen Techniken überlegen.

Der Ansatz der Protein-Array-Hybridisierung basiert auf einer bereits erfolgten Immunantwort im Patienten und erfolgt nach dem Prinzip der SEREX-Methode (Sahin et al., 1995). Die Grundlage beider Methoden ist, dass durch die Hybridisierung von Protein-Filtern mit Tumor-Patientenserum tumorassoziierte Proteine identifiziert werden können. Auf den Protein-Arrays können so gleichzeitig tausende immobilisierte Proteine analysiert werden. Die Tatsache, dass Antikörper in Seren von Tumorpatienten spezifisch Strukturen erkennen, die selektiv auf autologen Tumoren, aber nicht auf normalen Zellen exprimiert werden, ist bereits bekannt (Old und Chen, 1998). In dieser Arbeit wurden Protein-Arrays eingesetzt, die aus einer humanen fötalen cDNA-Bibliothek generiert wurden. Da häufig entwicklungsbiologisch relevante Gene auch später bei der Karzinogenese von Bedeutung sind (Basora *et al.*, 1998; Shiozawa *et al.*, 1988), enthält diese Bibliothek möglicherweise auch Gene, die tumorspezifisch exprimiert werden. Da die serologische Identifizierung alleine noch keine Aussage über die tumorspezifische Expression eines Gens macht, wurde in dieser Arbeit eine Evaluation der

Expressionsprofile der Kandidaten-Gene auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Real-Time-PCR durchgeführt.

Die in-silico-Analyse von EST-Datenbanken (*expressed sequence tag*) umfasst die Expressionsanalyse von aus der Datenbank ausgewählten Sequenzen, die über einen RAGE-Ansatz (*random activation of gene expression*) generiert wurden (Harrington *et al.*, 2001). Die RAGE-Bibliotheken wurden generiert, indem spezielle RAGE-Vektoren in das Genom von eukaryotischen Zellen eingebracht wurden. Wenn die Integration des Vektors in oder „*upstream*“ eines endogenen Gens erfolgt, kommt es zu einer Aktivierung der Expression des Gens. Hierbei wurden auch Gene identifiziert, die normalerweise in einem inaktiven Zustand vorliegen, und die in cDNA-Bibliotheken gewöhnlich unterrepräsentiert oder gar nicht vorliegen. Diese Sequenzen stellen potentielle Kandidaten für tumorassoziierte Gene dar. Aus den RAGE-Bibliotheken wurden in dieser Arbeit ESTs ausgewählt und einer zusätzlichen Selektion unterzogen. Es wurden nur solche RAGE-ESTs ermittelt, für die laut Datenbank eine zusätzliche Expression in Tumorgewebe und keine Expression in Normalgewebe nachgewiesen wurde. Die ausgewählten Kandidaten-EST-Sequenzen wurden mittels quantitativer Real-Time-PCR auf ihre differentielle Expression in Tumor- und Normalgeweben analysiert.

## 1.6 Krebsdiagnostik mittels molekularer Tumormarker

Das Ziel der Krebsdiagnostik liegt in der möglichst frühen Diagnose von Karzinomen oder deren Vorstufen. Die Detektion eines frühen Tumorstadiums ermöglicht effektivere Therapien und führt zu einer höheren Überlebenschance der Patienten (Etzioni *et al.*, 2003). Aber auch in fortgeschrittenen Tumorstadien sind sensitive und einfache Diagnoseverfahren von Vorteil. Neue diagnostische Möglichkeiten liegen in innovativen, molekularbiologisch-basierten Methoden. Ein Ansatz besteht hierbei in der Identifizierung von tumorassoziierten Genen oder deren Proteinprodukten, die als potentielle molekulare Diagnostik-Marker nachgewiesen werden können. Ziel ist es hierbei, präkanzeröse oder kanzeröse Zellen anhand bestimmter spezifischer Genexpressionen auf DNA- oder Protein-Ebene zu detektieren. Der Einsatz von Früherkennungs-Markern („*Early-Detection*“-Markern) könnte in breiten Screening-Verfahren angewendet werden, um Karzinome in frühen- oder sogar premalignen Stadien zu detektieren (Wulfkühle *et al.*, 2003). Tumormarker können onkofötale Antigene, mit Antikörpern erkennbare Epitope, Hormone oder Enzyme darstellen. Der Nachweis kann in Körpersekreten



wie Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Abstrichen etc. erfolgen und bietet den Vorteil einer einfachen, wenig invasiven und kostengünstigen Diagnostik-Methode (Verma *et al.*, 2003). Tumormarker können sowohl auf RNA-, DNA oder Protein-Ebene eingesetzt werden und mit Methoden wie RT-PCR, oder Antikörper-basierenden Methoden wie Immunhistochemie und -zytochemie, ELISA, FISH sowie Enzym-Immunoassays nachgewiesen werden (Goessl, 2003; Wulffkuhle *et al.*, 2003).

Die Ansprüche an einen diagnostischen Tumormarker umfassen sowohl eine hohe Sensitivität, d.h. die Detektion des Gens oder Proteins in einer möglichst großen Anzahl von Karzinomen, als auch eine hohe Spezifität, welche sich auf die spezifische Detektion von Karzinomen im Vergleich zu nicht karzinogenen Normalgeweben bezieht. Die besten Spezifitätskriterien würde ein rein karzinomspezifisch exprimiertes Gen erfüllen. Da in Karzinomen hochregulierte Gene jedoch oft auch in benignen Zellen in einem bestimmten Expressionsstatus exprimiert werden können, liegt der Fokus auf der Identifizierung von Genen, die möglichst große Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe aufweisen. Durch das Festlegen von Cut-off-Werten können somit maligne und benigne Stadien voneinander abgegrenzt werden. Desweiteren wäre es von Vorteil, wenn molekulare Marker auch frühe Tumorstadien oder wenig expandierte, kleine Tumoren erfassen, die geringere Genexpressionen aufweisen. Die Tatsache, dass die Tumorenstehung und -progression ein komplexer und heterogener Vorgang ist, bedeutet, dass oft mehrere Gene an der Pathogenese beteiligt sind und andererseits die einzelnen Gendefekte individuell oder kombiniert vorliegen können (Etzioni *et al.*, 2003). Dies zeigt die Problematik der Identifizierung eines einzigen Gens oder Proteins, das universell als Marker einsetzbar ist. Neue Ansätze liegen in der Kombination von zwei oder mehreren Markern, um eine erhöhte Sensitivität bezüglich der Tumordetektion zu erreichen. (Etzioni *et al.*, 2003).

Der erste Tumormarker, der in der Krebsdiagnostik zur Anwendung kommt, ist das prostataspezifische Antigen (PSA), das als Serum-Marker in Personen mit Prostatakarzinom nachgewiesen werden kann. Hierbei werden je nach Tumorprogression erhöhte Werte des Glykoproteins PSA detektiert. Schwierigkeiten bei der Diagnose bestehen in der Wertigkeit zwischen verschiedenen molekularen PSA-Formen, wie freies PSA (fPSA), Gesamt-PSA (tPSA), an den Serin-Protease-Inhibitor  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin gebundenes PSA (ACT-PSA) und komplexes PSA (Beduschi *et al.*, 1998; Stenman *et al.*, 1991, Stephan *et al.*, 2000). Es wurde nachgewiesen, dass das Verhältnis von fPSA zu tPSA Prostatakarzinome mit der höchsten Spezifität diagnostiziert (Stephan *et al.*, 2000). Der PSA-Marker zeigt jedoch eine verminderte Spezifität aufgrund eines nicht rein karzinomspezifisch erhöhten Serum-Levels.

Eine erhöhte PSA-Expression kann ebenso in entzündlich veränderten Zellen sowie in benignen Zellproliferationen der Prostata auftreten und im Blut detektiert werden (Caplan *et al.*, 2002). Zudem treten in 20 % der an Prostata-Karzinom erkrankten Individuen keine erhöhten PSA-Werte auf, vor allem bei stark entdifferenzierten Karzinomen. Daher kann dieser Diagnostik-Marker bisher nur in Kombination mit digitalen rektalen Untersuchungen angewendet werden. Da zudem altersabhängig variierende PSA-Werte auftreten, orientiert man sich derzeit an altersentsprechenden Referenzbereichen Prostata-gesunder Männer. Der PSA-Marker gibt somit lediglich eine Wahrscheinlichkeit über das Vorliegen eines Prostatakarzinoms an. Dennoch konnten seit der Einführung eines PSA-Screenings 1991 in den USA bei der Erstdiagnose wesentlich mehr lokalisierte Prostatakarzinome ohne Metastasen erfasst werden, was zu rückläufigen Sterblichkeitsraten geführt hat. Zudem belegen Studien, dass aufgrund der Anwendung des PSA-Markers Biopsien zwischen 19 und 64 % reduziert wurden (Partin *et al.*, 1996; Van Cangh *et al.*, 1996; Vashi *et al.*, 1997; Woodrum *et al.*, 1998). Die Kombinationen von verschiedenen molekularen PSA-Formen mit einem weiteren tumorassoziierten Gen, beispielsweise mit Kallikrein 2, wird diskutiert und könnte zu einer erhöhten Spezifität führen (Stephan *et al.*, 2000).

Ein neuer diagnostischer Marker, der in der Zervixkarzinom-Diagnostik eingesetzt wird, ist eine Überexpression des Tumorsuppressorgens  $p16^{\text{INK4a}}$  ( $p16$ , *inhibitor of cyclin-dependent kinases 4*). Der Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitor  $p16^{\text{INK4a}}$  besitzt eine Funktion bei der Retinoblastom-Protein-vermittelten Kontrolle vom Übergang der G1- in die S-Phase des Zellzykluses (Rocco *et al.*, 2001). Trotz einer funktionellen Inaktivität aufgrund von Genmutationen oder Promotor-Hypermethylierung wurde in Zervixkarzinomen eine starke nukleäre und zytoplasmatische Überexpression von  $p16^{\text{INK4a}}$  nachgewiesen (Klaes *et al.*, 2001; Rocco *et al.*, 2001; Sano *et al.*, 1998). Diese Hochregulation tritt vermutlich in Folge der funktionellen Inaktivierung des Retinoblastom-Genproduktes auf, welche durch die Bindung von E7 Onkoprotein des humanen Papilloma Viruses (HPV) verursacht wird (Khleif *et al.*, 1996). Die erhöhte Expression von  $p16^{\text{INK4a}}$  kann in zervikalen Biopsien oder Zellabstrichen nachgewiesen werden, die dysplastische oder neoplastische Epithelzellen enthalten (von Knebel Doeberitz, 2002). In inflammatorischen und metaplastischen Läsionen ist  $p16^{\text{INK4a}}$  sporadisch, in normalen Zervix-Epithelzellen nicht detektierbar (Klaes *et al.*, 2001). Somit ist  $p16^{\text{INK4a}}$  als Marker sowohl für leichte und mittelschwere Dysplasien (CIN I und CIN II), als auch für schwere Dysplasien und *Carcinoma in situ* (CIN III) in der Zervixkarzinom-Diagnostik einsetzbar (Klaes *et al.*, 2001).



Das  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) ist ein Glykoprotein der Albumin Genfamilie, welches in erhöhter Konzentration in bis zu 90 % der Leberzellkarzinome auftritt (Di Bisceglie *et al.*, 1998; Mizejewski, 2001). AFP als Diagnostik-Marker für das Leberkarzinom weist jedoch eine geringe Spezifität auf. Die Gründe liegen in einer erhöhten *AFP*-Expression während normalen Zellproliferations-prozessen der Leber, wie bei Leberzirrhosen und bei Hepatitis-Virus-Erkrankungen (Di Bisceglie *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2003; Sherman, 2001; Trevisani *et al.*, 2001). Desweiteren sind erhöhte AFP-Expressions-Werte während der Schwangerschaft und in Keimzelltumoren detektierbar, wohingegen Lebermetastasen meistens keine erhöhte *AFP*-Expression zeigen (Di Bisceglie *et al.*, 1998). Die AFP-Konzentration im Blut kann daher nur bedingt Hinweise auf maligne Leberkarzinome geben und wird als diagnostisches Mittel kontrovers diskutiert (Fujiyama *et al.*, 2002; Johnson, 2001; Sherman, 2001). Die Möglichkeit der Diskriminierung zwischen primären Leberkarzinomen und Lebermetastasen, die von einem anderen Primärtumor ausgehen, kann durch die Kombination der Serum-Marker AFP und des tumorassozierten Antigens CEA (karzinoembryonales Antigen) erfolgen. Eine hohe *AFP*-Expression und eine geringe *CEA*-Expression ist in primären Leberkarzinomen detektierbar, wohingegen bei einem gegenläufigen Befund die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen von Lebermetastasen eines anderen Primärtumors gegeben ist.

CEA ist ein Mitglied der Immunoglobulin Familie und wurde bereits 1965 als erstes onkofötales Antigen beschrieben (Gold und Freedman, 1965). Das Protein wird auf MHC-Komplexen präsentiert und besitzt Funktionen bei der Inhibierung der Apoptose, bei der Kooperation mit verschiedenen Proto-Onkogenen, wie *BCL-2* und *C-MYC*, bei der intrazellulären Adhäsion und in Signaltransduktionsprozessen (Benchimol *et al.*, 1989; Hammarstrom, 1999; Sreaton *et al.*, 1997). Eine *CEA*-Überexpression wurde in verschiedenen Tumorentitäten, wie Kolon-, Brust- und Bronchialkarzinomen nachgewiesen. Als Diagnostik-Marker ist CEA vermindert spezifisch, da neben der erhöhten Expression in Metastasen das tumorassozierte Antigen auch bei Leberzirrhosen, Pankreatitis, Lungenemphysemen und Bronchitis nachweisbar ist (Ruibal, 1992). Daher finden die Marker AFP und CEA ihre Anwendung hauptsächlich im Screening von Risikopatienten und als Verlaufskontrolle während der Therapie. Durch wiederholtes Messen dieser Tumormarker im Verlaufe der Erkrankung kann die Effektivität von Therapien und das bestehende Stadium der Karzinogenese überprüft werden.

Für die Diagnose des Mammakarzinoms stehen derzeit keine Tumormarker zur Verfügung, welche eine ausreichende Spezifität und Sensitivität erreichen. Lediglich frühe, vor einem klinischen oder radiologischen Nachweis auftretende Metastasen können durch die simultane

Bestimmung von CEA und CA 15-3 bei 60-80 % bei Patientinnen mit Mammakarzinom detektiert werden (Molina *et al.*, 1999). Eine Überexpression des Proto-Onkogens *HER-2* kann in 25-30 % der Patientinnen mit metastasierendem Mammakarzinom detektiert werden und ist ausschlaggebend für die Therapieentscheidung (Cooke *et al.*, 2001). Die Funktion des *HER-2*-Rezeptors besteht in der Aufnahme von Wachstumsfaktoren, um das Überleben der Krebszellen zu sichern und kann mittels monoklonalem Antikörper, der gegen eine extrazelluläre *HER-2*-Domäne gerichtet ist, blockiert werden (Menard *et al.*, 2003).

Auch für die Diagnose des Blasenkarzinoms werden bisher keine molekularen Marker eingesetzt. Ansätze bestehen in der Suche nach Kandidaten-Genen, durch deren Expressionsnachweis im Urin spezifisch maligne Karzinomzellen detektiert werden könnten. Verschiedene Kandidaten-Gene wie *BTA* (*bladder tumor antigen*), Telomerase, Fibrin und *NMP22* (*nuclear matrix protein 22*) werden als potentielle Tumormarker diskutiert. Keines der bisher bekannten Kandidaten-Gene wurde jedoch in klinischen Studien mit einer ausreichenden Sensitivität für eine potentielle Anwendung zur Diagnose beurteilt (Glas *et al.*, 2003; Eissa *et al.*, 2003).

Molekulare Marker, die zur Diagnose des kolorektalen Karzinoms, vor allem zur Detektion des frühen Tumorstadiums der Adenome von Vorteil wären, existieren nicht. Neue Ansätze liegen in der Detektion von mutierter DNA im Stuhl, die in Form von multiplen Markern wie K-RAS, p53, APC und BAT-26 sowohl für Karzinome als auch für premaligne Vorstufen nachgewiesen wurden (Ahlquist *et al.*, 2000). In der erblichen Form des Kolonkarzinoms können Marker, welche die charakteristischen Mutationen in den DNA-Reparatur-Genen *MSH-2* und *MLH-1* für HNPCC (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*) und *APC* für FAP (*familial adenomatous polyposis*) nachweisen, eingesetzt werden (Kinzler *et al.*, 1991; Toyooka *et al.*, 1995).

Ebenso sind Tumormarker zur Diagnose des Bronchialkarzinoms nicht existent. CYFRA 21-1, die neuronenspezifische Enolase (NSE), das „*Pro-Gastrin-releasing*“-Peptid (ProGRP), das „*Squamous cell carcinoma Antigen*“ (SCCA) und CEA können derzeit als prognostische Marker fungieren, die das Ausmaß der Erkrankung, den histologischen Typ des Bronchialkarzinoms oder Hinweise auf Metastasen geben (Alvarez-Sala *et al.*, 1995; Dienemann *et al.*, 1994; Picardo *et al.*, 1996; Stieber *et al.*, 1997). Hohe *ProGRP*-Expressionen beispielsweise weisen auf kleinzellige Bronchialkarzinome hin, wohingegen niedrigere *ProGRP*-Expressionen auf nicht kleinzellige Karzinome und sehr niedrige Werte auf keine maligne Erkrankung hindeuten (Stieber *et al.*, 1997). Für diagnostische Ansätze sind diese Marker aufgrund verminderter Spezifität nicht geeignet. Desweiteren wird der Nachweis von

Punktmutationen im Codon 12 des Onkogens *K-RAS* als molekularer Marker für Lungen-Adenokarzinome diskutiert (Mills et al., 1995). In 56 % der Bronchialsekrete von Patienten mit Adenokarzinom konnten *K-RAS*-Mutationen mittels der PCR-Methode detektiert werden.

Heute sind bis auf wenige Ausnahmen (Prostatakarzinom, Zervixkarzinom) in der Krebsdiagnostik einsetzbare Tumormarker noch nicht verfügbar. Dies liegt in einer unzureichenden Sensitivität sowie Spezifität bezüglich der Malignität begründet. Molekulare Marker finden vielmehr ihre Anwendung bei der Überwachung von Risikogruppen, bei der Stadieneinteilung von Tumoren und in der Verlaufskontrolle von Therapien. Beim Einsatz als diagnostisches Mittel sind die derzeit existierenden molekularen Marker oft hilfreich, da sie als negativ-Nachweis weitere Diagnostikverfahren ausschließen oder in Kombination mit anderen klinischen Verfahren Befunde absichern. Doch gilt es weitere potentielle molekulare Marker zu identifizieren, welche die Diagnose von Tumoren, vor allem in frühen Stadien verbessern.

## **1.7 Zielsetzung der Arbeit**

Die für das kolorektale Karzinom und das Bronchialkarzinom ursächlichen molekularen Mechanismen sind größtenteils noch nicht bekannt. Um die Prozesse der Tumorenstehung und -progression aufzuklären, erwächst die Notwendigkeit Gene zu finden, die in diesen Tumoren im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe überexprimiert werden. Diese Arbeit hatte die Identifikation von Sequenzen bzw. Genen zum Ziel, die eine tumorspezifische Überexpression im Kolon- bzw. Bronchialkarzinom aufweisen. Solche Gene können in der Krebsdiagnostik als molekulare Marker eingesetzt werden. Um differentiell exprimierte Gene zu ermitteln, wurde in dieser Arbeit eine quantitative RNA-Expressionsstudie durchgeführt. Als Kriterium hierbei galt es Sequenzen zu identifizieren, die in einer möglichst großen Anzahl von Tumoren eine signifikante Überexpression aufweisen und für die bisher noch kein Zusammenhang mit Tumorentstehung oder -progression beschrieben wurde. Die RNA-Expressionsstudie umfasste die Expressions-Analyse von Kandidaten-Genen, die zum einen durch die Hybridisierung von Protein-Arrays und zum anderen durch die in-silico-Analyse von EST-Datenbanken detektiert wurden.

Ein differentiell exprimiertes und bisher unbekanntes Gen wurde in dieser Arbeit identifiziert, näher charakterisiert und in immunhistochemischen und -zytochemischen Analysen in Hinsicht auf eine Eignung als potentieller diagnostischer Marker analysiert.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Wenn nicht anders aufgeführt wurden die Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (Seelze), Merck (Darmstadt), Sera (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), Calbiochem (Bad Soden), Gibco BRL/Invitrogen (Karlsruhe) und Bio Rad (München) bezogen.

### 2.2 Lösungen

Zur Herstellung von Lösungen wurde  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Bidest}}$  verwendet.

DNA-Loading-Puffer

15 % Ficoll 400, 0,25 % Bromphenolblau, 50 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 7,5)

Ethidiumbromid

Stammlösung: 10 mg/ml

TE-Puffer

10 mM Tris-HCL (pH 7,4), 1 mM EDTA

10 x Lämmli-Lauf-Puffer

250 mM Tris, 1,9 M Glycin, 1 % SDS

2 x Lämmli-Proben-Puffer

100 mM Tris/HCL (pH 6,8), 20 % Glycerol, 4 % SDS, 200 mM DTT, 0,05 % Bromphenolblau

Coomassie-Färbelösung

500 ml Methanol, 75 ml Eisessig, 2 g Coomassie brilliant blue, 425 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Bidest}}$

Coomassie-Entfärbelösung

50 % Methanol, 7 % Eisessig

Blocking-Puffer

1 x PBS, 10 % Milchpulver, 0,1 % Tween20

Wasch-Puffer

1 x PBS, 0,1 % Tween20

Solubilisierungs-Puffer

8 M Harnstoff , 250 mM NaCl in PBS (pH 7,4), sterilfiltriert

Phosphat-Puffer

(pH 8,0): 46,6 ml 500 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3,4 ml 500 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

ELISA-Blocking-Puffer

1 x PBS, 3 % BSA, 0,1 % Tween20

Transfer-Puffer

380 mM Glycin, 50 mM Tris-aminomethan, 0,05 % SDS, 20 % Methanol

Stripping-Puffer

62 mM Tris-HCL (pH 6,8), 2 % SDS, 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

### 2.2.1 Northern Blot Lösungen

Maleinsäue-Puffer

(pH 7,5): 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl

Blocking-Puffer

Blocking Reagenz 1:10 verdünnt in Maleinsäure Puffer, autoklaviert

Detektions-Puffer

(pH 9,5): 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM  $\text{MgCl}_2$

Wasch-Puffer I

2 x SSC, 0,1 % SDS

Wasch-Puffer II

0,1 x SSC, 0,1 % SDS

### 2.2.2 Lösungen zur Herstellung einer Peptid-Säule

#### Puffer I

(pH 8,0): 0,2 M Borsäure, 0,15 M NaCl,

#### Puffer II

(pH 7,0): 0,1 M Borsäure, 0,15 M NaCl

#### Ellmann's Reagenz

1,9 mg DTNB/100 µl DMSO

### 2.2.3 Lösungen für immunhistochemische und immunzytochemische Färbungen

#### Target-Retrieval-Lösung

ChemMate™ Buffer for Antigen Retrieval (S2003), 1:10 verdünnt H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub>, pH 6,0 (DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark)

#### Wasch-Puffer

10 x Wasch Buffer (S3006), 1:10 verdünnt H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub>, (DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark)

#### Saccomanno-Lösung

20 ml Carbowaxlösung (10 ml 50 %iges Ethanol, 10 ml Polyethylenglykol 1500), 250 ml 100 %iges Ethanol, 240 ml H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub>, sterilfiltriert

## 2.3 Medien zur Bakterienzucht

#### LB-Medium

(pH 7,0): 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 L H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>, autoklavieren

#### LB-Agar

(pH 7,0): 1 L LB-Medium, 15 g Agar, autoklavieren

#### Ampicillin, Kanamycin

Stammlösung. 100 mg/ml in H<sub>2</sub>O, sterilfiltrieren, Arbeitskonzentration: Ampicillin 100 µg/ml; Kanamycin 50 µg/ml

## 2.4 Zellkultur-Medien

RPMI 1640 W/Glutamax	Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecoc's DMEM	Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe
FCS (fötales Rinderserum)	Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe
Gentamycin	Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe
HCF (Hybridoma Cloning Factor)	Biochrom, Camebridge, UK
HAT (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin)	Sigma-Aldrich, Seelze
HT (Hypoxanthin, Thymidin)	Sigma-Aldrich, Seelze

RPMI-Medium

RPMI 1640 W/Glutamax, 10 % FCS, 0,1 % Gentamycin

Dulbecco's MEM

Dulbecco's MEM, 10 % FCS, 0,1 % Gentamycin

Serumfreies RPMI-Medium

RPMI 1640 W/Glutamax, 0,1 % Gentamycin

HAT-Selektionsmedium

330 ml RPMI 1640 W/Glutamax, 100 ml FCS, 50 ml HCF, 1 x HAT, 10 ml Glutamin, 0,1 % Gentamycin

HT-Medium

400 ml RPMI 1640 W/Glutamax, 100 ml FCS, 1 x HT, 0,1 % Gentamycin

Hybridom-Einfiermedium

FCS, 10 % DMSO

## 2.5 Sonstiges

Filme

Kodak Biomax Light 1 (Amersham, Braunschweig)

Agarose

Electrophoresis Grade (Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe)

Agarose 1000 (Low Melting point Agarose)

Ultra Pure (Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe)

Multiple Tissue Northern (MTN<sup>®</sup>) Blot

Human 12 Lane I, (Clontech, Palo Alto, USA)

Human MTC<sup>®</sup> Panel II

(Clontech, Palo Alto, USA)

Protein-Arrays (Filternummer 800) und Bakterienklone

(Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD), Berlin)

## 2.6 Enzyme

DNase I	[1 unit/ $\mu$ l]	Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe
Reverse Transkriptase	[4 units/ $\mu$ l]	Qiagen, Hilden
PowerScript Reverse Transkriptase	[5 units/ $\mu$ l]	Clontech, Palo Alto, USA
Klenow Fragment der DNA-Polymerase I	[10 units/ $\mu$ l]	Fermentas, Hanover, USA
Advantage 2 Polymerase Mix	[10 units/ $\mu$ l]	Clontech, Palo Alto, USA
Expand Long Template PCR-System	[10 units/ $\mu$ l]	Roche Diagnostics, Mannheim
Enzym Mix (Taq DNA Polymerase, Proofreading-Polymerase)		
Restriktionsendonuklease <i>Nco</i> I	[10000 units/ $\mu$ l]	Biolabs, Beverly, USA
HotStarTaq DNA Polymerase		Qiagen, Hilden

## 2.7 Vektoren

pTrcHis2-TOPO Klonierungsvektor	Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe
pCRL-XL-TOPO Klonierungsvektor	Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe



## 2.8 Verwendete Antikörper

**Tab. 2.1: Primärantikörper**

Antikörper	Code	Herkunft	Spezies
anti-Histidin-Tag	dia 900	Dianova, Hamburg	Maus, monoklonal
anti-Ki67-FITC (clone MIB-1)	H 7241	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark	Maus, monoklonal
anti-DNase X		Johannes Coy	Ratte, monoklonal
anti-LUMA-10		Birgit Wasser, mtm laboratories AG	Kaninchen, polyklonal
anti-LUMA-15A		Birgit Wasser, mtm laboratories AG	Kaninchen, polyklonal
anti-LUMA-15A (4.12H9)		Birgit Wasser, mtm laboratories AG	Maus, monoklonal
anti-LUMA-15A (4.15E12)		Birgit Wasser, mtm laboratories AG	Maus, monoklonal
anti-LUMA-15A (2 G3)		Birgit Wasser, mtm laboratories AG	Maus, monoklonal

**Tab. 2.2: Sekundärantikörper**

Antikörper	Code	Herkunft	Spezies
HRP konjugiertes anti-Mensch IgG	709-035-149	Dianova, Hamburg	Esel, polyklonal
Alkalische Phosphatase konjugiertes anti-Digoxigenin IgG	1 093 274	Roche Diagnostics, Mannheim	Schaf, polyklonal
HRP konjugiertes anti-Maus IgG	P 0260	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark	Kaninchen, polyklonal
HRP konjugiertes anti-Kaninchen IgG	111-035-045	Dianova, Hamburg	Ziege, polyklonal
EnVision™, HRP konjugiertes Anti-Maus/Kaninchen IgG	K4065	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark	Ziege, polyklonal
EnVision™, HRP konjugiertes Anti-Kaninchen IgG	K4002	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark	Ziege, polyklonal
Alkalische Phosphatase konjugiertes anti-Ratte-IgG	112-055-003	Dianova, Hamburg	Ziege, polyklonal
Alkalische Phosphatase konjugiertes Anti-FITC IgG	D 5101	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark	Kaninchen, polyklonal

## 2.9 Versuchstiere

Für die Produktion von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern wurden Mäuse des BALB/c Stammes und Kaninchen verwendet, die bei Charles River (Sulzfeld) und Herrn Dr. Rackwitz (DKFZ, Heidelberg) mit KLH-gekoppeltem Peptid immunisiert wurden.

## 2.10 Klinisches Material

Die Lungengewebe- und Serumproben von Patienten wurden von der Firma Clinomics Biosciences (Pittsfield, USA) bezogen oder von Dr. P. Zatloukal (Klinikum der Karls-Universität, Prag) zur Verfügung gestellt. Alle weiteren verwendeten Gewebe- und Serumproben wurden vom Klinikum Mannheim (Dr. F. Willeke) oder vom Universitätsklinikum Heidelberg (Prof. Dr. M. von Knebel Doeberitz) zur Verfügung gestellt.

Bei den Geweben handelte es sich um operativ entfernte Gewebestücke von Karzinomen, bzw. um den entsprechenden Patienten entnommene Normalgewebe. Das Gewebematerial wurde histopathologisch untersucht und sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Bei allen Kolonkarzinom-Geweben und -Seren handelte es sich um Patientenproben von sporadisch auftretende Tumoren.

Die in Tab. 2.4 aufgeführten Gewebe wurden für quantitative Real-Time-PCR-Analysen eingesetzt. Objektträger mit Ausstrichen von Patienten-Bronchialsekreten wurden von Herrn Prof. Dr. A. Böcking (Zytopathologie, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Folgende Multi-Tissue-Arrays (MTA), mit Proben von Normal- und Tumorgeweben, wurden für immunhistologische Färbungen verwendet: Kolon-MTA, Lunge-MTA (MTA-01/03, MTA-03/03), Zervix-MTA, Ovar-MTA, Magen-MTA (mtm laboratories AG, Heidelberg), Blasenkarzinom-MTA (Biocat, Heidelberg), High-Density-Lung-MTA HD 28 (Clinomics Biosciences, Pittsfield, USA).

**Tab. 2.3: Verwendete Seren**

<b>Serum</b>	<b>Diagnose</b>
<b>100S</b>	Kolorektales Rektum-Karzinom
<b>B363</b>	Kolonkarzinom
<b>120S</b>	Kolorektales Rektum-Karzinom
<b>119S</b>	Kolorektales Rektum-Karzinom
<b>107S</b>	Kolorektales Rektum-Karzinom
<b>102S</b>	Kolorektales Rektum-Karzinom
<b>20S</b>	Kolorektales Sigma-Karzinom
<b>26S</b>	Kolonkarzinom
<b>24S</b>	Kolorektales Kolonkarzinom
<b>27S</b>	Kolorektales Kolonkarzinom
<b>363</b>	Kolonkarzinom
<b>16</b>	Kleinzelliges Lungenkarzinom
<b>19</b>	Kleinzelliges Lungenkarzinom
<b>20</b>	Kleinzelliges Lungenkarzinom
<b>28</b>	Kleinzelliges Lungenkarzinom
<b>29</b>	Kleinzelliges Lungenkarzinom
<b>2340</b>	NSCLC mit Anteilen von squamösen und glandolären Differenzierungen (Lunge)
<b>2067</b>	Plattenepithelkarzinom (Lunge)
<b>2059</b>	schlecht differenziertes Adeno-squamöses Karzinom (Lunge)

**Tab. 2.4: Für quantitative Real-Time-PCR-Analysen verwendete Tumorgewebe.** Zu jedem mit T bezeichneten Tumorgewebe existierte die korrespondierende Normalgewebe-Probe aus der gleichen Person.

Gewebe	Diagnose
76T	Rektum-Karzinom
105T	Rektum-Karzinom
99T	Kolonkarzinom
110T	Sigma-Karzinom
119T	Kolonkarzinom
120T	Kolorektales Kolonkarzinom
31T	Kolorektales Rektum-Karzinom
79T	Kolorektales Kolonkarzinom
83T	Kolorektales Rektum-Karzinom
288T	Sigma-Karzinom
86T	Kolorektales Rektum-Karzinom
98T	Kolorektales Kolonkarzinom
55T	Kolorektales Kolonkarzinom
82T	Kolorektales Sigma-Karzinom
290T	Sigma-Adenokarzinom
292T	Sigma-Adenokarzinom
297T	Coecum-Adenokarzinom
301T	Kolon-Adenokarzinom
298T	Endometrium-Karzinom
289T	Sigma-Adenokarzinom
1T	Lungen-Adenokarzinom
2T	Lungen-Adenokarzinom
3T	Lungen-Adenokarzinom
4T	Lungen-Adenokarzinom
5T	Lungen-Adenokarzinom

## 2.11 Primer

Primer wurden mit Hilfe des Programms Primer aus HUSAR (*Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources*) ermittelt und von der Firma Gibco BRL/Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Wenn nicht anders angegeben wurden sie so ausgewählt, dass sie eine Länge zwischen 18-20 Basenpaaren, einen GC-Gehalt von 50-60 % und eine Schmelztemperatur von 58-62 °C umfassten. Zudem sollten möglichst die beiden letzten Basen am 3'-Ende durch ein G oder C repräsentiert sein, um eine feste Anbindung der Polymerase an den DNA-Strang zu gewährleisten. Die Primer für Real-Time-PCR-Analysen wurden gemäß den Richtlinien der Primer Express Software, Version 1.0 (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) ausgewählt. Alle Primer wurden mittels einer BLAST-Datenbanksuche auf ihre Genspezifität überprüft.

Tab. 2.5: Verwendete Primer

Primerbezeichnung	Sequenz (5' - 3')
L-115 forward	CACTTGCAGAAGATTTTCAGCC
L-116 reverse	ACCCACCAGTTCTCCATGAG
L-117 reverse	GAGGTCTTTGGGCTGCTTC
L-118 reverse	ACCATCTTTGCAGTCTGCG
L-119 forward	TTTCCTCGAAGTCCCAACC
L-98 forward	TTTTAAAGCAGGACTCGTAGGG
L-99 reverse	TCCAGCCCTTACAGCAGATC
L-94 forward	CAGCTCAGAGATGTGTGACTCC-
L-70894 forward	AGTGTGAAGCTGGATGCTCTC-
L-96 forward	GTTGCCATTGGGTTACAG
L-62 reverse	TGATATCCTGGCCTTGCAG
L-5354 forward	AACAAGATGGATTCAAAGGCC
L-5365 reverse	TGTCAGTTGAACATTTTCTGCC
L-5365.1 reverse	ATGTTTTCTACCCAATATGGC
L-5365.4 forward	CTCGTCAGGCGATACTCC
L-5365.3 forward	CTCGTCAGGCGACCTTATATC
L-66450 forward	ACATAGAGTGACCCAGGAAGC
L-63369 forward	TTGATCCAGAAAGTGTGTGAGC
L-63783 forward	CAACCTGGTGTGCAAAGTGAG
L-5364.16 forward	ATGGAAATCACCCTCTGAGAG
L-5364.31 reverse	GGCTGGCAGAGCACCATTTTTT
L-5364.46 forward	TCAGGCGGTACCTATTAACAC
L-120 forward	CCCTGGTATTTTCCCTCTGC
L-121 reverse	GTTTCCAGCCCTTACAGCAG
L-25 reverse	TGCAGTTGGCCAGCTTAGAA
L-2 reverse	TATTGGGTAGGAAAACATCGTC
7072.1 forward	AATGACACTCCACTCTGCCC
7073 reverse	TTGTTTGGAGGGTGTGGTG
5412 forward	TACCCATGAGGGAAAACGTC
5413 reverse	TCTCATTACCACAGAATCTGGG
5088.1 forward	GGCCCAAATGATGGATTACC
5089.1 reverse	GGCTTCGCATCAGAAGAAAC
3026 forward	TAGGCTGCATCAAGGCTCC
3027 reverse	AGCTTCCCTCACAGCTTCTG
3080 forward	TTTTTTTTTTCGGACGGG
3081 reverse	TCCAGGTACCTAGCGCGTTC
3072.1 forward	AATGACACTCCACTCTGCCC
3071 reverse	ACTGTGAAGAGAGTCAGAGGGC
T7, forward	CGGGATATCACTCAGCATAATG
$\beta$ -Actin forward	CCTAAAGCCACCCCACTTCTC
$\beta$ -Actin reverse	ATGCTACACCTCCCCTGTGTG
pTrcHis2TOPO forward	TATCGATTAAATAAGGAGG
pTrcHis2TOPO reverse	CAGATCCTC TTCTGAGATGAG

## 3 Methoden

### 3.1 Übersicht über die Vorgehensweise in dieser Arbeit

Zwei verschiedene Ansätze, die serumbasierte Hybridisierung von Protein-Arrays sowie die in-silico-Analyse von EST-Datenbanken (*expressed sequence tag*), dienen zur Identifizierung von tumorassoziierten Genen. Die identifizierten Gene oder Gensequenzen wurden anhand von quantitativen Real-Time-PCR-Analysen (TaqMan) auf ihre differentielle Genexpression hin untersucht. Ein in Lungenkarzinomen differentiell exprimiertes und bisher unbekanntes Gen, das über die in-silico-Analyse von EST-Datenbanken detektiert wurde, wurde nachfolgend näher charakterisiert. Anhand einer Northern Blot Analyse wurde die Größe des Transkriptes ermittelt. Mit Hilfe der RACE-Methode und PCR-Analysen wurde die gesamte Länge des Transkriptes kloniert. Die Expressionsprofile verschiedener, identifizierter Spleiß-Varianten wurden mittels quantitativer Real-Time-PCR in einer Auswahl von Normalgeweben, in korrespondierenden Tumor- und Normalgeweben, und Tumor-Zelllinien analysiert. Ansätze zur funktionellen Charakterisierung des bisher unbekanntes Proteins lieferten computerbasierende Vorhersageprogramme. Polyklonale und monoklonale Antikörper wurden generiert, mit deren Hilfe das Expressionsprofil auf Protein-Ebene in immunhistochemischen und -zytochemischen Färbungen analysiert wurde.

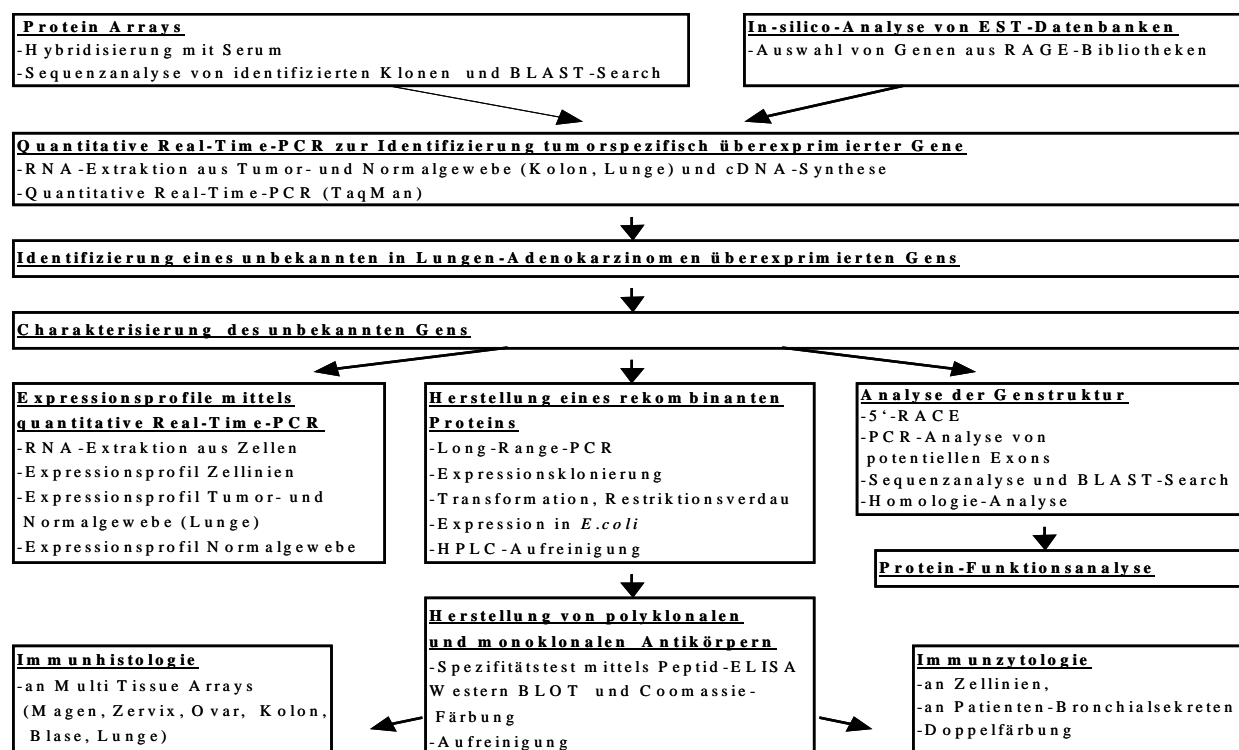


Abb. 3.1: Übersicht über die Vorgehensweise in dieser Arbeit

### 3.2 Kultivierung von Zelllinien

Für die Kultur der Zelllinien wurde RPMI-Medium oder Dulbecco's MEM-Medium verwendet. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und das Medium etwa zweimal pro Woche gewechselt.

**Tab. 3.1: Verwendete Zelllinien**

Zelllinie	Ursprung	Referenz	Medium
Lovo	Kolorektales Adenokarzinom	Drewinko <i>et al.</i> , 1978	Dulbecco's MEM
SW948	Kolorektales Adenokarzinom	Leibovitz <i>et al.</i> , 1976	Dulbecco's MEM
LS174T	Kolorektales Adenokarzinom	Tom <i>et al.</i> , 1977	RPMI-1640
SW480	Kolonkarzinom	Leibovitz <i>et al.</i> , 1976	RPMI-1640
SW707	Kolonkarzinom	Rakowicz-Szulczynska <i>et al.</i> , 1992	Dulbecco's MEM
H146	Kleinzelliges Lungenkarzinom	Carney <i>et al.</i> , 1985	RPMI-1640
H128	Kleinzelliges Lungenkarzinom	Gazdar <i>et al.</i> , 1980	RPMI-1640
H209	Kleinzelliges Lungenkarzinom	Carney <i>et al.</i> , 1985	RPMI-1640
Calu6	Lungen-Adenokarzinom	Fogh <i>et al.</i> , 1977	RPMI-1640
A549	Lungen-Adenokarzinom	Giard <i>et al.</i> , 1973	Dulbecco's MEM
P693	Lungen Plattenepithelkarzinom	von Knebel Doeberitz	Dulbecco's MEM
X63Ag8.653	Murine (BALB/c) Myelomlinie	Kearney <i>et al.</i> , 1979	RPMI-1640

### 3.3 RNA-Extraktion aus Gewebe und Zellen

Tumor- und Normalgewebe wurden nach dem Entnehmen aus dem Stickstofftank mit einem Skalpell in kleine Stücke zerschnitten und in einer Gewebemühle (MM200, Retsch, Haan) für 5 min bei Frequenz 25 zerkleinert. Zu dem zerkleinerten Gewebe wurde 1 ml RLT Lysepuffer (Qiagen, Hilden) mit 45 µl Mercaptoethanol zugegeben und erneut in der Gewebemühle für 5 min bei Frequenz 25 behandelt. Nach einer Zentrifugation von 30 sec bei 13.000 rpm wurden die Lysate auf Eis gelagert und im direkten Anschluss einer RNA-Extraktion unterzogen. Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Zur RNA-Extraktion aus Zellen wurden Zell-Pellets von ca. 10<sup>7</sup> Zellen hergestellt und in 600 µl RLT Lysepuffer resuspendiert. Die RNA-Extraktion aus Gewebe und aus Zellen wurde mit dem RNeasy Mini Kit (250) (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA wurde im Photometer bei 260 nm vermessen.

### 3.4 Reverse Transkription

Aus der isolierten Gesamt-RNA aus Gewebe und Zelllinien wurde mittels Reverser Transkription eine cDNA synthetisiert. Es wurde 1 µg RNA eingesetzt, die zur vorherigen DNase-Behandlung mit 2 µl 10 x DNase Puffer (Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe) und 1 µl DNase für 15 min bei RT inkubiert wurde, um die restliche in der RNA-Probe vorhandene DNA zu eliminieren. Nach der Zugabe von 2 µl EDTA (25 mM, Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe) wurde der Ansatz für 10 min bei 65 °C inkubiert. Zur cDNA-Synthese wurde der Omniscript<sup>TM</sup> RT Kit (200) (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Als Primer wurden „*random*“-Hexamere eingesetzt, da diese aus willkürlich ausgewählten, kurzen Oligonukleotiden bestehen und unspezifisch über die gesamte Länge der RNA binden. Dadurch können auch N-terminale Bereiche größerer Gene amplifiziert werden. Der Mastermix wurde wie folgt zupipettiert: 4 µl 10 x Puffer, 4 µl dNTP-Mix (je 5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP, Gibco/BRL Invitrogen, Karlsruhe), 1 µl „*random*“-Primer (500 µg/ml, Promega, Madison, USA), 1 µl RNasin (40 units/µl), 2 µl Reverse Transkriptase und 6 µl H<sub>2</sub>O. Für zwei Stunden wurde der komplementäre Strang bei 37 °C synthetisiert. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 3.5 Protein-Arrays

In dieser Arbeit wurden Protein-Arrays, die vom „Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH“ bezogen wurden, zur Identifizierung von tumorassoziierten Genen eingesetzt.

Die Hybridisierung von Protein-Arrays mit Patientenserum ermöglicht die Identifizierung von tumorassoziierten Proteinen aufgrund einer Immunantwort im Patienten. Ein hochdichter Protein-Array-Satz, bestehend aus zwei Filtern umfasst ungefähr 27.000 verschiedene Peptide oder Proteine, die aus einer Expressions-Bibliothek von humanem, fötalem Gehirn generiert wurden (Bussow *et al.*, 1998). Da häufig entwicklungsbiologisch relevante Gene auch später bei der Karzinogenese von Bedeutung sind (Basora *et al.*, 1998; Shiozawa *et al.*, 1988), enthält diese Bibliothek möglicherweise auch Gene, die tumorspezifisch exprimiert werden.

Die cDNA-Expressions-Bibliothek wurde in den bakteriellen Expressionsvektor pQE-30NST kloniert und in *E. coli* SCS1 transformiert. Der Vektor pQE-30NST ermöglicht die Expression von Histidin-getaggten Fusionproteinen, die über Affinitätschromatographie aufgereinigt und mittels immunologischer Detektion nachgewiesen werden können. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch IPTG, das den Agarplatten beigefügt wurde. Die Bakterien



auf den Agarplatten wurden lysiert und die so freigesetzten Proteine per Roboter auf positiv geladene PVDF-Membranen immobilisiert. In einem ersten Screening können stabile, rekombinante Fusionsproteine, die im richtigen offenen Leserahmen exprimiert werden, über anti-His-Antikörper detektiert und selektioniert werden. Diese Expressionsproteine wurden, nach der Aufreinigung über Nickel-Affinitätschromatographie, erneut unter denaturierenden Bedingungen auf PVDF-Membranen immobilisiert. Die generierten Membranen stellen die finalen Protein-Arrays dar.

Durch die Hybridisierung der Arrays mit Tumor-Patientenserum, können im Serum enthaltene Antikörper an spezifische auf den Filtern immobilisierte Antigene binden. Die Tatsache, dass Antikörper in Seren von Tumorpatienten spezifisch Strukturen erkennen, die selektiv auf autologen Tumoren, aber nicht auf normalen Zellen exprimiert werden, ist bekannt (Old und Chen, 1998). Die entsprechenden Gene der identifizierten Antigene können mittels Sequenzierung von Plasmid-DNA der Expressionsklone ermittelt werden und stellen Kandidaten für tumorassoziierte Gene dar.

### **3.5.1 Hybridisierung von Protein-Arrays**

Bei den Protein-Filtern handelt es sich um PVDF-Membranen, die vor dem erstmaligen Gebrauch für 2 min in Methanol aktiviert und dann für 10 min mit Wasch-Puffer gewaschen wurden. Die Protein-Arrays wurden über Nacht in Blocking-Puffer vorblockiert und anschließend für drei Stunden unter Schütteln mit Tumor-Patientenserum (1:1.000 in Blocking-Puffer) inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen der Arrays für 10 min in Wasch-Puffer unter Schütteln, erfolgte die Inkubation der Filter mit einem HRP-konjugierten Esel-anti-Mensch IgG-Antikörper (1:10.000 in Blocking-Puffer). Nach erneutem sechsmaligem Waschen für 10 min wurde die immunologische Detektion mittels eines sensitiven Chemilumineszenz-Systems (ECL Western Blotting reagent, Amersham, Braunschweig) durchgeführt. Die Signale wurden durch das Auflegen eines Röntgenfilms detektiert. Um die Filter erneut hybridisieren zu können, wurden die gebundenen Antikörper für 30 min im Wasserbad bei 50 °C mit einem Stripping-Puffer von den Membranen gelöst. Diese konnten so bis zu 12 mal hybridisiert werden.

### **3.5.2 Auswertung von hybridisierten Protein-Arrays**

Die Auswertung der auf den Röntgenfilmen erhaltenen Signale konnte anhand einer mit den Protein-Arrays zur Verfügung gestellten Gitter-Schablone vorgenommen werden. Hierbei konnten anhand eines Koordinatensystems positive Signale identifiziert und zugeordnet



werden. Da zur Kontrolle alle Proteine zweifach auf die Arrays immobilisiert sind, wurden nur Doppelspots in die Auswertung miteinbezogen, da es sich hier um spezifische Signale handelt. Anhand der ermittelten Koordinaten der positive Signale konnten die zugehörigen Expressionsklone eines identifizierten Proteins als Bakterienstocks (*E. coli* SCS 1) beim RZPD bestellt werden. Bakterienstocks wurden anschließend direkt zur Sequenzierung mit dem vektorspezifischen Primer T7 der Expressionsklone eingesandt. Mittels der erhaltenen Sequenzen konnten anhand von Datenbankanalysen die entsprechenden Gene identifiziert werden.

### 3.6 In-silico-Analyse von EST-Datenbanken

Die in-silico-Analyse von EST-Datenbanken umfasste die Expressionsanalyse von aus der Datenbank ausgewählten Sequenzen, die über einen RAGE-Ansatz (*Random Activation of Gene Expression*) ermittelt wurden (Harrington *et al.*, 2001).

Die RAGE-Bibliotheken wurden generiert, indem spezielle RAGE-Vektoren in das Genom von eukaryotischen Zellen eingebracht wurden. Diese Vektoren besitzen einen Promotor, der mit einem Exon mit anschließender Spleißsequenz verknüpft wurde. Nach der Transfektion von humanen Zellen der Fibroblasten-Zelllinie HT1080, inseriert der Vektor an zufälligen Stellen in das Genom. Wenn die Integration des Vektors in oder „*upstream*“ eines endogenen Gens erfolgt, kommt es zu einer Aktivierung der Expression des Gens. Die Insertion des Promotors führt dazu, dass stark exprimierte Gene minder stark exprimiert werden und eine Normalisierung der Transkripte auftritt. Zudem werden Gene aktiviert, die normalerweise in der Zelllinie in einem inaktiven Zustand vorliegen. Für viele der identifizierten Gene konnte ein biologisch aktives Protein nachgewiesen werden. Über den RAGE-Ansatz wurden so Sequenzen identifiziert, die in cDNA-Bibliotheken gewöhnlich unterrepräsentiert oder gar nicht vorliegen, und deren Transkripte somit nur schwierig zu identifizieren sind. Diese Sequenzen stellen Kandidaten für tumorassoziierte Gene dar.

Aus den RAGE-Bibliotheken in den NCBI-Datenbanken (*National Center for Biotechnology Information*) wurden in dieser Arbeit ESTs ausgewählt und einer zusätzlichen Selektion unterzogen. Es wurden nur solche RAGE-ESTs ermittelt, für die laut Datenbank zusätzlich eine Expression in Tumorgewebe und keine Expression in Normalgewebe nachgewiesen wurde. Die Expressionsprofile der ausgewählten Kandidaten-EST-Sequenzen wurden mittels quantitativer Real-Time-PCR analysiert.

### 3.7 Quantitative Real-Time-PCR

Die RNA-Expressionsprofile der über die Protein-Array-Hybridisierung und die in-silico-Analyse von EST-Datenbanken ermittelten Kandidaten-Gene wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR analysiert.

#### 3.7.1 Theorie der quantitativen Real-Time-PCR (TaqMan)

Die quantitative Real-Time-PCR wird eingesetzt, um die Expressionslevel der RNA in einer Probe zu bestimmen. Analog der konventionellen RT-PCR wird die RNA in cDNA umgeschrieben und diese mit spezifischen Primern amplifiziert. Mittels der quantitativen Real-Time-PCR kann im Vergleich zur konventionellen RT-PCR jedoch eine genaue Quantifizierung der amplifizierten PCR-Produkte vorgenommen werden.

Der TaqMan (ABI PRISM 7700 Sequence Detection System; PE Applied Biosystems, Foster City, USA) ist ein PCR-Gerät, das während der PCR-Zyklen mit einem Laser Fluoreszenz-PCR-Reaktionen anregt. Für die Detektion werden in den Reaktionen spezielle Fluorochrome verwendet. In den hier beschriebenen Experimenten wurde das signalstarke Fluorochrom SYBR-Green aus dem PCR-Reagent Core Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) eingesetzt. SYBR-Green ist ein Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff, der sich spezifisch an die kleine Furche von doppelsträngiger DNA anlagert (Rye *et al.*, 1992). Durch diese Bindung wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches erhöht. Gemessen wird vom TaqMan-Gerät die direkte Zunahme der Fluoreszenz nach jedem Amplifikations-PCR-Zyklus. Durch die ständige Messung des PCR-Produktes ist eine Mengenbestimmung in der jeweils linearen Phase der PCR-Reaktion möglich, was zu wesentlich genaueren Ergebnissen bei der Quantifizierung als bei der Endpunktmessung der kompetitiven PCR führt (Gibson *et al.*, 1996) Somit lässt sich die Menge an DNA in der PCR-Reaktion durch den Fluoreszenzgewinn nach Ende eines jeden Elongationsschrittes detektieren (Bustin, 2000).

#### 3.7.2 Schmelzkurvenanalyse

Neben der Amplifikation des gewünschten Produkts kann es möglicherweise auch zur Amplifikation von Nebenprodukten oder Primerdimeren kommen, da das Fluorochrom SYBR-Green sich an jegliche doppelsträngige DNA anlagert. Diese Amplifikation kann während der PCR-Reaktion ebenso einen Fluoreszenzanstieg verursachen. Daher wurde im Anschluss an den PCR-Lauf eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (ABI Prism Dissociation Curve Software, PE Applied Biosystems, Foster City, USA), um zu differenzieren, ob es sich um ein

spezifisches Produkt oder um Primerdimere handelt. Dabei kommt es durch schrittweisen Temperaturanstieg zu einer Auftrennung der DNA-Doppelstränge entsprechend ihrer jeweiligen Schmelzpunkte in ihre Einzelstränge. Die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Die Schmelzkurven ergeben sich aus der ersten Ableitung ( $dF/dT$ ) der Funktion Fluoreszenzintensität ( $F$ ) in Abhängigkeit von der Temperatur ( $T$ ). Aufgrund der Schmelztemperaturen kann man zwischen spezifischen Produkten und Primerdimeren unterscheiden, da Primerdimere bei geringeren Temperaturen schmelzen als die spezifischen, größeren PCR-Produkte. Zudem wurde in einigen Fällen das amplifizierte PCR-Produkt in einem 2 %igen Agarosegel analysiert, um Aufschluss über die Größe des PCR-Produktes und eventuell vorhandene Nebenprodukte zu erhalten.

### 3.7.3 Durchführung der Real-Time-PCR

In Real-Time-PCR-Analysen wurde die aus Gewebe oder Zelllinien synthetisierte cDNA eingesetzt. Zudem wurde ein cDNA-„Panel“ (Clontech, Palo Alto, USA), bestehend aus verschiedenen Normalgeweben, verwendet. Die cDNA, die aus 1  $\mu\text{g}$  RNA synthetisiert wurde, wurde 1:20 in Aqua dest. verdünnt und 5  $\mu\text{l}$  hiervon in einer 25  $\mu\text{l}$  PCR-Reaktion eingesetzt. Die Primer wurden gemäß den vorgegebenen Richtlinien ausgewählt (PE Applied Biosystems, Foster City, USA). Zur Normalisierung der eingesetzten RNA-Menge wurde bei jedem PCR-Lauf das „House-keeping“-Gen  $\beta$ -Actin mitgeführt. Als Negativkontrolle wurde ddH<sub>2</sub>O bei jeder Amplifikation mitgeführt.

Tab. 3.2: Pipettierschema und PCR-Bedingungen eines 25  $\mu\text{l}$  Ansatzes für Real-Time-PCR

Reagenzien	Reaktion	Thermoprofil SYBR-Green-PCR:		
cDNA (aus 1 $\mu\text{g}$ RNA, 1:20 verdünnt)	5 $\mu\text{l}$	Schritt 1	95°C	10 min
SYBR-Green-Mix	12,5 $\mu\text{l}$	45 Zyklen	95°C	15 sec
Primer I (200 $\mu\text{M}$ )	0,125 $\mu\text{l}$		60°C	1 min
Primer II (200 $\mu\text{M}$ )	0,125 $\mu\text{l}$	Schritt 2	Schmelzkurve	
H <sub>2</sub> O	7,25 $\mu\text{l}$			

### 3.7.4 Analyse der relativen Expression

Die Quantifizierung der PCR basiert bei allen Systemen auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem sogenannten Threshold Cycle oder C<sub>T</sub>-Wert. Der C<sub>T</sub>-Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Am

Anfang der PCR-Reaktion wird nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen, da die Reporterfluoreszenz aufgrund der geringen Templatekonzentration im Reaktionsgefäß während der ersten PCR-Zyklen normalerweise nicht detektierbar ist. Die Quantifizierung der DNA-Menge beruht nicht auf absoluten Mengen an PCR-Produkt, sondern auf der Kinetik der PCR-Reaktion. Dafür nimmt man als Richtlinie den  $C_T$ -Wert, da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell ist und es in dieser Phase der PCR-Reaktion keine limitierenden Faktoren, wie Primer- oder Nukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibition der PCR-Reaktion durch Generation bestimmter Produkte, gibt.

Die Bestimmung der relativen Expression setzt sich aus drei Formeln zusammen:

Mit der Formel (1) berechnet man den Unterschied an Tresholdzyklen für die Zielsequenz und der Referenz. Hierbei wird auf das „*House-keeping*“-Gen  $\beta$ -Actin normalisiert.

$$\Delta C_T = \Delta C_{T,X} - \Delta C_{T,R} \quad (1)$$

$C_{T,X}$  bedeutet die Tresholdzyklen für die Zielsequenz und  $C_{T,R}$  die Tresholdzyklen für die Referenz, in diesem Ansatz  $\beta$ -Actin.

Bevor die relative Expression bestimmt werden kann, muss vorerst  $\Delta\Delta C_T$  mittels Formel (2) bestimmt werden.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T,T} - \Delta C_{T,N} \quad (2)$$

Da jeweils die Expressionsunterschiede zwischen Gewebepaaren von Tumor- und korrespondierenden Normal-Proben bestimmt wurden, bedeutet  $\Delta\Delta C_T$  der Unterschied an Tresholdzyklen für die normalisierte Tumorprobe ( $\Delta C_{T,T}$ ) und die normalisierte Normalprobe ( $\Delta C_{T,N}$ ).

Mit Hilfe des  $\Delta\Delta C_T$ , wie in Formel (3.1) oder (3.2) dargestellt, kann die relative Expression bestimmt ( $X_R$ ) werden.

$$X_R = 2^{\Delta\Delta C_T} \quad (3.1)$$

Wenn  $\Delta\Delta C_T$  negativ ist gilt :

$$X_R = 2^{\Delta\Delta C_T} * 1/\Delta\Delta C_T * (-1) \quad (3.2)$$

Die relative Expression  $X_R$  gibt die n-fache Überexpression oder Unterexpression im Tumor im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe an. Die Verwendung dieses Terms legt zu Grunde, dass die Effizienz der PCR-Reaktionen 100 % beträgt. Das bedeutet, dass bei jedem Amplifikationszyklus eine Verdoppelung der Ausgangsmoleküle stattfindet.

### 3.8 Northern Blot

Zur Detektion der Größe des *LUMA*-Transkriptes wurde eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Als Membran wurde ein humaner Multiple Tissue Northern Blot (Clontech, Palo Alto, USA) verwendet, auf dem Poly-A<sup>+</sup> RNAs von 12 verschiedenen Geweben aufgetragen sind.

#### 3.8.1 Herstellung einer Sonde mittels Digoxigenin-Markierung

Zur Herstellung einer spezifischen Gensonde wurde eine PCR durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde im Agarosegel auf die zu erwartende Größe überprüft, mit einem Skalpell ausgeschnitten und aufgereinigt. Die Primer wurden so gewählt, dass sie einen konservierten, nicht differentiell gespleißten Bereich des Gens *LUMA* auf Exon 9-10 abdecken (Primer: L-16/L-24). Die PCR-Bedingungen wurden wie unter 3.9 beschrieben gewählt. Nachfolgend schloss sich das Markieren des PCR-Produkts („Labeling“) mit Digoxigenin (Roche Diagnostics, Mannheim) an. Hierbei wurden 27 µl des aufgereinigten PCR-Produktes für 7 min bei 98 °C denaturiert und nachfolgend folgender Mix zupipettiert: 4 µl 10 x Klenow Fragment Puffer (Fermentas, Hanover, USA), 4 µl Digoxigenin Mix (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM Digoxigenin-11-dUTP, Roche Diagnostics, Mannheim), 4 µl Hexanukleotid-Mix (10 x konzentriert, Roche Diagnostics, Mannheim), 1 µl Klenow Fragment (DNA-Polymerase I, großes Fragment). Für den Digoxigenin-Markierungs-Vorgang wurde der Ansatz über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Digoxigenin-Markierung der Probe wurde auf ihre Effizienz überprüft, indem eine Verdünnungsserie (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 in H<sub>2</sub>O) auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Roche Diagnostics, Mannheim) aufgetropft wurde. Die Proben wurden durch autocrosslinken bei 120 mJ auf der Membran fixiert. Im Anschluss wurde die Membran 1 min in Maleinsäure-Puffer und für 30 min in 1x Blocking-Puffer gewaschen. Nach einer Inkubation mit alkalischer Phosphatase-konjugiertem anti-Digoxigenin-Antikörper (0,75 units/µl, 1:10.000 verdünnt in Blocking-Puffer), folgte ein zweimaliger Waschschrift für jeweils 15 min in Maleinsäure-Puffer. Die Detektion der Signale erfolgte, nach einer Äquilibration der Membran für 2 min in Detektions-Puffer, anhand einer

Chemilumineszenz-Reaktion (5 min, Chemilumineszenz-Substrat CDP-Star<sup>TM</sup>, 1:100 verdünnt in Detektions-Puffer, Roche Diagnostics, Mannheim). Durch Exposition mit einem Röntgenfilm wurde die Reaktion sichtbar gemacht.

### 3.8.2 Northern Blot Hybridisierung

Vor der Hybridisierung wurde die Membran bei 68 °C für 30 min in ExpressHb Lösung (Clontech, Palo Alto, USA) im Hybridisierungssofen prähybridisiert und die spezifische Digoxigenin-markierte Sonde (40 µl) für 5 min bei 98 °C denaturiert. Die Sonde wurde in ExpressHyb Lösung mit der Membran für eine Stunde bei 68 °C hybridisiert. Anschließend wurde die Membran zweimal 30 min in 2 x SSC/0,1 % SDS und zweimal 30 min in 0,1 x SSC/0,1 % SDS gewaschen. Nach dem Waschen der Membran in 1 x Blocking-Puffer für 30 min, wurde die Membran für 45 min bei RT mit alkalischer Phosphatase-konjugiertem anti-Digoxigenin-Antikörper (verdünnt 1:10.000 in Blocking-Puffer) inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper wurde zweimal für 15 min mit Maleinsäure-Puffer gewaschen. Nach einer zweiminütigen Äquilibration der Membran in Detektions-Puffer, wurde diese zum Digoxigenin-Detektionsnachweis 5 min dem Substrat CDP-Star<sup>TM</sup> Substrat versetzt. Anschließend wurde das nicht-radioaktive Chemilumineszenz-Signal durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert.

### 3.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Herstellung einer Gensonde für die Northern Blot Analyse, zum Überprüfen von 5'-RACE-Klonen auf ein Insert sowie zur Identifizierung der vollen-Länge-cDNA von *LUMA* wurden PCR-Amplifikationen durchgeführt. Hierbei wurden mittels Genvorhersage-Programmen identifizierte Exons des Gens *LUMA* überprüft. Desweiteren wurde untersucht, ob die durch 5'-RACE (siehe 3.11) erhaltenen Gensequenzen das vollständige, neue Gen *LUMA* darstellen, oder ob sich im genomischen 5'-Bereich weitere genzugehörige Exons befinden

Die eingesetzte cDNA stammte aus Plazenta, Testis, Lunge, Kolon oder Herz (Clontech, Palo Alto, USA). Die PCR-Reaktionen (50 µl-Ansatz, siehe Tab. 3.3) wurden in einem PCR-Gerät (Mastercycler, Eppendorf, Hamburg) für 2 min bei 95 °C denaturiert. Die anschließende Amplifikation von PCR-Produkten erfolgte für 35 Zyklen. In jedem Zyklus wurde eine Denaturierung für 1 min bei 94 °C, eine Primeranlagerungsphase („*Annealing*“) für 1 min bei 60°C und einer Auffüllreaktionsphase (Elongation) zwischen 1 min und 3 min bei 68 °C

durchlaufen. Die Produkte wurden auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetragen und die Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert.

**Tab. 3.3: PCR-Ansatz**

Reagenz	Volumen/Ansatz
dNTP (20 mM, Clontech, Palo Alto, USA)	2 µl
10 x Advantage 2 PCR Puffer (Clontech, Palo Alto, USA)	5 µl
cDNA (1 µg/µl)	2 µl
Primer forward (10 µM)	3 µl
Primer reverse (10 µM)	3 µl
Advantage 2 Polymerase (Clontech, Palo Alto, USA)	1 µl
PCR-grade H <sub>2</sub> O	34 µl

### 3.10 Präparative Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Isolierung

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde der High Pure PCR Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) eingesetzt. Die gewünschte Gel-Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe von Affinitätssäulen aufgereinigt.

### 3.11 5'-RACE

Mit Hilfe der RACE-Methode (*rapid amplification of cDNA ends*) lässt sich das noch unbekanntes 5'-Ende (5'-RACE) bzw. 3'-Ende (3'-RACE) eines Gens amplifizieren und somit die gesamte cDNA eines unbekanntes Gens klonieren (Bertioli *et al.*, 1997; Frohman *et al.*, 1988; Ohara *et al.*, 1989).

Da das 3'-Ende des Gens *LUMA* bekannt ist, wurde eine 5'-RACE durchgeführt. Hierzu wurde der SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Palo Alto, USA) verwendet. Es wurde 1 µg Plazenta Gesamt-RNA nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Dabei wurde eine Reverse Transkriptase-Reaktion mit einem modifizierten Oligo-(dT)-Primer durchgeführt, der an seinem 3'-Ende zwei degenerierte Basen trägt und sich an die Poly-A-Sequenz am 3'-Ende der mRNA-Moleküle anlagert. Die eingesetzte Reverse Transkriptase besitzt eine terminale Transkriptase-Aktivität, die bei Erreichen des 5'-Endes der mRNA zum Anfügen von 3 bis 5 Desoxycytosinen an den neu gebildeten cDNA-Strang führt. Daran kann sich nun das sogenannte SMART-Oligonukleotid (*switching mechanism at 5'-end of RNA-transcript*) mit seinen 5'-gelegenen Desoxyguanosinen anlagern, das anschließend von der Reversen Transkriptase als verlängertes Template benutzt wird. Die so generierte cDNA wurde direkt in einer PCR-Reaktion eingesetzt, bei der das Zielgen mittels eines genspezifischen



Primers und eines zu der SMART-Sequenz komplementären Primers amplifiziert wurde. Der 5'-RACE PCR-Ansatz wurde mit 34,5 µl H<sub>2</sub>O, 5 µl 10 x Advantage 2 PCR Puffer, 1 µl dNTP Mix (10 mM), 1 µl 50 x Advantage 2 Polymerase Mix, 5 µl 10 x Universal-Primer-Mix A (4 µM: 5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCAACG CAG AGT-3', 2 µM: 5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'), 2,5 µl cDNA und 1 µl eines genspezifischen Primers durchgeführt. Es wurden Ansätze mit verschiedenen genspezifischen Primern durchgeführt („reverse“-Primer L-50 oder L-51). Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel analysiert und aufgrund von erhöhtem Hintergrund und nichtspezifischen Banden in einer Nested-PCR erneut amplifiziert, um die Spezifität der PCR zu erhöhen. Die Nested-PCR wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Es wurden 5 µl des SMART-Nested-Universal-Primer-Mix A (10 µM, 5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3') und ein genspezifischer, „reverse“-Nested-Primer (L-49) verwendet. Alle genspezifischen Primer wurden so ausgewählt, dass sie 23 bis 28 Nukleotide lang sind, einen GC-Gehalt von 50–70 % besitzen und einen Schmelzpunkt größer 70 °C. Die PCR-Bedingungen für die 5'-RACE wie auch für die 5'-RACE Nested-PCR wurden wie folgt gewählt: 94 °C für 30 sec, 68 °C für 30 sec, 72 °C für 3 min; 35 Zyklen. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel aufgetragen. Die über Nested-PCR amplifizierten Produkte wurden aus dem Agarosegel mit einem Skalpell ausgeschnitten, aufgereinigt, kloniert und anschließend sequenziert.

### 3.11.1 Klonierung der 5'-RACE-Produkte und Transformation

Die aufgereinigten Nested-PCR-Produkte wurden nach Angaben des Herstellers in den Vektor pCRL-XL-TOPO kloniert (TOPO<sup>®</sup>XL PCR Cloning Kit, Gibco-BRL/Invitrogen, Karlsruhe). Das Klonierungssystem ermöglicht die Klonierung von bis zu 7 kb langen PCR-Produkten. Anschließend wurden 2 µl jedes Klonierungsansatzes in 50 µl kompetente *E. coli* TOP10 (Gibco-BRL/Invitrogen, Karlsruhe) transformiert. 50 µl jedes Transformationsansatzes wurde auf LB-Platten mit 50 µg/ml Kanamycin ausplattiert.

### 3.11.2 Kolonie-PCR mit 5'-RACE-Klonen

5'-RACE-Klone des Transformationsansatzes wurden direkt in einer Kolonie-PCR auf ein Insert überprüft. Hierbei wurde der PCR-Ansatz und die PCR-Bedingungen wie unter 3.9 beschrieben gewählt. Statt cDNA wurde eine Bakterienkolonie von den Transformationsplatten direkt in einen vorbereiteten PCR-Reaktionsansatz gepickt. Nach der Analyse der PCR-



Produkte auf einem 1 %igen Agarosegel, wurden Bakterienklone, die ein Insert beinhalteten, mit genspezifischen Primern sequenziert.

### 3.12 Sequenzanalysen

Die Sequenzierungen von Plasmid-DNA und von aufgereinigten PCR-Produkten wurde bei der Firma Solvias AG (Basel, Schweiz) durchgeführt.

Die Sequenzen wurden mit Hilfe des BLAST-Programms (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1997) auf Homologien mit bekannten Genen in der GenBank (NCBI, *National Center of Biotechnology Information*) und in HUSAR-Datenbanken (*Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources*) untersucht. Der Vergleich zweier DNA- oder Protein-Sequenzen wurde mit Hilfe des HUSAR-Programms Bestfit (Devereux *et al.*, 1984) durchgeführt. Die Vorhersage von Exons innerhalb von genomischen Sequenzen wurde mit dem Programm Genscan und Xpound aus der HUSAR-Software durchgeführt. Zur Proteinfunktionsanalyse wurden Protein-Analyse-Programme aus der HUSAR-Software eingesetzt. Die Hydrophobizitäts-Analyse wurde mit dem Programm ProtScale (Kyte und Doolittle, 1982) aus ExPASy (*Expert Protein Analysis System*) durchgeführt. Coiled-coil-Domänen wurden nach dem COILS Algorithmus (Berger *et al.*, 1995) dargestellt.

### 3.13 Rekombinante Expression

#### 3.13.1 Long-Range-PCR

Für die Herstellung eines rekombinanten LUMA-Proteins wurde zunächst eine PCR-Reaktion durchgeführt, bei der die Primer L-16 („*forward*“) und L-2 („*reverse*“) ausgewählt wurden. Hierbei wurde das zu diesem Zeitpunkt bekannte Genfragment, das Exon 9 bis Exon 16B einschließt, amplifiziert. Die PCR-Reaktion wurde mit dem Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Verwendet wurde hierbei ein Enzym-Mix, der eine thermostabile Taq-DNA-Polymerase und eine Proofreading-Polymerase enthält. Dieser Polymerase-Mix ermöglicht eine hohe PCR-Produkt-Ausbeute und erlaubt die Amplifikation von bis zu 27 kb großer DNA. Es wurde cDNA von Lungen-Adenokarzinomen eingesetzt, da das Gen in diesen Tumoren exprimiert wird. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: 95 °C für 1 min und anschließend 35 Zyklen bei 95 °C für 30 sec, 60 °C für 1 min und 68 °C für 3 min. Die PCR-Produkte wurden

in einem 1 %igen Agarosegel analysiert und die Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und aufgereinigt.

### 3.13.2 Expressionsklonierung und Transformation

Das über Long-Range-PCR amplifizierte PCR-Produkt wurde in den Vektor pTrcHis2-TOPO (Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. Das Protein wird durch diesen Vektor als Histidin-getaggtetes Fusionsprotein exprimiert. Es wurden 1 µl des aufgereinigten PCR-Produkts mit 1 µl des Vektors pTrcHis2-TOPO und 1 µl H<sub>2</sub>O für 5 min bei RT inkubiert. 2 µl des TOPO-Cloning Ansatzes wurden entnommen und in 50 µl kompetente *E. coli* TOP10 transformiert. Nach einer Inkubation des Transformationsansatzes auf Eis für 30 min erfolgte eine Hitzeschock-Reaktion für 30 sec bei 42 °C. Die Probe wurde sofort für 2 min auf Eis gestellt und im Anschluss mit 250 ml SOC-Medium für eine Stunde bei 37 °C horizontal geschüttelt. 50 µl der transformierten *E. coli* wurden auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.13.3 DNA-Präparation aus Plasmiden

Auf den Kulturplatten gewachsene Klone wurden gepickt und über Nacht in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Die Plasmid-DNA aus den Klonen wurde mittels des Jetquick Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse isoliert (Maniatis *et al.*, 1982).

### 3.13.4 Restriktionsanalyse

Mittels eines Restriktionsverdau wurde die Klonierung des Inserts in den pTrcHis2-TOPO-Vektor überprüft. Hierzu wurde folgende Reaktion angesetzt und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert: 5 µl Plasmid-DNA aus LUMA-Expressionsklonen, 1 µl des Enzyms *Nco*I (10.000 units/ml), 2 µl 10 x NEB Puffer 4 (Biolabs, Beverly, USA), 0,2 µl BSA, 11,2 µl H<sub>2</sub>O. Die Produkte des Restriktionsverdau wurden auf einem Agarosegel analysiert. Klone, die im Agarosegel das erwartete Bandenmuster zeigten, wurden sequenziert, um die vollständige Sequenz und die richtige Orientierung des Inserts zu überprüfen. Hierfür wurde die Plasmid-DNA mit den vektorspezifischen Primern pTrcHis2-TOPO-„forward“ und pTrcHis2TOPO-„reverse“ sequenziert.

### 3.13.5 Expression von rekombinantem Protein

25 ml LB-Ampicillin-Medium wurden mit einem Expressionsklon angeimpft und über Nacht in einem Schüttler bei 225 rpm und 37 °C inkubiert. Nach einer 1:20 Verdünnung der Bakterienkultur mit LB-Ampicillin-Medium (Endvolumen 500 ml) wurde die Kultur erneut für etwa eine Stunde bei 225 rpm und 37 °C inkubiert, bis eine OD von 0,5-0,6 erreicht wurde. Durch die Zugabe von IPTG (Enkonzentration 1 mM) wurde anschließend die Expression des rekombinanten Proteins induziert (4 h, 37 °C, 225 rpm). Als Negativkontrolle wurden 5 ml der nicht-induzierten Kultur abgenommen. Die nicht-induzierte und die induzierte Kultur wurde für 10 min bei 3.200 x g abzentrifugiert. Die Pellets wurden über Nacht bei -80 °C gelagert. Um zu überprüfen, ob die Induktion der Proteinexpression erfolgreich war, wurden die Pellets (nicht-induziert und induziert) wie unter 3.17 beschrieben aufgearbeitet und die Proteinexpression in einem Coomassie-gefärbten Gel und im Western Blot überprüft.

### 3.13.6 Aufreinigung von rekombinantem Protein aus der unlöslichen Proteinfraction mittels HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Um eine Protein-Fraktion zu erhalten, welche ausschließlich das rekombinante Protein enthält und keine weiteren *E.coli*-Proteine, wurde eine Aufreinigung mittels HPLC durchgeführt.

Ein 250 ml Pellet eines induzierten Expressionklons (siehe 3.13.5) wurde zur Aufreinigung mit 20 ml B-PER (PIERCE, Rockford, IL) resuspendiert und für eine Stunde bei RT und 225 rpm im Schüttler inkubiert. Durch Zentrifugation der Probe bei 20.000 x g für 20 min bei 15 °C wurde die lösliche Proteinfraction von der unlöslichen Proteinfraction („*inclusion bodies*“) getrennt. Zur Aufreinigung der unlöslichen Proteinfraction wurde das Pellet in 20 ml B-PER resuspendiert. Durch Zugabe von Lysozym in einer finalen Konzentration von 200 µg/ml erfolgte eine Lyse der „*inclusion bodies*“ (15 min, RT, schütteln). Die Probe wurde mit 80 ml einer 1:10 in 1 x PBS verdünnten B-PER Lösung versetzt und für 20 min bei 20.000 x g abzentrifugiert. Der Vorgang der Zugabe von verdünntem B-PER und der Zentrifugationsschritt wurden noch zwei weitere Male wiederholt. Nach dem Abwiegen des erhaltenen Pellets folgte eine Zugabe von 8 ml Solubilisierungs-Puffer pro Gramm Protein-Pellet. Der Ansatz wurde 15 min durch auf- und abpipettieren und weitere 45 min auf einem Schüttler bei RT und 225 rpm gemischt. Nach einer Zentrifugation für 20 min bei 15 °C und 20.000 x g erhielt man den Überstand, in dem sich die nun gelöste „*inclusion bodies*“-Proteinfraction befindet. Der Überstand wurde über ein 0,22 µm Vakuum-Filtriersystem filtriert. Das Expressionsprotein konnte anschließend mittels einer Chromatographie über die

HPLC-Anlage (Biologic HR Chromatographie-System, Bio Rad, München) weiter aufgereinigt werden.

Zur HPLC-Aufreinigung wurde eine Nickel-beladene Sepharose-Chromatographie-Säule (HiTrap Chelating HP Column, Amersham, Braunschweig) verwendet, wodurch das Histidin-gekoppelte, rekombinante Protein aus der filtrierten „*inclusion bodies*“-Fraktion aufgereinigt werden kann. Die Säule wurde zuerst für die Nullpunktbestimmung mit 20 mM Imidazol (2,5 ml/min, 15 ml) äquibriert, anschließend erfolgte die Äquibrierung der Säule für die Probenaufnahme mit 8 M Harnstoff/250 mM NaCl (2,5 ml/min, 35 ml). Nachfolgend wurde die Protein-Probe mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min über die Nickel-Säule gepumpt. Das Programm spülte mit Solubilisierungs-Puffer (1 ml/min, 25 ml) und führte dann einen linearen Gradient durch, indem der Solubilisierungs-Puffer langsam durch Imidazol ersetzt wurde (0 bis 100 % 20 mM Imidazol bzw. 100 bis 0 % Solubilisierungs-Puffer, 1 ml/min, Gesamtvolumen 30 ml). Nach einem Waschschrift (20 mM Imidazol, 2,5 ml/min, 25 ml), wurde das gebundene rekombinante Protein mittels eines linearen Gradienten (0 bis 100 % 250 mM Imidazol bzw. 100 bis 0 % 20 mM Imidazol, 1 ml/min, 30 ml) eluiert. Die eluierten Fraktionen der Chromatographie wurden vereinigt und über Nacht in einer Dialysekassette (PIERCE, Rockford, IL) bei 4 °C unter Rühren gegen PBS dialysiert. Die dialysierte Probe wurde im Photometer bei 280 nm gegen PBS quantifiziert. Die Qualität der Aufreinigung wurde mittels Coomassie-Färbung und Western Blot überprüft.

### **3.14 Herstellung monoklonaler Antikörper**

#### **3.14.1 Immunisierung**

Spezifische, monoklonale Antikörper werden durch Immunisierung von Mäusen mit dem jeweiligen Antigen gewonnen.

Mäuse wurden mit dem Peptid RFLKTNLKGSKITRC (Peptid 2, spezifisch für die Protein-Isoform LUMA-15A), das von der Firma Peptide Speciality Laboratories (Heidelberg) synthetisiert und an KLH gekoppelt wurde, immunisiert. Das Peptid wurde anhand der Antigenizitätsfaktoren mittels des Programms DNASTAR (Madison, USA) ermittelt und in einer Konzentration von 40 µg pro Injektion eingesetzt. Nach der ersten Immunisierung wurden die Mäuse nach 21, 42, 56 und 70 Tagen insgesamt vier weitere Male immunisiert, um eine spezifische Antikörper-Produktion zu entwickeln. Vor der Immunisierung wurde Blut (Präimmenserum) entnommen und nach 49 Tagen, um die Immunreaktion im Peptid-ELISA und Western Blot zu überprüfen.

### 3.14.2 Fusion von murinen Milzzellen mit Myelomzellen zu Hybridomen

Durch die Fusion von murinen Milzzellen (B-Lymphozyten), die einen gewünschten Antikörper produzieren, mit Myelomzellen, die immortal sind, entstehen fusionierte Hybridome, die beide Eigenschaften vereinen. Somit können hochspezifische Antikörper in beliebigen Mengen in der Zellkultur generiert werden.

Die Mäuse wurden durch Überstrecken getötet. Alle folgenden Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank und mit sterilem Arbeitsmaterial durchgeführt. Nach Freipräparieren der Milz wurde diese in ein 50 ml Falcon mit 15 ml vorgewärmtem, serumfreiem RPMI-Medium überführt und anschließend in einer Petrischale mit einem Spitzenstempel vorsichtig durch ein Zellsieb gerieben. Dreimal wurde das Zellsieb mit 3 ml serumfreiem RPMI-Medium gespült. Eine zerkleinerte Milz ergibt ca.  $1 - 1,5 \times 10^8$  Zellen. Die Milzzellen wurden mit Myelomzellen der Zelllinie X63Ag8.653 in einem Verhältnis Milzzellen/Myelomzellen 3:1 in einem 50 ml Falcon gemischt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit serumfreiem RPMI-Medium und einer Zentrifugation für 5 min bei 1.600 rpm, wurde der Überstand abgenommen. Zur Fusion von Milzzellen mit Myelomzellen wurde zu dem erhaltenen Zellpellet über 5 min tropfenweise 1 ml, auf 37 °C vorgewärmtes PEG unter langsamen Schütteln zugegeben, welches zur Fusion von Zellmembranen führt. Um das PEG langsam zu verdünnen wurde über 5 min 20 ml vorgewärmtes, serumfreies RPMI-Medium zugetropft und anschließend das 50 ml Falcon mit weiterem Medium aufgefüllt. Nach Abzentrifugieren der Zellen für 5 min bei 1.600 rpm wurde das Zellpellet in 250 ml HAT-Selektionsmedium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche überführt und eine Stunde im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Mit einer Multikanalpipette wurde die Zellen auf 13 96-Well Flachbodenplatten ausplattiert. Die Inkubation der Platten im Brutschrank erfolgte 1-2 Wochen, wobei das klonale Wachstum beobachtet wurde. Bei ausreichender Zelldichte wurden die Hybridom-Zellüberstände der entsprechenden Wells abgenommen und mittels Peptid-ELISA auf spezifische Antikörperproduktion gescreent (1. Screening). Die positiv getesteten Hybridome wurden in 24- oder 6-Well Platten überführt und weiter kultiviert. Nach 1-2 Wochen wurden die Zellüberstände erneut im Peptid-ELISA getestet (2. Screening). Hierdurch wurde überprüft, ob die Hybridome stabil sind, d.h. eine weitere Antikörper-Produktion erfolgte.

### 3.14.3 Reklonierung von Hybridomen

Da nach einer Fusion in einem Well der 96-Well-Platten möglicherweise mehrere Klone mit unterschiedlicher Spezifität wachsen, besteht die Möglichkeit, dass spezifische Hybridome von unspezifischen oder nicht-Antikörper-produzierenden Hybridomen überwachsen werden. Um

dies zu verhindern müssen die Zellen der Wells, die im Peptid-ELISA positiv auf Antikörper-Produktion getestet wurden, rekloniert werden. Die Zellen wurden so verdünnt werden, dass in einem 96-Well nicht mehr als eine Ausgangszelle ausgesät wurde. Ziel ist es einen Klon zu erhalten, der die gewünschten, spezifischen, monoklonalen Antikörper produziert.

Für die Reklonierung wurden die Hybridomzellen, die im 1. und 2. Peptid-ELISA-Screening positiv getestet wurden, mit der Pipette aus dem Well der Zellkulturplatte gelöst und 1:1 mit Trypanblau versetzt, um die Zellzahl zu bestimmen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Anhand der errechneten Zellzahl wurden die Zellen so mit Medium verdünnt, dass auf zwei 96-Well Platten statistisch 0,5 Zellen pro Well ausplattiert wurden. Nach Inkubation der Platten im Brutschrank konnten die Wells mit Zellwachstum erneut im Peptid-ELISA-Screening (3. Screening) auf ihre Spezifität überprüft werden. Hierbei wurden nur solche Wells getestet, die nach Überprüfen im Mikroskop (3 Tage nach dem Ausplattieren) einen Klon pro Well enthielten, um von einer klonalen Population ausgehen zu können. Reklonierte Hybridome wurden anschließend von 96- auf 24-Well-Platten und später auf Flaschen expandiert. Zudem wurden Sicherheitskulturen in Einfiermedium bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  angelegt.

#### 3.14.4 Kultivierung von Hybridomen

Hybridomkulturen wurden in HAT-Selektionsmedium kultiviert, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält. Die DNA-Synthese erfordert die Synthese von Nukleotiden (ATP, GTP, CTP, TTP), die entweder über den „*De Novo pathway*“ (Neusynthese von Nukleotiden) oder den „*Salvage pathway*“ (Nukleotidsynthese über den Umbau von Vorstufen) erfolgen kann. Aminopterin blockiert im „*De Novo Pathway*“ die Synthese von GTP und TTP, Thymidin ermöglicht die TTP-Synthese. B-Lymphozyten können im Gegensatz zu Myelomzellen über das Enzym HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase), das für den „*Salvage pathway*“ der DNA-Synthese benötigt wird, GTP synthetisieren. Als Folge hiervon können nur fusionierte Zellen in HAT-Medium überleben, da die Zellen zum Wachstum sowohl die Eigenschaft der GTP-Synthese (B-Lymphozyten-vermittelt) als auch unbegrenzte Teilungsfähigkeit (Myelomzellen-vermittelt) benötigen.

Für diese Selektion wurden die Zellen die ersten 2 bis 3 Wochen in HAT-Medium kultiviert, so dass nicht fusionierte Myelomzellen oder Milzzellen absterben. Nach diesem Zeitraum ist der Selektionsvorgang abgeschlossen und die gewachsenen Hybridomkulturen sind stabil, so dass ein Wechsel von HAT-Selektionsmedium auf HT-Medium (enthält Hypoxanthin, Thymidin)

erfolgte. Die etablierten Kulturen benötigten zum Wachstum keine Zugabe von Aminopterin mehr, da bereits zur Verfügung stehende Vorstufen zur Nukleotid-Synthese verwendet werden. Die Mediumumstellung erfolgte schrittweise in 25 %- Schritten jeweils beim Umsetzen der Zellen.

### 3.14.5 Isotypisierung von monoklonalen Antikörpern

Nach der Bestätigung von im Peptid-ELISA (1. und 2. Screening) positiv getesteten Hybridomen, wurden die Hybridom-Zellüberstände auf den produzierenden Antikörper-Isotyp getestet. Hierzu wurde der Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieser detektiert sowohl die verschiedenen Antikörperklassen IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 als auch die leichten Ketten  $\lambda$  oder  $\kappa$ .

### 3.14.6 Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern aus Hybridom-Überständen

100 ml Hybridom-Zellkulturüberstand wurden für 10 min bei 2.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500  $\mu$ l Protein G Plus/Protein A-Agarose mit 0,1 % Azid (Oncogene, Boston, USA) versetzt und bei 4 °C über Nacht im Über-Kopf-Schüttler inkubiert, um die monoklonalen Antikörper an die Agarose zu binden. Die Agarose wurde in eine Chromatographie-Säule (Poly-Prep Chromatography Column, Bio Rad, München) überführt und 4 mal mit 10 ml 1 x PBS gewaschen. Die Elution der Antikörper erfolgte mit 1080  $\mu$ l 50 mM Glycin pH 3 (in ddH<sub>2</sub>O). Das Eluat wurde in einem 2 ml-Reaktionsgefäß, indem 120  $\mu$ l 500 mM Phosphat-Puffer pH 8,0 zur Neutralisation vorgelegt wurde, aufgefangen. Die Endkonzentration betrug 50 mM Phosphatpuffer. Das Eluat wurde in eine Dialysekassette gegeben und in 1 x PBS bei 4 °C für eine Stunde dialysiert. Dreimal wurde das PBS nach jeweils einer Stunde gewechselt. Die dialysierte Antikörper-Lösung wurde mit einer Spritze aus dem Dialyserahmen entnommen und die Antikörper-Konzentration im Photometer bei 280 nm vermessen. 100  $\mu$ l der Antikörper Lösung wurden gegen PBS vermessen. Die Antikörperkonzentration wurde folgendermaßen berechnet:

$$\frac{1,3 \text{ OD}}{1 \text{ mg/ml}} = \frac{\text{gemessene OD}}{\text{Antikörperkonzentration mg/ml}}$$



Zur Lagerung der Antikörper bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde steriles BSA mit einer finalen Konzentration von 0,2 % und Natrium-Azid mit einer finalen Konzentration von 0,01 % zugegeben. Aufgereinigte Antikörper wurden im Peptid-ELISA und Western Blot auf Spezifität überprüft.

### **3.15 Herstellung polyklonaler Antikörper**

#### **3.15.1 Immunisierung**

Spezifische, polyklonale Antikörper werden durch Immunisierung von Kaninchen mit dem jeweiligen Antigen gewonnen.

Zur Immunisierung wurden die Peptide RFLKTNLKGSKITRC (Peptid 2, spezifisch für die Protein-Isoform LUMA-10) und CELIGEV RTEGIDNMKDLKK (Peptid 1, spezifisch für die Protein-Isoform LUMA-15A) ausgewählt. Die Immunisierung wurde wie unter 3.14.1 beschrieben durchgeführt. Pro Injektion wurden 200  $\mu\text{g}$  Peptid eingesetzt.

#### **3.15.2 Aufreinigung von Antikörpern aus polyklonalen Seren mittels Affinitätschromatographie über Peptid-Sepharose**

##### **3.15.2.1 Kopplung von Peptid an eine Affinitätsmatrix**

Es wurden sowohl für Peptid 1 als auch für Peptid 2 spezifische Peptid-Sepharose-Säulen zur Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern aus Kaninchenseren hergestellt. Für die Koppelung von 10 mg Peptid wurde 1,5 ml EAH-Sepharose 4B (Amersham, Braunschweig) über eine Filternutsche mit 100 ml Puffer I gewaschen und entsprechend der Aminogruppen des Peptids die äquimolare Menge an Sulfo-SMCC (0,6 mg in 5 ml Puffer I) zugegeben. 10 mg des zu koppelnden Peptids wurden in 100 ml Puffer II gelöst, zu der aktivierten EAH-Sepharose gegeben, und für eine Stunde bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 750 rpm geschüttelt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Ansatz bei 4.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Ein 5  $\mu\text{l}$  Aliquot des Überstandes wurde verwendet, um mit Hilfe des Ellmanns-Tests die Kopplungseffizienz zu überprüfen. Hierzu wurde das Aliquot mit 490  $\mu\text{l}$  Puffer I und 5  $\mu\text{l}$  Ellmanns Reagenz für 20 min inkubiert und im ELISA-Messgerät die OD der Peptidlösung bei 405 nm (620 nm Referenzwellenlänge) vermessen. Als Referenz wurde ein Ansatz ohne Peptidlösung (5  $\mu\text{l}$  Ellmanns Reagenz, 495  $\mu\text{l}$  Puffer I) vermessen. Die Kopplungseffizienz wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{OD 405 (Peptidlösung)} - \text{OD 405 (Referenz)}}{13.600} \times 100 \times \text{Molekulargewicht des Peptids} = \text{mg Peptid/ml}$$

13.600 (Extinktionskoeffizient DTNB)



Die angestrebte Kopplungseffizienz beträgt 60-90 % der eingesetzten Peptidmenge. Im Anschluss wurde zur EAH-Sepharose mit dem gekoppelten Peptid eine 500 mM Mercaptoethylamin-Lösung (Endkonzentration 10 mM) zugegeben und dadurch für 20 min das noch reaktive Sulfo-SMCC blockiert. Die EAH-Sepharose mit dem gekoppelten Peptid wurde in eine Chromatographie-Säule überführt, mit 100 ml 1 x PBS/0,1 % Natrium-Azid gespült und bei 4 °C gelagert.

### **3.15.2.2 Voraufreinigung der finalen Seren**

Durch die Vorreinigung des Kaninchenserums werden alle IgG-Antikörper isoliert. In einem zweiten Aufreinigungsschritt werden die Peptid-spezifischen Antikörper eluiert. 15 ml Kaninchenserum wurden 5 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert und die Voraufreinigung wie unter 3.14.6 (Aufreinigung monoklonaler Antikörper) beschrieben durchgeführt.

### **3.15.2.3 Aufreinigung der Peptid-spezifischen polyklonalen Antikörper**

Die aus 15 ml Kaninchenserum eluierten und dialysierten Antikörper (siehe 3.14.6) wurden über Nacht bei 4 °C mit der spezifischen, hergestellten Peptid-Sepharose-Säule (siehe 3.15.2.1) im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Die weitere Aufreinigung und Lagerung der Antikörper erfolgte wie unter 3.14.6 beschrieben. Aufgereinigte Antikörper wurden im Peptid-ELISA und Western Blot auf Spezifität überprüft.

## **3.16 Peptid-ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)**

### **3.16.1 Beschichten der ELISA-Platten**

Die synthetisierten Peptide (Peptid 1, Peptid 2) wurden auf eine Konzentration von 5 µg/ml mit 1 x PBS eingestellt. 50 µl der Peptidlösung wurden pro Well auf 96-Well Platten (Maxisorp Surface, Nalge Nunc International, New York, USA) pipettiert und über Nacht bei 4 °C auf die Platten übertragen. Als Negativkontrolle wurden Platten mit einem unspezifischen Peptid (Dipeptidase: ASRRNYPDDYLRL) beschichtet. Nach fünfmaligem Waschen der Platten mit Wasch-Puffer wurden die Platten für eine Stunde bei RT unter Schütteln mit ELISA-Blocking-Puffer blockiert. Die Platten wurden nach dem Abkippen des Blocking-Puffers sofort im ELISA eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden.

### 3.16.2 Durchführung des Peptid-ELISA

Auf mit Peptid beschichtete ELISA-Platten wurden 50 µl Primärantikörper pipettiert und für eine Stunde bei RT unter Schütteln inkubiert. Hierbei binden spezifische Antikörper an das auf den Platten immobilisierte Peptid. Je nach Experiment wurden verschiedene Primärantikörper eingesetzt (siehe Tab. 3.4). Nach dem Waschen erfolgte die Zugabe von 50 µl Sekundärantikörper pro Well. Für die Analyse von monoklonalen Primärantikörpern wurde ein HRP-konjugierter Kaninchen-anti-Maus-Sekundärantikörper (1:5.000 in 1x PBS), für die Analyse von polyklonalen Antikörpern ein HRP-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (1:20.000 in 1 x PBS) eingesetzt. Zur Detektion wurde 100 µl TMB (PIERCE, Rockford, IL) pro Well eingesetzt, das bei einer spezifischen Antikörperreaktion eine Blaufärbung zeigt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte nach 10 min mit 20 µl 1 M HCL pro Well. Im ELISA-Messgerät konnte die Reaktion bei einer Wellenlänge von 450 nm (620 nm Referenzwellenlänge) quantifiziert werden.

**Tab. 3.4: Im Peptid-ELISA eingesetzte Primärantikörper und Konzentrationen**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Konzentration</b>
Maus-Serum, Kaninchen-Serum	1:1.000 in PBS
Hybridom-Zellüberstände	unbekannt
Aufgereinigte monoklonale und polyklonale LUMA-Antikörper	5-10 µg /ml in PBS

### 3.17 Aufarbeitung von Proteinen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Protein-Pellets wurden in 2 x Lämmli-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C und 800 rpm auf dem Heizschüttler inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm wurden die Proben auf Eis oder bei -20 °C gelagert.

### 3.18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die SDS-PAGE lassen sich Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht in einer Gelmatrix auftrennen. Die Beladung bzw. Anlagerung der Proteine mit SDS bewirkt dabei eine Zerstörung der Tertiär- und Quartärstrukturen sowie die Neutralisation von Ladungsunterschieden (Laemmli, 1970). Die Proteine werden durch eine Coomassie-Färbung des Gels detektiert oder in einer immunbiochemischen Untersuchung elektrophoretisch auf

eine Trägermembran übertragen (Western Blot) und durch eine Antikörper-abhängige Reaktion auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

15-20 µl der Proteinlysate wurden auf einem Gradientengel (Criterion Precast Gel, 4-20 % Tris-HCL, Bio Rad, München) aufgetragen. Als Marker für eine Coomassie-Färbung wurde der Bench Mark<sup>TM</sup> Protein Ladder (Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe), als Marker für eine Western Blot Analyse der Prestained Bench Mark<sup>TM</sup> Protein Ladder (Gibco BRL/Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für ca. eine Stunde bei 200 Volt.

### 3.18.1 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie Brilliant Blue

Mittels Coomassie-Färbung wurde das rekombinante LUMA-Protein auf Reinheit überprüft. Das SDS-Gel wurde für 30 min im Schüttler in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend solange mit Entfärbelösung entfärbt, bis nur noch die Proteinbanden ohne Hintergrund zu sehen waren.

### 3.19 Western Blot

Das SDS-Gel wurde für 30 min zur Äquilibrierung in Transfer-Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Proteine im Gel mittels einer Kombination aus Puffer- und Stromtransfer („*Tank-Blotting*“) auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, Amersham, Braunschweig) übertragen. Die Blotting-Apparatur (Bio-Rad, München) wurde mit Transfer-Puffer gefüllt und die Transferbox mit Criterion-Gel und aufliegender Nitrozellulose-Membran, beides zwischen 2 Lagen Whatmanpapier, in die Kammer eingesetzt. Das „*Tank-Blotting*“-Verfahren fand für 15 min bei 100 Volt konstant und nachfolgend für 45 min bei 50 Volt konstant statt. Hierbei wurde die Blotting-Apparatur auf Eis inkubiert. Nach dem Transfer wurde die Membran zweimal für 5 min in 1 x PBS gewaschen und anschließend über Nacht in Blocking-Puffer bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Der Primärantikörper wurde in Blocking-Puffer verdünnt (Tab. 3.5) und für eine Stunde mit der Membran bei RT inkubiert. Als Kontrolle des System wurde bei jeder Western Blot Analyse eine Membran mit einem murinen, monoklonalen HRP-gekoppelten anti-Histidin-Tag-Primärantikörper mitgeführt, welcher rekombinante Histidin-getaggte Fusionsproteine nachweist. Durch einen sechsmaligen Waschschrift für 10 min unter Schütteln wurde unspezifisch gebundener Primärantikörper entfernt. Die Membranen wurden anschließend für eine Stunde mit Sekundärantikörper inkubiert. Für die Analyse von monoklonalen Antikörpern wurde ein HRP-gekoppelter Kaninchen-anti-Maus-Sekundärantikörper (1:5.000 in Blocking-

Puffer), für die Analyse von polyklonalen Antikörpern ein HRP-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (1:20.000 in Blocking-Puffer) verwendet. Um überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen, wurden die Membranen für 6 mal 10 min mit Wasch-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte als Nachweis eine Chemilumineszenz-Reaktion (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, PIERCE, Rockford, IL). Die Antikörper-Protein-Reaktion wurde auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

**Tab. 3.5: Im Peptid-ELISA eingesetzte Primärantikörper und Konzentrationen**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Konzentration</b>
Maus-Serum, Kaninchen-Serum	1:100 bis 1:1.000 in Blocking-Puffer
Aufgereinigte monoklonale und polyklonale LUMA-Antikörper	5-10 µg/ml in Blocking-Puffer
anti-His-Tag	1:500 in Blocking Puffer

### 3.20 Immunhistochemie und Immunzytochemie

#### 3.20.1 Herstellung von zytologischen Dünnschichtpräparaten

Zell-Pellets von Zelllinien (ca.  $10^7$  Zellen) wurden in 20 ml Preserve Cyte-Lösung (CYTYC, Boxborough, USA) resuspendiert. Von den Zellen in Lösung wurden mit Hilfe des ThinPrep2000- Prozessors (CYTYC, Boxborough, USA) zytologische Dünnschichtpräparate angefertigt. Hierbei werden durch das Rotieren eines Filters Zellen homogen in Lösung gebracht und auf einen Objektträger (CYTYC, Boxborough, USA) aufgebracht. Das Gerät wurde nach den Angaben des Herstellers bedient. Der Objektträger mit den Zellen wurde sofort mit Merckofix-Spray (Merck, Darmstadt) fixiert und für mindestens 10 min luftgetrocknet.

#### 3.20.2 Herstellung von zytologischen Ausstrichen

Zur Etablierung der immunzytochemischen Färbung von Bronchialsekreten wurden Zell-Pellets von Zelllinien (ca.  $10^7$  Zellen) in 20 ml Saccomanno-Lösung resuspendiert. 100 µl der Zellsuspension wurden auf Objektträgern (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) ausgestrichen und sofort mit Merckofix-Spray (Merck, Darmstadt) fixiert. Bronchialsekrete wurden ebenso behandelt.

### 3.20.3 Herstellung von Paraffinschnitten

Mit einem Mikrotom (LEICA RM2155) wurden 4 µm dicke Schnitte von in Paraffin-eingebettetem Gewebe angefertigt, in 42 °C warmes Aqua dest. überführt und auf Objektträger (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen. Die Trocknung der Schnitte erfolgte über Nacht bei RT.

### 3.20.4 Vorbehandlung von histologischen und zytologischen Präparaten

Von den post-fixierten zytologischen Präparaten musste in einer Vorbehandlung der Polyethylen-Glykol Film, der durch die Spray-Fixierung entsteht, entfernt werden, um die Bindung eines spezifischen Antikörpers an ein spezifisches Antigen in den Zellen zu erreichen. Hierzu wurden die Objektträger für 10 min in 50 %igem Ethanol inkubiert und anschließend für 5 min in Aqua dest. rehydriert.

Formalin-fixierte und in Paraffin-eingebettete Gewebeschnitte müssen vor einer immunenzymatischen Färbung deparaffinisiert und rehydriert werden, um die Bindung eines spezifischen Antikörpers an ein spezifisches Antigen im Gewebe zu gewährleisten. Dazu wurden die Objektträger mit histologischen Schnitten für 20 min im Trockenschrank bei 60 °C inkubiert. Die Schnitte wurden für 20 min bei RT abgekühlt. Nach einer Deparaffinisierung der Schnitte in Xylol für 2 mal 5 min, wurden diese mittels einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Folgende Inkubationsschritte wurden durchgeführt: 2 mal 3 min in 96 % Ethanol, 2 mal 3 min in 70 % Ethanol, 6 min in H<sub>2</sub>O<sub>Bidest</sub>.

### 3.20.5 Immunhistochemische und immunzytochemische Färbung

Die vorbehandelten zytologischen oder histologischen Präparate wurden vor der Färbung zuerst einem Antigendemaskierungsverfahren unterzogen. Diese Hitze-Vorbehandlung führt bei zytologischen Präparaten zur Permeabilisierung der Zellmembran. Bei histologischen Präparaten wird ein Aufschluss von durch die Formalinfixierung entstandenen Quervernetzungen von Proteinen erreicht, welche die Antikörperbindung an ein Protein inhibieren.

Das Antigendemaskierungsverfahren wurde in einem Wasserbad bei 97 °C für 40 min durchgeführt. Hierbei wurden die Präparate in Target-Retrieval-Lösung inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger in der Lösung für 20 min abgekühlt und für 5 min in Wasch-Puffer inkubiert. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität wurden die Objektträger in eine Färbekammer gelegt und für 8 min mit 250 µl Peroxidase-Blockierungs-

Lösung (3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark) bedeckt. Nach einem zweimaligen Waschschrift für jeweils 5 min mit Wasch-Puffer, wurden auf jeden Objektträger 250 µl Ziegen-Normal-Serum (50 µg/ml, DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark) gegeben, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Lösung wurde nach 20 min abgekippt und die Präparate mit dem entsprechenden monoklonalen oder polyklonalen Primärantikörper für eine Stunde inkubiert (verwendete Antikörper-Konzentrationen siehe Tab. 3.6). Die Antikörper wurden mit Antikörperverdünnungs-Reagenz (Chem<sup>TM</sup> Mate Antibody Diluent, DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark) auf die jeweilige Konzentration eingestellt. Anschließend wurden die Präparate für 5 min in Wasch-Puffer inkubiert und anschließend für 30 min mit 2 Tropfen des Sekundärantikörper-Systems EnVision (Ziege anti-Maus/Kaninchen-Ig, HRP-konjugiert) bedeckt, wodurch der gebundene Primärantikörper detektiert wird. EnVision besteht aus einem Dextranpolymer, an das sowohl ein anti-Maus-Antikörper als auch ein anti-Kaninchen-Antikörper und zudem das Enzym Meerrettich-Peroxidase konjugiert sind. Nach diesem Detektionsschritt erfolgte ein dreimaliger Waschschrift für jeweils 5 min. Im Anschluss wurden die Objektträger für 10 min mit 250 µl des Substrat Chromogen DAB (Diaminobenzidin) (Liquid DAB+ Substrate-Chromogen Solution, DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark) inkubiert. Durch die gebundene Meerrettich-Peroxidase wird mit Hilfe des Chromogens DAB ein lösliches Substrat umgesetzt, das als ein brauner Niederschlag die Bindung des spezifischen Antikörpers nachweist. Die Präparate wurden mit Aqua dest. gespült und für 2 min in ein Hämatoxylin-Bad zur Gegenfärbung gegeben. Anschließend wurden die Objektträger mit deionisiertem Wasser gespült und zur Haltbarmachung mit Eukitt eingebettet. Als Spezifitätskontrolle wurden die Antikörper mit einem 13-molaren Überschuss an Peptid für 1 h vorinkubiert (Peptid-Kompetition), was zu einer vollständigen Reduktion der Signale führen soll. Desweiteren wurde bei jedem Ansatz eine Färbung nur mit Sekundärantikörper, aber ohne Primärantikörper, durchgeführt.

**Tab. 3.6: Optimierte Antikörper-Konzentrationen für immunhistochemische und -zytochemischen Färbungen**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Konzentration in immunhistochemischen Färbungen</b>	<b>Konzentration in immunzytochemischen Färbungen</b>
anti-LUMA-10, polyklonal	3 µg/ml	2 µg/ml
anti-LUMA-15A, polyklonal	5 µg/ml	3 µg/ml

### 3.20.6 Immunzytochemische Doppelfärbung

Zytologische Präparate wurden, nach der unter 3.20.4 beschriebenen Vorbehandlung, zunächst für 40 min einer Hitzevorbehandlung in Target-Retrieval-Lösung bei 97 °C im Wasserbad unterzogen. Im Anschluss wurden die Objektträger in der Lösung für 20 min abgekühlt und für 5 min in Wasch-Puffer inkubiert. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität wurden die Objektträger in eine Färbekammer gelegt und für 8 min mit 250 µl Peroxidase-Blockierungs-Lösung bedeckt. Nach einem zweimaligen Waschschrift für jeweils 5 min mit Wasch-Puffer, erfolgte die Inkubation der Objektträger mit 250 µl Ziegen-Serum (50 µg/ml, DAKO Cytomation, Dänemark), um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach dem Abkippen der Lösung wurden die Präparate für 60 min mit einem Mix aus zwei Primärantikörpern inkubiert. Der polyklonale anti-LUMA-15A-Antikörper wurde mit anti-Ki67-FITC-Antikörper oder mit anti-DNase X-Antikörper kombiniert. Die zytologischen Präparate wurden einmal für 5 min in Wasch-Puffer gewaschen und für 30 min mit 2 Tropfen des Sekundärantikörper-System EnVision (Ziege-anti-Kaninchen-Ig, HRP-konjugiert) bedeckt. Dieser Sekundärantikörper detektiert spezifisch den polyklonalen LUMA-15A Antikörper, welcher aus dem Kaninchen stammt. Nach einem dreimaligen Waschschrift erfolgte die Detektion der Immunreaktion mit DAB-Chromogen (250 µl/Objektträger). Im Anschluss wurden die Objektträger mit Aqua dest. gespült und erneut für 5 min in Wasch-Puffer inkubiert. Die Doppelfärbung wurde mit Hilfe eines weiteren Sekundärantikörpers, der spezifisch den zweiten eingesetzten Primärantikörper nachweist, fortgeführt. Hierbei wurde der AP-konjugierte Kaninchen-anti-FITC-Sekundärantikörper (1:120 verdünnt in Chem<sup>TM</sup> Mate Antibody Diluent) für den Nachweis von Ki67, oder der AP-konjugierte Ziege-anti-Ratte-Sekundärantikörper (3 µg/ml verdünnt in Chem<sup>TM</sup> Mate Antibody Diluent) für den Nachweis von DNase X eingesetzt. Nach 30 Minuten wurden die Präparate in Wasch-Puffer überführt und 2 mal 5 min gewaschen, um unspezifisch gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Der Farbnachweis erfolgte für 20 min mit dem Chromogen Fast Red, das die an den Sekundärantikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase nachweist. Hierbei kommt es zu einer roten Farbreaktion. Die Präparate wurden mit Aqua dest. gespült und für 2 min in einem Hämatoxylin-Bad zur Gegenfärbung gegeben. Anschließend wurden die Objektträger mit deionisiertem Wasser gespült und zur Haltbarmachung mit Eukitt eingebettet.



**Tab. 3.7: Optimierte Antikörper-Konzentrationen für immunzytochemische Doppelfärbungen**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Konzentration</b>
anti-LUMA-15A, polyklonal	5 µg/ml
anti-Ki67-FITC (clone MIB-1)	0,2 µg/ml
anti-DNase x	20 µg/ml

### **3.20.7 Haltbarmachen von histologischen und zytologischen Präparaten**

Das Haltbarmachen der histologischen und zytologischen Präparate erfolgte durch das Einbetten der Objektträger mit Eukitt. Zuvor musste den Präparaten in einer aufsteigenden Alkoholreihe das durch die Rehydrierung zugeführte Wasser wieder entzogen werden. Folgende Inkubationsschritte wurden durchgeführt: 2 mal 3 min in 70 % Ethanol, 2 mal 3 min in 96 % Ethanol, 2 mal 10 min in Xylol. Anschließend wurden die Präparate mit einigen Tropfen Eukitt und einem Deckglas versehen.

### **3.20.8 Auswertung von immunhistochemischen und -zytochemischen Färbungen**

In Zellen oder Gewebe zeigen Antikörper-gebundene Proteine, die mit DAB-Substrat nachgewiesen wurden, braune Präzipitate. Proteine, die mit dem Chromogen Fast Red detektiert wurden, weisen rote Farbreaktionen auf. Zellen oder Gewebe sind negativ, wenn nur eine zytoplasmatische, membranäre oder nukleäre blaue Gegenfärbung sichtbar ist. Immunhistochemische Färbungen wurden nach Positivität im Bindegewebe und im Epithel ausgewertet. Hierbei wurden verschiedene Zelltypen berücksichtigt.

### **3.20.9 Auswertung von Multi-Tissue-Arrays**

Die Gewebeproben auf Multi-Tissue-Arrays wurden anhand eines Immuno-Scoring-Systems von einem Pathologen bewertet. Hierbei wurde ein Immuno-Score für die Färbung des Epithels und des Bindegewebes berechnet, der sich aus der Intensität der Färbung und aus dem Prozentsatz der angefärbten Zellen zusammensetzt. Die Intensität der Färbung wurde mit 0 für negativ, 1 für schwach und 2 für stark bewertet. Der Prozentsatz der angefärbten Zellen wurde mit 0 (keine positiven Zellen), 1 (1-10 % der Zellen positiv), 2 (11-50 % der Zellen positiv), 3 (51-90 % der Zellen positiv) und 4 (91-100 % der Zellen positiv) bewertet. Der Faktor für die Intensität der Färbung multipliziert mit dem Faktor für den Prozentsatz der angefärbten Zellen ergibt den Immuno-Score. Wurde beispielsweise die Intensität einer Färbung mit 2 und



der Prozentsatz der gefärbten Zellen mit 3 bewertet, so ergibt sich hieraus ein Immuno-Score von 6.

## 4 Ergebnisse

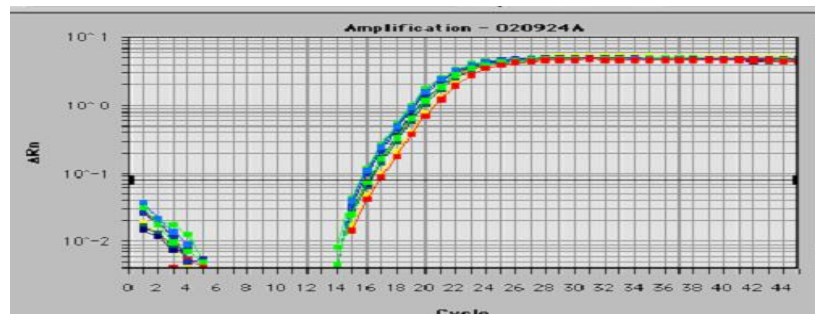
### 4.1 Übersicht

Diese Arbeit hatte die Identifikation von Sequenzen bzw. Genen zum Ziel, die eine tumorspezifische Überexpression im Kolon- bzw. Bronchialkarzinom aufweisen. Als Kriterium galt es hierbei Sequenzen zu identifizieren, für die bisher noch kein Zusammenhang mit Tumorentstehung oder -progression beschrieben wurde und die in einer möglichst großen Anzahl von Tumoren eine signifikante Überexpression aufweisen. Ansätze zur Identifizierung tumorassoziierter Gene lieferten die serumbasierte Hybridisierung von Protein-Arrays und die in-silico-Analyse von EST-Datenbanken. Die RNA-Expressions-Analyse der ermittelten Kandidaten-Gene erfolgte mittels quantitativer Real-Time-PCR mit Patientenproben von Normal- und Tumorgewebe aus Kolon und Lunge. Gene, die eine tumorspezifische Überexpression zeigen, können die Basis für neue, in der Krebsdiagnostik einsetzbare Biomarker sein. In dieser Arbeit wurde ein bisher unbekanntes, in Lungenkarzinomen hochreguliertes Gen identifiziert und durch eine „full-length“-Klonierung sowie durch Expressions-Analysen auf RNA- und Protein-Ebene näher charakterisiert. Ein entsprechendes Protein wurde nachgewiesen und anhand von Vorhersageprogrammen auf seine Funktionalität hin analysiert. Mittels der Generierung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern wurde die Expression des Proteins immunhistologisch und -zytologisch untersucht.

### 4.2 RNA-Qualität

Um festzustellen, ob es sich bei der in quantitativen Real-Time-PCR-Analysen eingesetzten RNA um intakte, nicht degradierte RNA handelte, wurde die extrahierte RNA aus Geweben oder Zelllinien in einem RNA-Analyser überprüft. In Real-Time-PCR-Testläufen wurden die aus den RNAs synthetisierten cDNAs bezüglich der  $C_T$ -Werte miteinander verglichen. Die Amplifikation wurde mit Primern für das „House-keeping“-Gen  $\beta$ -Actin durchgeführt. Es ist davon auszugehen, dass alle Gewebe und Zellen  $\beta$ -Actin ubiquitär exprimieren. Es zeigte sich, dass degradierte RNA einen niedrigeren  $C_T$ -Wert als intakte RNA aufweist. Aufgrund dieser Korrelation wurde in den folgenden Experimenten nur solche RNA eingesetzt, deren  $C_T$ -Werte intakter RNA entsprachen und eine  $\beta$ -Actin-Expression im 15.-17. Zyklus zeigten. Zudem wurde der Quotient aus den Extinktionswerten bei 260 nm und 280 nm berechnet, der den Reinheitsgrad der RNA angibt. Es wurde nur solche RNA eingesetzt, die einen Wert zwischen

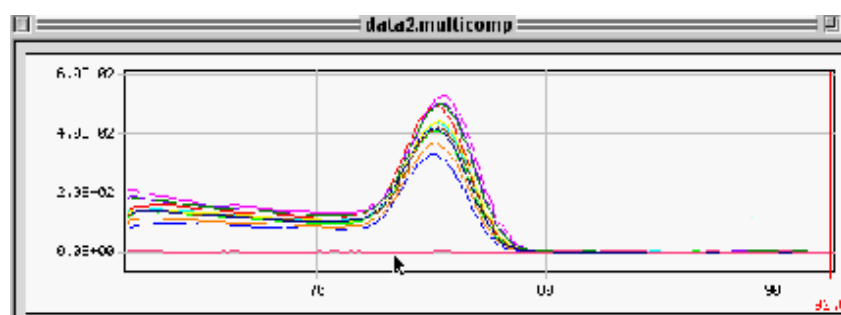
1,5 und 2,0 aufwies. Da die RNA-Extraktion aus mikrodisektiertem Tumorgewebe zum größten Teil zu degradierter RNA führte, wurde eine Aufarbeitung von Gesamt-RNA aus nicht-mikrodisektiertem Tumorgewebe durchgeführt, wodurch ein geringer Anteil von Normalgewebe in der Tumorprobe in Kauf genommen wurden.



**Abb. 4.1: RNA Qualitäts-Test.** Amplifikationsprodukte des „House-keeping“-Gens  $\beta$ -Actin mit cDNA von 5 Lungen-Tumor- und Normalgewebepaaren. Die ubiquitäre  $\beta$ -Actin Expression im 15.-17. Amplifikationszyklus weist auf eine intakte RNA hin. Auf der x-Achse ist die Zahl der Amplifikationszyklen angegeben, die y-Achse beschreibt das gemessene Fluoreszenzsignal

### 4.3 Primerqualität

Die Primer wurden nach den im Methoden-Teil beschriebenen Kriterien für Real-Time-PCR-Analysen ausgewählt. Um die Spezifität der Primer zu gewährleisten, wurden Schmelzkurven der PCR-Reaktionen von allen Primerpaaren aufgenommen. Ein einzelnes Maximum der 1. Ableitung der Schmelzkurve weist auf ein reines PCR-Produkt ohne Nebenprodukte oder Primerdimere hin (Abb. 4.2). Real-Time-PCR-Produkte des *LUMA*-Gens wurden zudem in 2 %igen Agarosegelen auf die Spezifität der Primer und die zu erwartende Größe des PCR-Produkts überprüft.



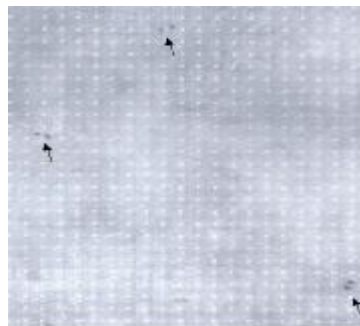
**Abb. 4.2: Schmelzkurvendiagramm.** Dargestellt ist die 1. Ableitung einer Schmelzkurve von 11 PCR-Produkten aus der in-silico-Analyse von EST-Datenbanken (ABI Prism Dissociation Curve Software, PE Applied Biosystems, Foster City, USA). Auf der x-Achse ist die Temperatur angegeben, die y-Achse beschreibt eine Funktion der Fluoreszenzintensität. Jedes einzelne Maximum weist auf ein einzelnes, reines PCR-Produkt hin. Die rote Linie zeigt die Schmelzkurve der Negativkontrolle, welche keine cDNA enthält und somit keinen Schmelzpunkt aufweist.

## 4.4 Identifizierung von tumorassoziierten Genen

### 4.4.1 Serumbasierte Hybridisierung von Protein-Arrays

Ein hochdichter Protein-Array-Satz, bestehend aus zwei Filtern, umfasst ungefähr 27.000 verschiedene Peptide oder Proteine, die aus einer Expressions-Bibliothek von humanem, fötalem Gehirn generiert wurden (Bussow *et al.*, 1998).

Zur Identifikation von tumorassoziierten Genen wurden die Protein-Arrays mit Seren von Tumorpatienten (Kolon- oder Bronchialkarzinom) hybridisiert. Die im Tumors Serum enthaltenen Antikörper binden an auf die Filter immobilisierte, spezifische Antigene, welche Kandidaten für tumorassoziierte Proteine darstellen. Die Hybridisierungssignale auf den Protein-Arrays wurden in Form von Doppelspots mittels eines HRP-konjugierten, humanen anti-IgG-Sekundärantikörpers und eines Chemilumineszenz-Nachweises detektiert (Abb.4.3). Es folgte die Identifizierung der Expressionsklone anhand der Koordinaten der Hybridisierungssignale auf den Röntgenfilmen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA der entsprechenden Expressionsklone sequenziert. Die zugehörigen Gene der erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe von BLAST-Analysen in Datenbanken identifiziert. Diese Gene stellen Kandidaten für tumorspezifisch exprimierte Gene dar. Für einige der detektierten Sequenzen konnten lediglich unbekannte, nicht näher charakterisierte EST-Sequenzen identifiziert werden. Insgesamt wurden 55 Sequenzen über die Hybridisierung identifiziert. Da die serologische Identifizierung alleine noch keine Aussage über die tumorspezifische Expression eines Gens macht, folgte eine Evaluation des Expressionsprofils des jeweiligen Gens auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Real-Time-PCR (vgl. Kapitel 4.5). Hierbei wurden die identifizierten Kandidaten-Gene auf eine differentielle Expression im Vergleich von Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe (Kolon, Lunge) hin untersucht.



**Abb. 4.3: Ausschnitt eines hybridisierten hochdichten Protein-Arrays.** Ein Protein-Array umfasst ca. 27.000 verschiedene Proteine oder Proteinfragmente aus einer humanen Expressions-Bibliothek von fötalem Gehirn. Die Pfeile markieren in Doppelspots angeordnete Proteine, die mit Serum eines Kolonkarzinom-Patienten ein Hybridisierungssignal aufwiesen.

#### 4.4.2 In-silico-Analyse von EST-Datenbanken

Bei der in-silico-Analyse von EST-Datenbanken wurde Sequenzen aus der Datenbank ausgewählt, die über einen RAGE-Ansatz (*random activation of gene expression*) ermittelt wurden (Harrington *et al.*, 2001). Durch eine zusätzlichen Selektion wurden nur solche RAGE-ESTs ermittelt, für die laut Datenbank eine Expression in Tumorgewebe und keine Expression in Normalgewebe nachgewiesen wurde. Insgesamt wurden 330 ESTs ausgewählt, deren differentielle Genexpression in Tumor- und Normalgeweben (Lunge, Kolon) mittels quantitativer Real-Time-PCR analysiert wurde.

#### 4.5 Analyse der differentiellen Genexpression von Kandidaten-Genen aus der Protein-Array Hybridisierung und der in-silico-Analyse von EST-Datenbanken mittels quantitativer Real-Time-PCR

Insgesamt wurde die Genexpression von 55 Gensequenzen, die bei den Hybridisierungen der Protein-Arrays identifiziert wurden, und 330 Sequenzen, die mittels der in-silico-Analyse von EST-Datenbanken ausgewählt wurden, in quantitativen Real-Time-PCR-Analysen untersucht. Nach der Auswahl von spezifischen Primern, wurde die relative Genexpression in 20 verschiedenen Kolon-Tumor- und Normal-Patientenproben und in 5 verschiedenen Lungen-Tumor- (Adenokarzinom) und Normalproben quantifiziert.

Hierbei wurde die relative Genexpression in den Tumor-Patientenproben im Vergleich zur entsprechenden Probe des Normalgewebes, wie unter 3.7.4 beschrieben, berechnet. Die Berechnungen beinhalten sowohl die Normalisierung auf das „*House-keeping*“ Gen  $\beta$ -Aktin, als auch auf die Expressionsdaten der Normalgewebe. Die relative Genexpression gibt die n-fache Hoch- oder Herunterregulierung eines Gens an. Anhand der wiederholten Durchführung von PCR-Amplifikationen wurden die Mittelwerte der relativen Genexpressionen ermittelt und die Reproduzierbarkeit gewährleistet.

Die Ergebnisse der quantitativen Expressions-Analyse zeigten, dass für die untersuchten Kandidaten-Gene zum Teil keine oder lediglich geringe Expressionsunterschiede in Normal- und Tumorgeweben festzustellen waren. Desweiteren wurde für einige Sequenzen lediglich in einzelnen Tumor- und Normal-Patientenproben eine tumorspezifische Überexpression detektiert. Zudem wurden Gene identifiziert, die in einigen Tumoren eine Überexpression zeigten, in der Mehrzahl der Gewebepaare aber eine Herunterregulierung aufwiesen. Im folgenden sind die drei Gene, aus dem Ansatz der Protein-Arrays als auch die drei Gene, die in der in-silico-Analyse von EST-Datenbanken identifiziert wurden, dargestellt, die in bis zu 75 % der Kolonkarzinome, bzw. in bis zu 80 % der Lungenkarzinome eine signifikante

Überexpression aufwiesen (Abb. 4.4 und Tab. 4.1). Die identifizierten Gene zeigten jeweils nur in einer der getesteten Tumorentitäten, Kolon oder Lunge, eine tumorspezifische Überexpression.

Die Gene „*Homo sapiens cDNA FLJ26905 (Klon RCT01427)*“, „*Hypothetical protein FLJ13725*“ und EST 3080 wurden in Protein-Array Hybridisierungen identifiziert. EST 5088, EST 5364 und EST 5412 stammen aus der in-silico-Analyse von EST-Datenbanken.

Eine Datenbankanalyse ergab, dass zu der Sequenz EST 5088 mittlerweile das entsprechende Gen identifiziert wurde, bei dem es sich um den „*Gastrin-releasing*“-Peptid Rezeptor (GRPR) handelt. EST 5412 war als *SMCIL (structural maintenance of chromosomes 1-like 2)* ohne bekannte Funktion annotiert und zeigt Homologien zu dem humanen Chromosomen-Segregations-Protein SMC1. Zu den Sequenzen EST 3080 und EST 5346 lagen keine Informationen über die Identität der entsprechenden Gene vor. Bis auf das Gen *GRPR* konnten für die detektierten differentiell exprimierten Gene keine bekannten Funktionen identifiziert werden (Tab. 4.1).

Eine zwischen 2- und 12-fach erhöhte Expression wurde für das Gen „*Homo sapiens cDNA FLJ26905 (Klon RCT01427)*“ in 10 von 20 Kolonkarzinomen detektiert. Die Werte von 10 weiteren Kolonkarzinom-Patienten lagen zwischen 2-fach herunterreguliert und 2-fach hochreguliert.

Für das Gen „*Hypothetical protein FLJ13725*“ wurde in 8 von 20 Kolonkarzinomgeweben erhöhte Expressionswerte zwischen 2- und 10-fach ermittelt, wohingegen 12 Proben in einem Bereich von 6-fach herunterreguliert bis 2-fach hochreguliert lagen.

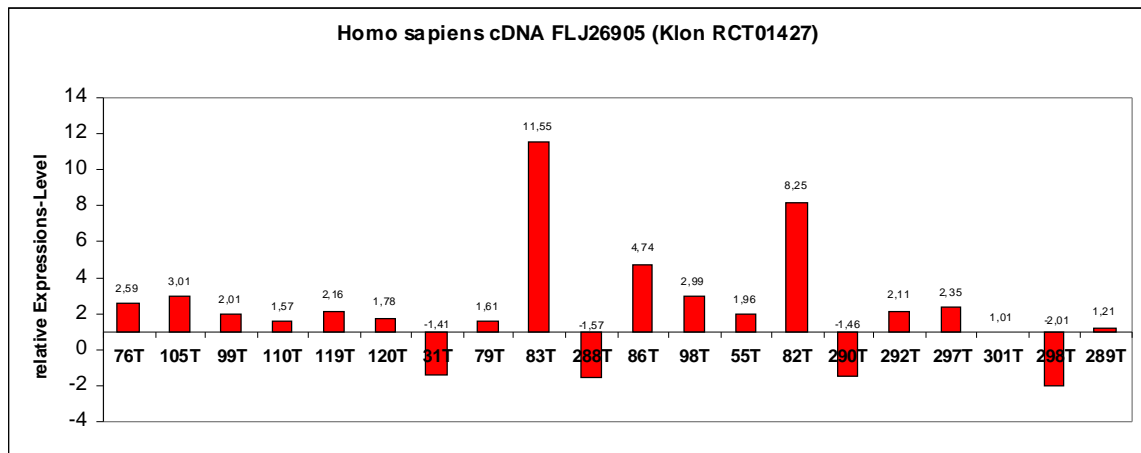
Für *GRPR* (EST 5088) wurde in 8 von 20 Kolonkarzinomen eine zum Teil starke Überexpression detektiert (2- bis über 1.000-fach). In 12 Fällen lagen die Werte der relativen Expression zwischen 22-fach herunterreguliert und 2-fach hochreguliert.

EST 3080 wies in einer großen Anzahl der untersuchten Kolonkarzinome (15 von 20) eine moderate Hochregulation von 3- bis 7-fach im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe auf.

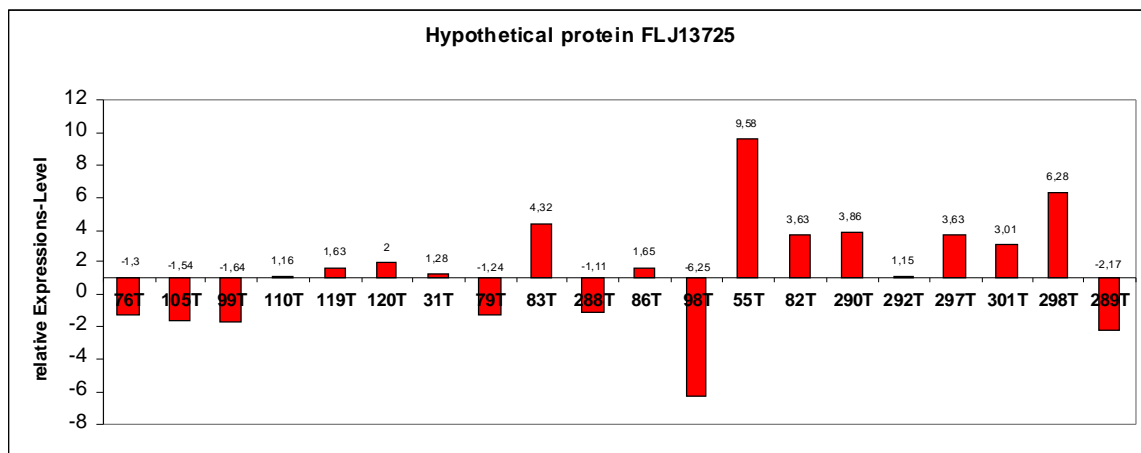
Für *SMCIL* (EST 5412) und EST 5364 wurde in 4 von 5 Lungen-Adenokarzinomen eine erhöhte Expression identifiziert. Die Überexpression von *SMCIL* variierte zwischen 3 und über 4.000-fach. In einem Gewebepaar wurde eine Herunterregulierung detektiert.

EST 5364 wies in 4 von 5 Lungen-Adenokarzinomen eine signifikante, zwischen 5- und 160-fache erhöhte Expression auf. In einem Gewebepaar wurde keine differentielle Expression detektiert.

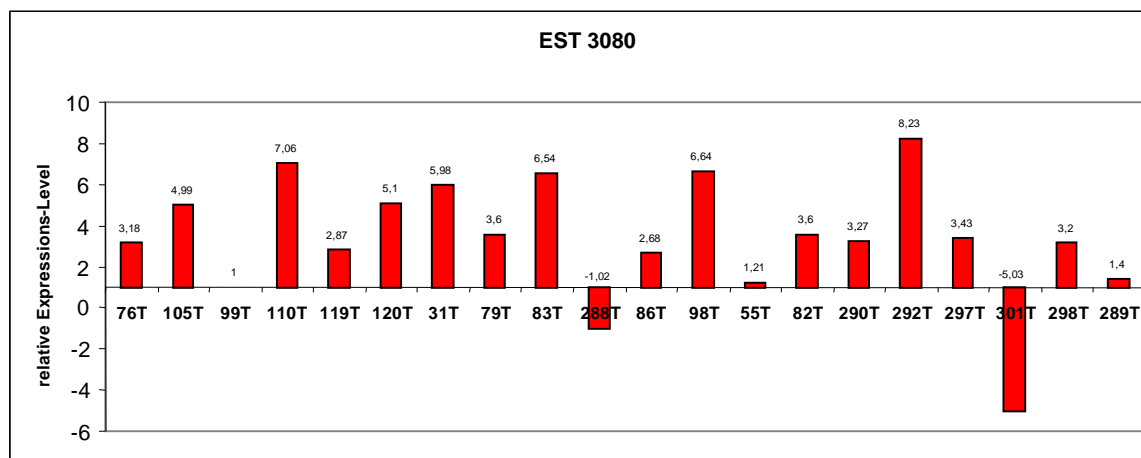
**A.**



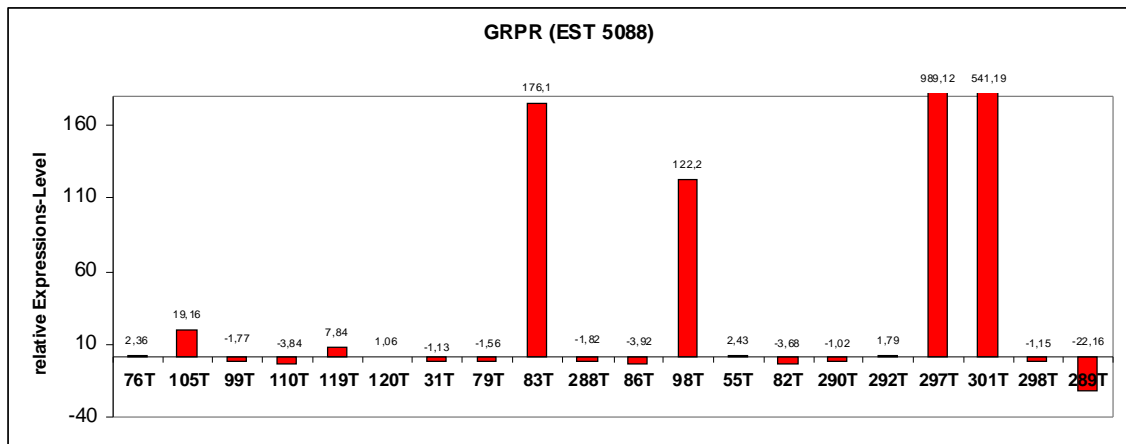
**B.**



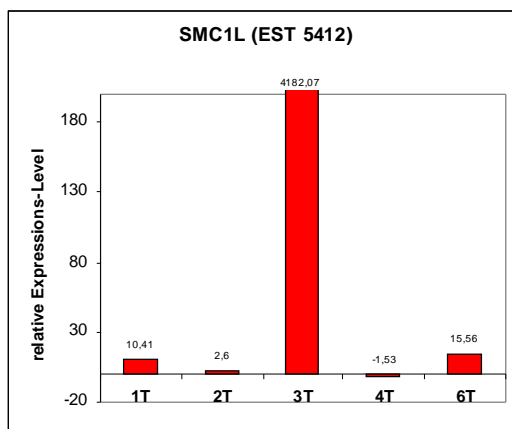
**C.**



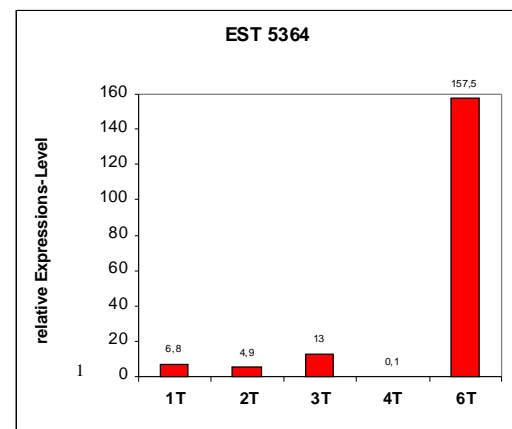
D.



E.



F.



**Abb. 4.4: Quantitative Expressionsanalyse von 6 Genen in Tumor- und korrespondierenden Normalgeweben (Kolon, Lunge).** Die Abbildung stellt die mit Real-Time-PCR gemessene relative Expression dar, die die Normalisierung auf das „House-keeping“-Gen  $\beta$ -Aktin und auf die Expressionsdaten der Normalgewebe beinhaltet. Die Höhe der Säulen gibt die relative Genexpression im Tumor im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe an. Jede Säule repräsentiert eine Tumorprobe. Die Real-Time-PCR-Analysen der dargestellten Gene wurden wiederholt und die Mittelwerte der relativen Expression graphisch dargestellt. Es wurden folgende Primerpaare verwendet: A.): 3072.1/3071, B.) 3026/3027, C.) 3080/3081, D.) 5088.1/5089.1, E.) 5412/5413, F.) L-5364/L-5365.

A.-D.) Quantitative Expressionsanalyse in Kolon-Tumor- und korrespondierenden Normalgeweben.  
E.-F.) Quantitative Expressionsanalyse in Lungen-Tumor- (Adenokarzinome) und korrespondierenden Normalgeweben.



Tab. 4.1: Überexprimierte Gene im Kolonkarzinom bzw. Lungen-Adenokarzinom

Differentielles Genprodukt im Kolonkarzinom	Identifizierung / Ansatz	Genbank-Nummer/ NCBI <i>UniGene Cluster</i> (Hs.)	Funktion
„ <i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ26905 (Klon RCT01427)“	Protein-Array-Hybridisierung	AK057174 / Hs.356861	- Funktion nicht bekannt - Homologie (88 %) zur humanen Ig Lambda Kette
„ <i>Hypothetical protein FLJ13725</i> “	Protein-Array-Hybridisierung	NM024519 / Hs.152717	- Funktion nicht bekannt
EST 3080	Protein-Array-Hybridisierung	CB850698	- Funktion nicht bekannt
“ <i>Gastrin-releasing</i> “-Peptid Rezeptor (GRPR), (EST 5088)	In-slico-Analyse von EST-Datenbanken	BG216701 / Hs.73883	- GRPR vermittelt durch die Bindung des Liganden GRP diverse physiologische Funktionen des zentralen Nervensystems und des Gastrointestinaltraktes und reguliert Proliferations- und Differenzierungsprozesse in Tumorzellen.
Differentielles Genprodukt im Lungen-Adenokarzinom		Genbank-Nummer/ NCBI <i>UniGene Cluster</i> (Hs.)	Funktion
SMC1L (“ <i>structural maintenance of chromosomes 1-like 2</i> “), (EST 5412)	In-slico-Analyse von EST-Datenbanken	BG221579 / Hs.334176	- Funktion nicht bekannt - Homologie (52 %) zu humanem Chromosomen-Segregations-Protein SMC1
EST 5364	In-slico-Analyse von EST-Datenbanken	BG186897, BG181290 / Hs.223847	- Funktion nicht bekannt

#### 4.6 Auswahl eines Gens zur weiteren Charakterisierung

Aus den identifizierten, differentiell exprimierten Genen (Abb. 4.4 und Tab. 4.1) wurde ein Gen aufgrund der Expressionsdaten ausgewählt, das näher charakterisiert und auf seine Eignung als molekularbiologischer Diagnostik-Marker untersucht wurde. Mittels der Generierung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern gegen ein identifiziertes, differentiell exprimiertes Gen sollte mit Hilfe von immunzytologischen und -histologischen Analysen die Expression auf Protein-Ebene determiniert werden.

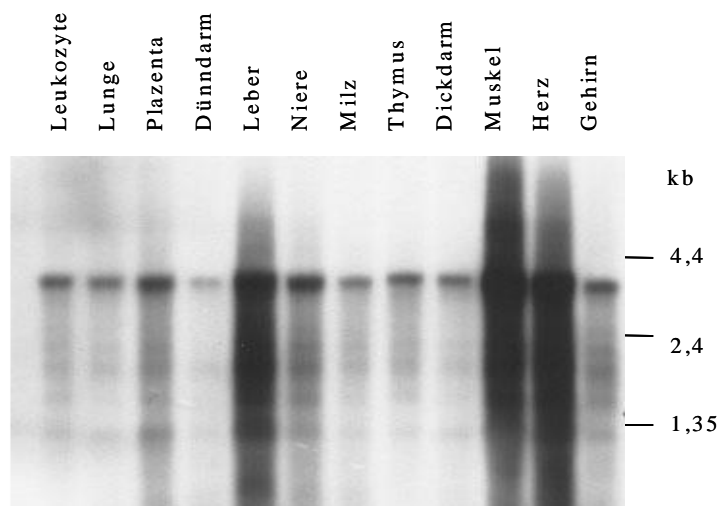
Als geeignetester Kandidat hierfür wurde der EST 5364 ausgewählt, da in 4 von 5 Lungen-Adenokarzinomen eine signifikante Überexpression im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe zu detektieren war (Abb. 4.4.F). Die Sequenz war auch die einzige, die in keinem Gewebepaar eine Herunterregulierung zeigte. BLAST-Analysen ergaben, dass für EST

5364 zwei Datenbankeinträge mit jeweils einer EST-Sequenz (Genbank-Nummer BG186897 und BG181290) existierten. Beide auf Chromosom 6q21 lokalisierten EST-Sequenzen umfassten eine Gesamt-Länge von 472 Basenpaaren und beinhalteten ein Polyadenylierungssignal, so dass zumindest ein 3'-Bereich des Gens bekannt war. Das unbekannte Gen EST 5364 wurde *LUMA* (*Lung Marker*) genannt und wird im folgenden Teil der Arbeit näher charakterisiert.

## 4.7 Charakterisierung des bisher unbekanntes Gens *LUMA*

### 4.7.1 Gengröße und Expressionsanalyse

Um die vollständige Größe des *LUMA*-Transkriptes zu identifizieren und um dessen Gewebeverteilung zu analysieren, wurde ein Northern Blot durchgeführt. Hierzu wurde ein Multiple Tissue Northern Blot (Clontech, Palo Alto, USA) mit Poly-A<sup>+</sup>RNA aus 12 verschiedenen, humanen Geweben verwendet, der mit einer *LUMA*-spezifischen Sonde hybridisiert wurde. Die Sonde wurde über eine PCR-Amplifikation von Plazenta-cDNA und anschließender Digoxigenin-Markierung generiert. Die Northern Blot Ergebnisse in Abb. 4.5 zeigen ein Transkript in der Größe von ca. 3,5 kb. Die detektierten zusätzlichen, schwächeren Banden stellen möglicherweise alternative Spleiß-Varianten dar. In allen getesteten Geweben war eine Genexpression nachweisbar. Eine verstärkte Expression zeigte sich in Leber, Muskel und Herz.

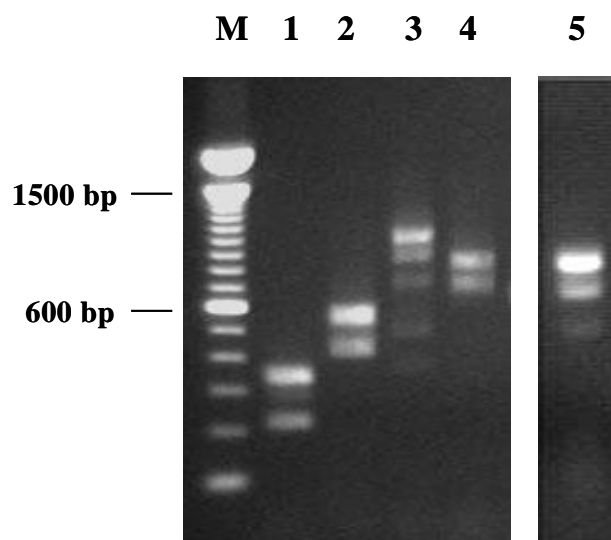


**Abb. 4.5: Northern Blot Hybridisierung.** Der Northern Blot mit Poly-A<sup>+</sup>RNA aus 12 verschiedenen, humanen Geweben wurde mit einer *LUMA*-Sonde (PCR-Produkt mit einer Größe von 219 bp) hybridisiert. Die Menge an RNA in jeder Spur ist, laut Angaben des Herstellers, genau auf 1 µg aufgereinigter Poly-A<sup>+</sup>RNA eingestellt, so dass keine Kontroll-Hybridisierung der Membran mit einer „House-keeping“-Gen-Sonde durchgeführt werden musste.

## 4.7.2 Darstellung der vollen Länge des *LUMA*-Transkriptes

### 4.7.2.1 Überprüfen von vorhergesagten Exons

Um die vollständige cDNA des *LUMA*-Transkriptes zu erhalten wurde der genomische Klon mit der Genbank-Nummer AL359711, auf dem die bisher bekannte cDNA-Sequenz lokalisiert ist, anhand der Programme Genscan und Xpound auf vorhergesagte Exons untersucht. In die dabei identifizierten potentiellen Exons wurden „*forward*“-Primer positioniert. Mit Hilfe von „*reverse*“-Primern, die in die bekannte Sequenz (Genbank-Nummer BG186897 und BG181290) gelegt wurden, konnten so PCR-Produkte amplifiziert werden. Als cDNA wurde Plazenta-cDNA eingesetzt, da das Gen in diesem Gewebe exprimiert wird (vgl. Northern Blot Abb. 4.5). Im Agarosegel zeigte sich, dass jedes PCR-Produkt aus mehreren Amplifikations-Produkten besteht (Abb. 4.6). Die verschiedenen Banden wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert. Mittels der Sequenzanalyse wurden 5 neue, mit Computerprogrammen vorhergesagte Exons im 5'-Bereich des unbekanntes Gens *LUMA* verifiziert. Es bestätigte sich die Vermutung (vgl. 4.7.1), dass es sich bei den multiplen Banden eines PCR-Produkts um verschiedene alternative Spleiß-Varianten des Gens handelt. Die identifizierten Spleiß-Varianten sind unter 4.7.3 aufgeführt.

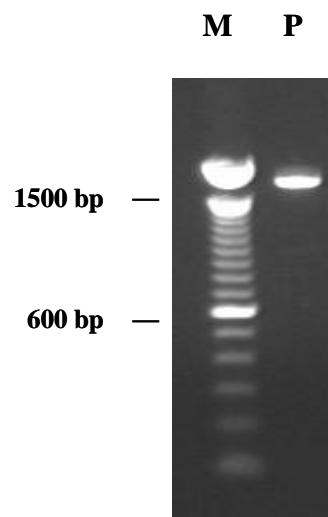


**Abb. 4.6: Bestätigung von vorhergesagten Exons.** Zur Überprüfung von vorhergesagten Exons, die mit den Programmen Genscan und Xpound aus HUSAR ermittelt wurden, wurden PCR-Reaktionen mit Plazenta-cDNA durchgeführt. Die „*forward*“-Primer wurden in potentielle Exons, die „*reverse*“-Primer in die bekannte Sequenz (Genbank-Nummer BG186897 und BG181290) positioniert. Verschiedene Banden eines PCR-Produktes repräsentieren verschiedene alternative Spleiß-Varianten des Gens *LUMA*. Spur 1 zeigt die Positivkontrolle, bei der ein PCR-Produkt mit „*forward*“- und „*reverse*“-Primern in der bekannten Sequenz (Genbank-Nummer BG186897 und BG181290) generiert wurde. Eingesetzte Primer: (1): L-70894/L-5365.1; (2): L-66450/L-5365.1; (3): L-63369/L-5365.1; (4): L-63783/L-5365.1; (5): L-5364.16/L-25. M: 100 bp Marker (Gibco BRL/Invitrogen).

#### 4.7.2.2 5'-RACE

Da das bisher unbekannte Transkript anhand der Northern Blot Analyse mit einer Größe von ca. 3,5 kb detektiert wurde (vgl. 4.7.1), mittels der PCR-Analysen von vorhergesagten Exons diese Größe aber noch nicht erreicht wurde, wurde zur Generierung der vollständigen cDNA die RACE-Methode (*rapid amplification of cDNA ends*) angewandt. Die RACE-Methode erlaubt die Amplifizierung des noch unbekanntes 5'-Endes (5'-RACE) bzw. 3'-Endes (3'RACE) eines bereits sequenzierten cDNA-Fragmentes.

Unter Verwendung von spezifischen *LUMA*-Primern, die in der bekannten Sequenz lokalisiert sind, und unspezifischen 5'-RACE-Primern wurde das unbekanntes 5'-Ende der cDNA amplifiziert. Das 5'RACE-Produkt, wurde über eine PCR und anschließende Nested-PCR, bei der eine konsekutive Amplifikation mit einem weiter 5'-liegenden Primer erfolgte, generiert (Abb. 4.7). Das Nested-PCR-Produkt wurde aufgereinigt und in den Vektor pCRL-XL-TOPO kloniert. Nach Transformation von *E. coli* Bakterien wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, in der die Klone auf das Tragen eines Inserts analysiert wurden.



**Abb. 4.7: 5'-RACE.** Dargestellt ist das 5'-RACE Nested-PCR-Produkt, das mit cDNA von Plazenta (P) generiert wurde. Das PCR-Produkt wurde mit dem „reverse“-Primer L-50 und anschließend mit dem „reverse“-Nested-Primer L-49 amplifiziert. Als „forward“-Primer wurden spezifische 5'RACE-Primer eingesetzt. M: 100 bp Marker (Gibco BRL / Invitrogen).

Mittels Sequenzierung des 5'-RACE-Produkts konnte die bisher unbekanntes Sequenz des Gens ermittelt werden. Die neuen Exons wurden mit Hilfe des Programms Bestfit (Devereux *et al.*, 1984) aus HUSAR durch einen Vergleich der Sequenzen mit dem genomischen Klon (Genbank-Nummer AL359711) bestimmt („*Alignment*“). Es wurden 8 neue Exons und eine Verlängerung eines bereits bekannten Exons des Gens *LUMA* ermittelt (Tab. 4.2).

### 4.7.2.3 Überprüfen von ESTs im 5'-Bereich des Gens

Um zu untersuchen, ob die durch die 5'-RACE identifizierten Gensequenzen das vollständige neue Transkript *LUMA* darstellen, oder ob sich im genomischen 5'-Bereich weitere genzugehörige Exons befinden, wurden weitere PCR-Analysen durchgeführt. Hierbei wurden aus der Datenbank ESTs ermittelt, die im genomischen 5'-Bereich von *LUMA* lokalisiert sind. Es handelt sich hierbei um ESTs, zu welchen noch kein Gen zugeordnet werden kann und die daher möglicherweise Teil des *LUMA*-Gens sind. Diese ESTs wurden für die Lokalisation von „forward“-Primern ausgewählt. Als „reverse“-Primer wurden Primer aus der ermittelten, bekannten *LUMA*-Sequenz ausgewählt. Mittels PCR-Analysen (Primerkombinationen: L-115/L-116, L-115/L-117, L-115/L-118, L-119/L-116, L-98/L-99, L-96/L-99, L-98/L-62, L-96/L-62, L-94/L-62, L-120/L-121) mit cDNA aus verschiedenen Geweben (Plazenta, Lungen-Adenokarzinom, Hoden, Kolon, Herz) konnten keine weiteren Produkte amplifiziert werden. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei der cDNA-Sequenz, die mittels der PCR-basierenden Bestätigung von vorhergesagten Exons und der 5'-RACE-PCR identifiziert wurde, um das vollständige *LUMA*-Transkript handelt.

### 4.7.3 Genomische Struktur des *LUMA*-Gens

Mittels der „full-length“-Klonierung konnte das gesamte bisher unbekannte Gen *LUMA* ermittelt werden.

Das Gen besteht aus 15 Introns und 16 Exons, die in einer Größe zwischen 54 und 874 Basenpaaren variieren. Die vollständige cDNA-Sequenz umfasst eine Länge von 3410 bp (Abb.4.10). Diese Größe korreliert mit der im Northern Blot erhaltenen Gengröße von ca. 3,5 kb, da zu den identifizierten 3410 Basenpaaren 100–200 Adenosine des Poly-A-Schwanzes der RNA zuzurechnen sind. Durch Sequenzierungen, die zur Identifikation der vollen cDNA-Länge des Gens durchgeführt wurden, wurden verschiedene alternative Spleiß-Varianten des Gens detektiert (vgl. 4.7.4 und Tab 4.2). Differentielles Spleißen führt zu Transkripten mit unterschiedlich langen offenen Leserahmen (ORF, *open reading frame*). Das Start-Codon liegt bei Nukleotid 1252 bis 1254 in Exon 7. Die sehr lange 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) umfasst 1251 bp, wohingegen die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) aufgrund differentiellen Spleißens variieren kann. Als STOP-Codons werden TAG oder TAA verwendet. Aufgrund alternativer Prozessierungsereignisse besitzt das Gen 3 verschiedene STOP-Codons. Das Polyadenylierungssignal (AATAA) liegt bei Nukleotid 3386 bis 3391 (Abb. 4.10). Die Intron-Exon Sequenzübergänge entsprechen der GT-AG- Regel (Iida, Y, 1990). Einzige Ausnahme ist

hierbei der Intron-Exon Sequenzübergang des Exon 16A (Abb. 4.9), bei dem das Intron nicht mit Adenin und Guanin sondern mit zwei Adeninen beendet wird. In Tab. 4.2 sind alle Exons des Gens *LUMA* und deren Lokalisation auf dem genomischen Klon, Genbank-Nummer AL359711 („*Human DNA sequence from clone RP11-425D10 on chromosome 6, complete sequence. AL359711.gb\_pr18*“), angegeben.

**Tab. 4.2: Exonstruktur des Gens *LUMA*.** Die Exons sind als Position auf dem genomischen Klon, Genbank-Nummer AL359711, angegeben. Alternative Exon-Start-Punkte und alternative Exon-Größen sind in Klammern aufgeführt.

Exon	Position auf genomischem Klon, Genbank-Nummer AL35971	Größe Exon	Spleiß-Varianten
1	31649 bp – 32094 bp	446 bp	
2	36503 bp – 36732 bp	230 bp	
3	37720 bp – 37858 bp	139 bp	
4	39288 bp – 39408 bp	121 bp	
5	46143 bp – 46290 bp	148 bp	Differentiell gespleißtes Exon
6	51443 bp – 51552 bp	110 bp	
7	58808 bp – 58957 bp	150 bp	
8	59836 bp – 59889 bp	54 bp	
9	60888 bp – 61055 bp	168 bp	
10	63342 bp – 63494 bp	153 bp	
11	63739 bp (63742 bp) - 63873 bp	135 bp (132 bp)	Alternativer Start des Exons bei 63742 bp, differentiell gespleißtes Exon
12	64839 bp – 64991 bp	153 bp	Differentiell gespleißtes Exon
13	66427 bp – 66636 bp	210 bp	Differentiell gespleißtes Exon
14	70867 bp – 70987 bp	121 bp	
15	75227 bp (75279 bp) - 75354 bp	128 bp (76 bp)	Alternativer Start des Exons bei 75279 bp, beide Exon- Varianten sind differentiell gespleißt
16	76537 bp (77287 bp) - 77480 bp	874 bp (123 bp)	Alternativer Start des Exons bei 77287 bp

#### 4.7.4 Alternatives Spleißen und Identifizierung von Protein-Isoformen

Durch alternatives Spleißen entstehen veränderte cDNA-Transkripte, die auch eine veränderte oder verkürzte Aminosäuresequenz zur Folge haben und somit zu unterschiedlichen Protein-Isoformen führen können.

Anhand der Sequenzierungen, die zur Identifikation der vollen cDNA-Länge des Gens *LUMA* durchgeführt wurden, wurden alternative Spleiß-Varianten detektiert, die eine komplexe Vielfalt aufweisen. Exon 5, 11, 12, 13 15 und 16 sind differentiell gespleißte Exons. Sequenzierungsergebnisse verschiedener Klone ergaben, dass die Exons 11 und 12, sowie die Exons 11, 12 und 13 in Kombination gespleißt werden können.

Das Spleißen ganzer *LUMA*-Exons führt zu keinem Abbruch des ORF, sondern bedingt eine „*in frame*“-Deletion der entsprechenden Nukleotidsequenz und hat das Fehlen der entsprechenden, internen Aminosäuresequenz zur Folge. Hierdurch können verschiedene *LUMA*-Protein-Isoformen entstehen. Im Gegensatz hierzu wurde zudem das Spleißen von partiellen Exon-Sequenzen detektiert. Exon 11 kann durch eine 3 bp-„*in frame*“-Deletion zusätzlich einen alternativen Exon-Start besitzen. Exon 16 kann teilweise, Exon 15 komplett oder teilweise gespleißt vorliegen. Das partielle Herausspleißen von Exon 15 hat eine Leserasterverschiebung („*frameshift*“) zur Folge, die zu einer veränderten Carboxy-terminalen Protein-Isoform führt (Abb. 4.8). Durch diese Teildeletion von Exon 15 entsteht eine Protein-Isoform, die mit *LUMA-15B* bezeichnet wurde, und die im Vergleich zu *LUMA-15A* (umfasst das gesamte Exon 15) verkürzt ist und 5 veränderte Aminosäuren besitzt. Eine weitere Carboxy-terminale Protein-Isoform entsteht durch eine im 5'-Bereich verlängerte Nukleotidsequenz von Exon 16 (*LUMA-16A*, Abb. 4.9). Durch alternatives Spleißen werden somit drei verschiedene Carboxy-terminale *LUMA*-Protein-Isoformen generiert (*LUMA-15A*, *LUMA-15B*, *LUMA-16A*). Die gesamte cDNA-Sequenz und Aminosäuresequenz und die Organisation des Gens *LUMA* ist in Abb. 4.10 und Abb. 4.11 dargestellt.





... **Exon 15**

```

LUMA-16A .....ACGCTTTTAAAGACTAATCTCAAAGGCAGTAAAATAACAAGATGGATTCAAAGGCCACAGACT
LUMA-16B .....ACGCTTTTAAAGACTAATCTCAAAGGCAGTAAAATAACAAGATGGATTCAAAGGCCACAGACT

LUMA-16A .....Q R F L K T N L K G S K I T R W I Q R P Q T
LUMA-16B .....Q R F L K T N L K G S K I T R W I Q R P Q T

```

**Exon 16A**

```

LUMA-16A AAGCCCTTTTCAAAAAGAAGCAAAGTTCACTTTGTATGTGTGGGATCACAAGGCTTTCAAGAATCACTTCATCTC
LUMA-16B .....

LUMA-16A K P F S K R S K V H F V C V G S Q G L S R I T S S P
LUMA-16B .....

LUMA-16A CATTTCACCCTGAAAGCTGCAATACCATGGGGGTGTTGGTGATCGTGACTTGTGAAAAGGCTGCTAAGCAGATAA
LUMA-16B .....

LUMA-16A F H P E S C N T M G V L V I V T C *
LUMA-16B .....

LUMA-16A GTGCATTAGTGAAGATTTATTATATTTGAGAGATTCAAAGGGTGATAGGCTAAAGCTAATTGATGAACATTGCC
LUMA-16B .....

LUMA-16A TACCAAATAAAATAAACCTACAGTGAAGTGTCTTGTGGGCCCATGGCCAGTGGCTATGTACAATACGGGAACCC
LUMA-16B .....

LUMA-16A CAAGCAAAAACCTCAAGGCCAGGAAGGTACACAGTTAGCTGGAACCTCAGATCTCAGGTCTGACTTCTTAAGCA
LUMA-16B .....

LUMA-16A AGGCCTATGAGACAAGTCAGATAAAATACTCATTGAAGAGGAATTTATACATGGCTGAAATGTAAGAACACAGTTAA
LUMA-16B .....

LUMA-16A TTTTCTAAAATTAGCCCTGCACTAACACAAATGATAAAAAATTAAGGAATTTTAGATTACTTGAAGTATGAGCT
LUMA-16B .....

LUMA-16A GTGTTTTCTTCTTAAGTGAAGTGGCTTTCCACTGATGGATTCATTCTTGACCAATCCCTTTAGGACAATGGCA
LUMA-16B .....

LUMA-16A AAATACAGACAAGAAGGCATACTATATGGCCTAACCCAGACTGAATCAATGATCTTGGTCTCATTATAAACAGTGA
LUMA-16B .....

```

**Exon 16B**

```

LUMA-16A CTTTTTATGATGCTATAACAAGAATTATTCACCATGTTCTTAACACCAATATCTACTTATATTACAGGTACCTATT
LUMA-16B .....GTACCTATT
LUMA-16B ..... V P I

LUMA-16A AAACACAAAAAAGAAGTACGATGTTTCTACCCAATATGGCAGAAAATGTTCAACTGACAGCTTTTCAGGTTC
LUMA-16B AAACACAAAAAAGAAGTACGATGTTTCTACCCAATATGGCAGAAAATGTTCAACTGACAGCTTTTCAGGTTC

LUMA-16B K H K K R T D D V F L P N M A E N V Q L T A F Q V

LUMA-16A AAACAGCTCCATCCAGATTCCCATTTAGAGCTGACTGGTGATGATATCTTCTTTTCCAACCTTTATTTCTATGAG
LUMA-16B AAACAGCTCCATCCAGATTCCCATTTAGAGCTGACTGGTGATGATATCTTCTTTTCCAACCTTTATTTCTATGAG

LUMA-16B Q T A P S R F P F R A D W *

LUMA-16A TATTTGAATGAATAAAAATGACTCCAAATGCC
LUMA-16B TATTTGAATGAATAAAAATGACTCCAAATGCC

```

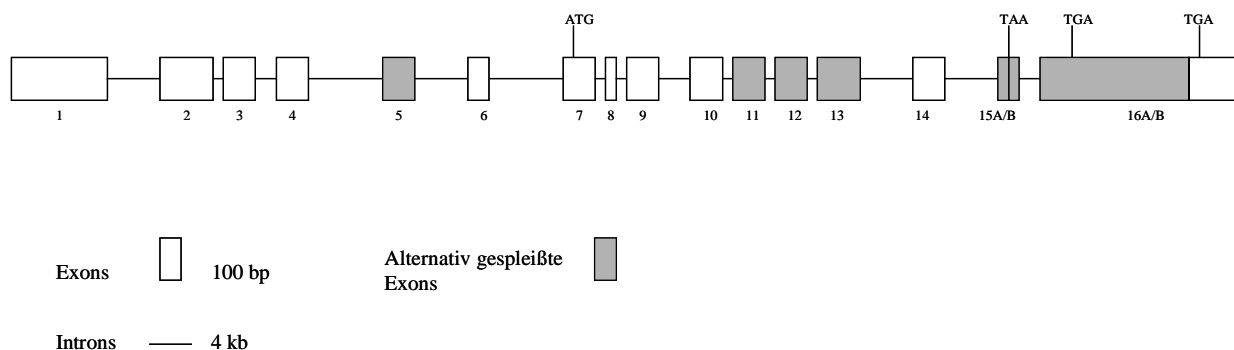
**Abb. 4.9: cDNA-Sequenz und codierte Aminosäuresequenz der Exon 16 Spleiß-Varianten.** Die Spleiß-Variante *LUMA-16A* beinhaltet eine verlängerte Nukleotidsequenz des Exons 16, wohingegen *LUMA-16B* durch eine Teildeletion von Exon 16 (in blauer Schrift dargestellte Sequenz) charakterisiert ist. Ist eine im 5'-Bereich verlängerte Sequenz von Exon 16 vorhanden, führt dies zu einer veränderten Carboxy-terminalen Protein-Isoform (*LUMA-16A*, in roter Schrift dargestellte Sequenz). Dargestellt ist Exon 15 (Teilsequenz), Exon 16A und 16B. Der Exon 16 Startpunkt und der alternative Startpunkt sind durch Unterstreichen markiert.

```

1      TGCATATGTGTGTTTATATCTGTACTTTTAAGGAAAAATTGATATCACACTATACATTACCATGTACAGATCTGCTGTAAGGGCTGGAAACTTGGC
98     ATTTTCATACAGAGCCAAAATTTGATGTGCTCAAAGAAAATTTAAGTTAGAAATGTTACTCTGGTTTTTATGAATTTCTAGCAGTTGAGGGAAATG
195    GGTTCTTGTAAATACAGTTACTCTAGTTTTCTCCGAAAACCATATGTAATAATATATATGTGCTTCAAATGGAAAGTTTTTTTGTGTTTTTTTT
292    AGCTGTGCCTCTGTGGCTGAGTGACCGTGAACCGCAAGGTGGCTCATGGAGAACTGGTGGGTGTCAACTGCTACTGGAAGATGTTCTGAGTAGCTA
389    TCATGTGACCATGGAGGCCCCCAAAGACAGCAAGCCACACTGGGCAAAAATACACAGCCAGATGGTCCAAAGTGCCAGGATTCAGAAGTCAGTTC
486    CGAAGCAGCCCAAAGACCTCTGAGCTGTGGAGGCCCTGTGGCAGTGCAGTGCCTTTGCTTTGCTGAGATCATTCTGATACCTGGGAAGCAGC
583    TGGAAAGTGCTAAAGGACCTGGGGCGACTCAAGCTGCAAGCCAGGATATCACTCTGCTCTCTCCACAAACGGTTTTTCAGAGCTCTATCAAC
680    TGACTTCTCTACCCCAAGCTGAAAGCTATAGCCAGGCAGATGGGAAAGAAGATGAATTTGAAAGATTATAGTAATAATCACTCAGTCTGTTCTTCCC
777    CCCAGTGGAGCCTCAGAAGTTGAAATAAAAACCTCACCACCTTCAAACCTCTCGAAAATTGTGAAATTCAAATGATCCAAAGAGTACTAAGAAAAG
874    TTAACAGAGAAATGACACTGGTTTTATCAGAAAAGTGCAAGGAGGAGTGTCTCTCCCTACAGCTGTACTGGGACAGTGGCAATGTGTCTTCTGGCC
971    TTTATTTCCCTAAAGGAAAAGCAAAAACAGATTTATATGTTTATATGGAAGTAGTCAATTTGTAAGAAAACATAGAATCCCATTTTCAAACCAGG
1068   ACTTGGCAGTAAATAGACTCTCTGGAACACCAAGTCATGAAGAAAACCTTTTCAGTCTCAAGCACCAAAATAGTTGAAAAATTTATACAGAGATTA
1165   ATGTAGAATTATCAGGATGATGGAGTAGAGATCACTTTTCAGGAAAGATCACCTTGAGGCCCTGCTCTTCCCTGGGTTGTGATGTGCAAGAG
M A R
1262   AATGCAGCAACTTTGAGACCTACTCCATGTGCTATGAGCATGTGTGTCATCATGTAGGCAGAGGCTCAGCCAGAAAGAGCAAGAAATFAGATGCTAC
E C S N F E T Y S M C Y E H V L H H A R Q R L S Q K E Q E L D A T
1359   ACAAGAGGCCAGGTCACCTGAAGACAGTGTGCCCAGATTGTCAGAGCTCAGTCATGATATGATCATGGAAATCACCCTCTGAGAGCCCAACTC
Q R G Q G P P E D S A G Q I A E L S H D M I M E I T T L R A Q L
1456   ACAGACTTGGAAAGATGAATCTGAATCTCAAGAAGCAGATTAGAAAAGAAGTCCAAGAAGAATATGAAGCATTAGTCCGAGCTTTGTTGAGACCT
T D L E E V N L N L K K Q I R K E V Q E E Y E A L V R A L F E T C
1553   GTTTACACATAAAAGGAAGCTGGATGATAATCAGCTTAATTTGATCCAGAAGTGTGTGAGCTCATCGTGAAGTGAGAACAGAGAGGATGACAA
L H I K E K L D D N Q L N L I Q K V C E L I G E V R T E G I D N
1650   NATGAAGACCTAAAGAAAATGTTGCTGTGCCAGCCCGCTGAAGGAATGAAGAAAACCCAGCCAAAACAGGAACAGCTGTGGCCCTTGGAGCAG
M K D L K K K W C S A S P D E G M K E N P A K Q E Q L W A L E Q
1747   GACAACTGCAGCTGGCCAACTGGTGTGCAAGTGAGGAGCCCTGGGCCCTGGAGGCTGGCTGTGCAGCAGCGGTGCTTCCAGGCCAGCTGAGCA
D N C S L A N L V C K V R S L G R W R L A V Q Q A C F Q A Q L S R
1844   GGACAGAGAAAGCAATCTTAAAGTAAAAAAGATATTTGCGCATCAAGCTGATGGCAGAGCAGAAAGTGGGTTTTATTTGCTCAGCAGCTCTGCG
T E K E S I Q S K K E Y L R I K L M A E R E V G L F R Q Q V L A
1941   TCTCAGCCAGGCCCTGGCCAGGCCACAGGCTGACAGCCGAGGATGTGGAAGCAGCAGGACAGCCAGCTCAACTGCTGAAGGAGTTAGAACATAGA
L R Q A L A R A Q A D S A R M W K Q Q D S Q A Q L L K E L E H R
2038   GTGACCCAGGAGCTCTCACCAGCAGCTGCATTTTATGAAAACATCCAGGATGGAGAAGCTCTTGAAGATGTGGGCAAAAAGAACAGCAAC
V T Q E A L T Q Q Q L H F M K T S R M E K L L E D V G Q K E Q Q
2135   TGCAGCTCTTAGCAAGAGGCTGAGAGGGCTTCTAAGCTGGCCCACTGCAGCAGAAAAAATGAAGAGGACCTCCACCAGATGAGAGCCCGGCT
L Q L S K E A E R A S K L G Q Q L Q Q K K M K R D L H Q M R S R L
2232   TGCCAGGAGCCAGTGTGAAGCTGGATGCTCTCAGCGTGACAGGAGCTGCGAGGTCAGCTTCCAGTATGCCAGCGGTGAGCTGTCCCTCAGGCG
A Q E R S V K L D A L Q R A E E L Q G Q L H D A Q R S A V P M G
2329   TCGTCAGCCAGCCCTTATCCAGGCTCAATACTCCCACTTCTGCTTCCACATCATCCAGTACTCCAGCAGCGCTTTTAAAGACTAATCTCA
S S G D L I S Q A Q Y S P T S A S T S S R Y S Q Q R F L K T N L K
S S G .....D T P S N A F *
2426   AAGCAGTAAATAACAAGATGGATTCAAAGGCCACAGACTTAAGCCCTTTTCAAAGAAGCAAAAGTTCATTTGTATGTGTGGGATCACAAAGGCT
G S K I T R W I Q R P Q T .....
G S K I T R W I Q R P Q T K P F S K R S K V H F V C V G S Q G L
2523   TTCAAGAATCACTTCATCTCCATTTACCCCTGAAGCTGCAATACCATGGGGGTGTTGGTGTGCTGTGACTTGTGAAGAGGCTGCTAAGCAGATAAG
S R I T S S P F H P E S C N T M G V L V I V T C *
2620   TGCATTAGTGAAGATTTATTATATTGAGAGATTCAAAGGGTGATAGGCTAAAGCTAATTGATGAACATTGCCCTACCAAATAAATAAACCTTACA
.....
2717   GTGAAGTGTCTTGTGGGCCATTTGGCCAGTGGCTATGTACAATACGGGAACCCCAAGCAAAAACCTCAAGGCCAGGGAAGGTACACAGTTAGCTG
.....
2814   GAACTTCAGATCTCAGGCTGACTTCTTAAGCAAGGCCATGAGACAAGTCAGATAAATACTCATTGAAGAGGAATTTATACATGCTGAAATGTAA
.....
2911   GAACACAGTTAATTTTCTAAAATAGCCCTGCATTAACACAAATGATAAAAATTAAGGAATTTTATAGATTACTGAAAGTATGAGCTGTGTTTTCT
.....
3008   TCCTTAAGTGAAGTGGCTTCCACTGATGGATTCTTCTGACCAATTCCTTTTAGGACAATGGCAAAAATACAGACAAGAAGGCATACTATATGGC
.....
3106   CTAACCCAGACTGAATCAATGATCTTGGTCTCATTAAATAACAGTACTTTTTATGATGCTATAACAAGAATTTATCACCATGTTCTTAACCAATA
.....
3203   TCTACTTATATTACAGCTTACCTATTAACACAAAAAAGACTGACGATGTTTCTACCAATATGGCAGAAAATGTTCAACTGACAGCTTTTCAG
.....V P I K H K K R T D D V F L P N M A E N V Q L T A F Q
3300   GTTCAAACAGCTCCATCCAGATTTCCATTTAGAGCTGACTGGTGTGATATCTTCTTTTCCAACTTTATTTCTATGATATTGAAATGAATAAAA
V Q T A P S R F P F R A D W *
3397   ATGACTCCAATGCC

```

**Abb. 4.10: cDNA-Sequenz und codierte Aminosäuresequenz des Gens LUMA.** Die Gesamt-cDNA (Exon 1-16) besitzt eine Länge von 3410 bp. Das Start-Codon liegt bei Nukleotid 1252 in Exon 7 (rot unterlegte Sequenz). Durch alternatives Spleißen entstehen 3 verschiedene Carboxy-terminale Protein-Isoformen. LUMA-15A (in roter Schrift dargestellte Carboxy-terminale Aminosäuresequenz) beinhaltet die gesamten Aminosäuresequenz des Exons 15, LUMA-15B (in blauer Schrift dargestellte Carboxy-terminale Aminosäuresequenz) ist durch eine Teildeletion von Exon 15 charakterisiert und LUMA-16A (in grüner Schrift dargestellte Carboxy-terminale Aminosäuresequenz) entsteht durch eine verlängerte Nukleotidsequenz des Exons 16. Die fettgedruckte Nukleotidsequenz repräsentiert das Polyadenylierungssignal. STOP-Codons sind gelb markiert. Exon-Exon-Übergänge oder alternative Exon-Exon-Übergänge sind durch Unterstreichen markiert.



**Abb. 4.11: Organisation des humanen *LUMA*-Gens.** Die Boxen repräsentieren Exons und die Linien Introns. Grau unterlegte Boxen zeigen Exons, die alternativ gespleißt werden. Die Exons 11 und 12 bzw. 11, 12 und 13 können in Kombination gespleißt werden. Die *LUMA*-codierende Region liegt zwischen dem ATG Start-Codon im Exon 7 und den STOP-Codons TAA in Exon 15B, TGA in Exon 16A oder TGA in Exon 16B. Der 5'UTR umfasst eine Länge von 1251 bp. Der 3'UTR variiert je nach STOP-Codon. Die Größen der Exons sind wie folgt: Exon 1, 446bp; Exon 2, 230 bp; Exon 3, 139 bp; Exon 4, 121 bp; Exon 5, 148 bp; Exon 6, 110 bp; Exon 7, 150 bp; Exon 8, 54 bp; Exon 9, 168 bp; Exon 10, 153 bp; Exon 11, 132 (135) bp; Exon 12, 153 bp; Exon 13, 210 bp; Exon 14, 121 bp; Exon 15A, 128 bp; Exon 15B, 76 bp; Exon 16A, 874 bp; Exon 16B, 123 bp.

#### 4.7.5 Sequenzkonservierung und Homologien zu anderen Organismen

Um festzustellen ob Homologien zu humanen Genen (paraloge Gene) oder Genen anderer Spezies (orthologe Gene) bestehen, wurden BLAST-Datenbanksuchen mit der *LUMA*-cDNA-Sequenz durchgeführt. Orthologe oder paraloge Gene deuten auf eine Konservierung im Laufe der Evolution und auf funktionell wichtige Sequenzen hin.

Mittels Datenbankanalysen konnten keine zur *LUMA*-Sequenz paraloge Gene identifiziert werden, die das Gen in eine bereits bekannte humane Genfamilie einordnen. Es wurde ein orthologes, murines *LUMA*-Gen identifiziert, das mittels eines „Alignment“ (Programm Bestfit aus HUSAR) von bekannten, murinen ESTs (NCBI, *UniGene Cluster* Mm.228517) und eines genomischen Klons (Genbank-Nummer NT078624) mit der humanen cDNA ermittelt wurde (Abb. 4.12). Von den 3410 bp des humanen *LUMA*-Gens sind 72 % identisch mit dem murinen Gen, das auf Chromosom 10 lokalisiert ist. Die Nukleotidsequenz ist über den gesamten Bereich stark konserviert. Jedoch sieht es so aus, dass es Unterschiede im Grad der Konservierung gibt.



**Abb. 4.12: cDNA-Sequenzvergleich des humanen und murinen LUMA-Gens.** Durch einen Sequenzvergleich (Programm Bestfit aus HUSAR) von bekannten, murinen ESTs (NCBI, *UniGene Cluster* Mm.228517) und eines murinen embryonalen Klonen (Genbank-Nummer NT078624) mit der humanen, 3410 bp umfassenden cDNA wurde ein orthologes, murines Gen ermittelt. Nukleotide, die sowohl im humanen als auch im murinen Gen identisch sind, sind gelb markiert.

Der identifizierte ORF des Maus-Gens zeigt einen hohen Grad an Sequenzübereinstimmung zu dem humanen offenen Leserahmen. Anhand des ORF des Maus-Gens wurde ein murines LUMA-Protein abgeleitet. Das potentielle murine Protein besitzt im Vergleich zum humanen Protein eine um 49 Aminosäuren verlängerte Sequenz im N-Terminus des Proteins, die durch ein bereits vorgeordnetes 5'-lokalisierendes Start-Codon entsteht (Abb. 4.13). Von den 491 Aminosäuren des murinen LUMA-ORF sind 62 % identisch mit dem humanen LUMA-Protein (LUMA-15A). Konservative Austausche wurden in 13 % der Fälle festgestellt. Dies führt zu einer

Aminosäureähnlichkeit von 75 %, was auf eine starke Konservierung zwischen dem *LUMA*-Genprodukt des Menschen und der Maus hindeutet.

Zudem wurden *LUMA*-orthologe Nukleotidsequenzen in den Organismen *Pan troglodytes* (Schimpanse), *Bos taurus* (Rind), *Canis familiaris* (Hund) und *Rattus norvegicus* (Ratte) identifiziert. Bei Sequenzen von Schimpanse, Rind und Hund handelt es sich um ESTs, von welchen die vollständige Gensequenz noch unbekannt ist (*Pan troglodytes*, Genbank-Nummer: AG052105; *Bos taurus*, NCBI *UniGene Cluster*: Bt.12607 (4 ESTs); *Canis familiaris*, Genbank-Nummer: BU748138, BU747550, BU748137, BU747549 (4 ESTs)). Die *LUMA*-orthologe Sequenz in der Spezies Ratte wurde auf einem genomischen Klon identifiziert (*Rattus norvegicus*, Genbank-Nummer: AC129792). Aufgrund fehlender Sequenzinformation sind Aussagen über mögliche offene Leserahmen und Aminosäure-Sequenz-Homologien bei diesen Spezies noch nicht möglich.

```

LUMA_Human  ~~~~~MARECSNFETYSMCYEHVLHHRQLRSQKEQ
LUMA-Mouse  MKENFSVMRPQIVERFVQRLMEDSQDDGPKITFRREHLEACILSLGCDVMARERSNFETYSMCYEHILQHTRQKLSQKEQ

LUMA_Human  ELDATQRGGQPPEDSAGQ IAELSHDMIMEITTLRAQLTDLEEVNLNKKQIRKEVQEEYEALVRLAFETCLHIKEKLDN
LUMA-Mouse  EVDLLRRSQVPSDECAGQ VAELSHDMIMEITALRAQLTDLEEVNLNKKQIRKEVQEEYRELVAALFLTCLRIKEKLDEN

LUMA_Human  QLNLIQKVCELIGEVRTGIDNMKDLKKKWCASPDGEMKENPAKQEQWLWALEQDNCS.LANLVCKVRSRSLGRWRLAVQQAC
LUMA-Mouse  QFNLIQKVCELIGEVRAEGIANVKQLKKTWGSARPDEETKENTAK.EQLCALEQEHSSSTLAALLCKARSLGRWRLAVQQA

LUMA_Human  FQAQLSRTEKESIQSKKEYLRIKLMAEREVGLFRQQVLALRQALARAQADSARMWKQDQSQAQLLKELEHRVTQEALTQQQ
LUMA-Mouse  LRGQLSRAEMESILSKKECLRILKMAEQEAALLHQQLLAARQALTKAQTDNKLRQNDTQAQLLRELEHRVTQDSVTRQQ

LUMA_Human  LHFMTSRMEKLLLEDVQGKEQQLQLSKEAERASKLQGLQKKMRDLHQMRSLAQERSVKLDALQRAEELQGLHDAQR
LUMA-Mouse  LDIIKTSGMKLLKDVEQKEQKLQLLTEEAERASKRGLQKKMDRDLQMRNRLAQERSVKLDAFQRVQELQSQLYDIQW

LUMA_Human  SAVPMGSSGSLISQAQYSPTASSTSSRYSQQRFLKTNLKGSKITRWIQRPTVPIKHKKRTDDVFLPNMAENVQLTAFQVQ
LUMA-Mouse  PSVQMGSFVGLRSQTHCSLSSASTLSRHPHHHFSKTHFVGSKMTRRIQRPKTVPVKHNRRIEDGSLPSVKENVQLTTFQAA

LUMA_Human  TAPSRF PFRADW
LUMA-Mouse  QLHLGF I~~~~

```

**Abb. 4.13: Proteinsequenzvergleich des humanen und putativen murinen LUMA-Proteins.** Identische Aminosäuren sind gelb, konservative Aminosäuren-Austausche grau markiert. Dargestellt ist das humane LUMA-15A Protein.

#### 4.7.6 Ansätze zur Funktionsanalyse

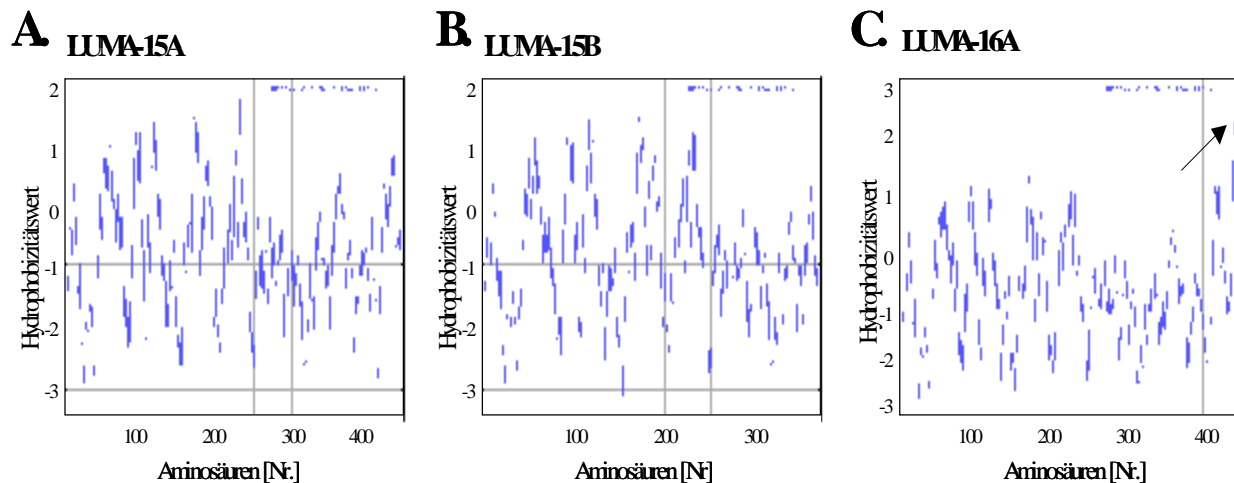
Ein Ansatz zur Funktionsanalyse eines unbekanntes Gens besteht in der Suche nach Homologien in Nukleinsäure- oder Proteindatenbanken. Wenn Homologien zu anderen Sequenzen festgestellt werden, so kann ein neues Gen ein Homolog eines bereits in einer anderen Spezies bekannten Gens sein. Es kann auch ein Mitglied einer humanen Genfamilie sein, oder Teile der Sequenz können zu funktionellen oder strukturellen Domänen bekannter Proteine homolog sein.

Die in den Datenbanken identifizierten orthologen LUMA-Nukleotid-Sequenzen in Maus, Ratte, Schimpanse, Rind und Hund (vgl. 4.7.5) bzw. die ermittelte murine Aminosäuresequenz ergaben keine Hinweise auf eine mögliche Protein-Struktur oder Funktion. Mittels BLAST-Analysen in Proteindatenbanken mit den LUMA-Aminosäuresequenzen der Protein-Isoformen LUMA-15A, LUMA-15B und LUMA-16A konnten erstaunlicherweise keine signifikanten Übereinstimmungen mit bekannten humanen Proteinen hergestellt werden.

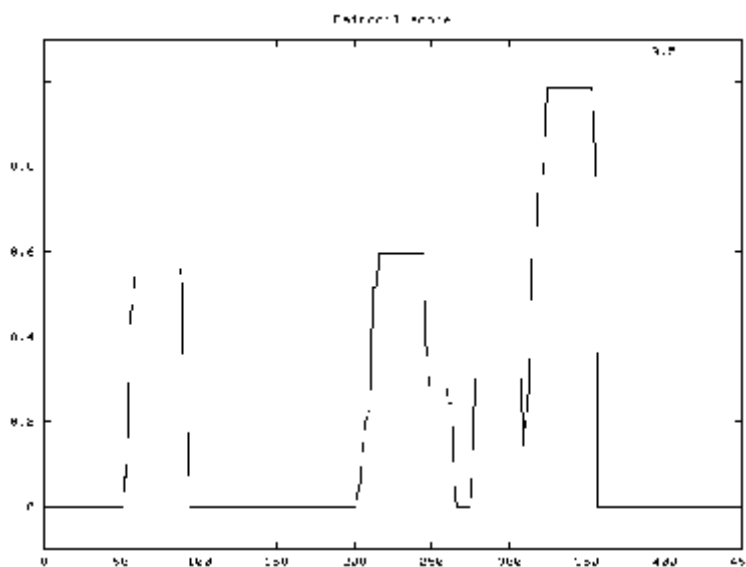
Um Hinweise auf eine mögliche Funktion der humanen LUMA-Proteine zu erhalten, wurde anhand von Vorhersageprogrammen versucht, strukturelle Protein-Motive oder –Domänen zu identifizieren. Die Analyse wurde hierbei für die verschiedenen Carboxy-terminalen Protein-Isoformen durchgeführt. Die LUMA-Proteine wurden als lösliche Proteine vorhergesagt. Es wurden weder Konsensussequenzen für Signal-Peptide noch für Transmembran-Domänen detektiert. Zusätzliche Hinweise auf mögliche Transmembran-Domänen gibt die Verteilung von hydrophoben Aminosäuren an. In Hydrophobizitäts-Analysen nach Kyte und Doolittle (Kyte und Doolittle, 1982) wurden die drei identifizierten Carboxy-terminalen LUMA-Protein-Isoformen miteinander verglichen (Abb. 4.14). Die Protein-Isoformen LUMA-15A, welche die gesamte Exon 15-Sequenz umfasst, und LUMA-15B, die durch eine partielle Deletion von Exon 15 charakterisiert ist, wiesen keine stark hydrophoben Regionen auf. Für LUMA-16A hingegen, charakterisiert durch eine verlängerte Sequenz des Exon 16, wurde im C-Terminus eine hydrophobe Region detektiert, die eine Transmembran-Domäne darstellen könnte. Im Protein-Bereich, der bei allen Protein-Isoformen identisch ist, wurden keine signifikant hydrophoben Aminosäurebereiche detektiert.

Mittels des COILS Algorithmus (Berger *et al.*, 1995) wurden die LUMA-Proteine auf potentielle Coiled-coil-Regionen untersucht. Hierbei wurden drei Coiled-coil-Strukturen identifiziert, die in den verschiedenen Protein-Isoformen LUMA-15A, LUMA-15B, LUMA-16A übereinstimmten und mit Wahrscheinlichkeiten zwischen 0,56 und 1 vorhergesagt wurden (Abb. 4.15). Superspiralisierte Coiled-coil-Motive können sowohl die Bildung von homo- als auch heterooligomeren Proteinkomplexen vermitteln und bestehen aus 2-5  $\alpha$ -Helices, die sich in paralleler oder antiparalleler Weise aneinander lagern. Proteine mit diesem vielseitigen Motiv können in Signal-Transduktions- und Bewegungsprozesse oder in die mechanische Stabilität von Zellen involviert sein (Burkhard *et al.*, 2001).

Über die genaue Funktion der LUMA-Proteine lassen sich keine weiteren Aussagen machen. Hierzu müssen funktionelle Analysen durchgeführt werden.



**Abb. 4.14: Vergleichende Hydrophobizitätsverteilungs-Analyse von LUMA-Protein-Isoformen.** Dargestellt ist die Verteilung der hydrophoben Aminosäuren in den drei Carboxy-terminalen LUMA-Protein-Isoformen berechnet nach Kyte und Doolittle (Kyte und Doolittle, 1982). A.) LUMA-15A. B.) LUMA-15B. C.) LUMA-16A. Die Protein-Isoformen LUMA-15A und LUMA-15B weisen ähnliche Hydrophobizitätsverteilungen und keine stark hydrophoben Aminosäurebereiche auf. Die Protein-Isoform LUMA-16A zeigt eine hydrophobe Region im C-Terminus, die durch eine Pfeil markiert ist.



**Abb. 4.15: Coiled-coil-Regionen in LUMA-Protein-Isoformen.** Dargestellt sind die vorhergesagten  $\alpha$ -helikalen Coiled-coil-Regionen für die Protein-Isoform LUMA-15A nach Berger (Berger *et al.*, 1995). Für die Protein-Isoformen LUMA-15A, LUMA-15B und LUMA-16A wurden identische Coiled-coil-Strukturen vorhergesagt. Die Wahrscheinlichkeiten für Coiled-coil-Regionen, die auf der y-Achse angegeben sind, liegen zwischen 0,56 und 1.

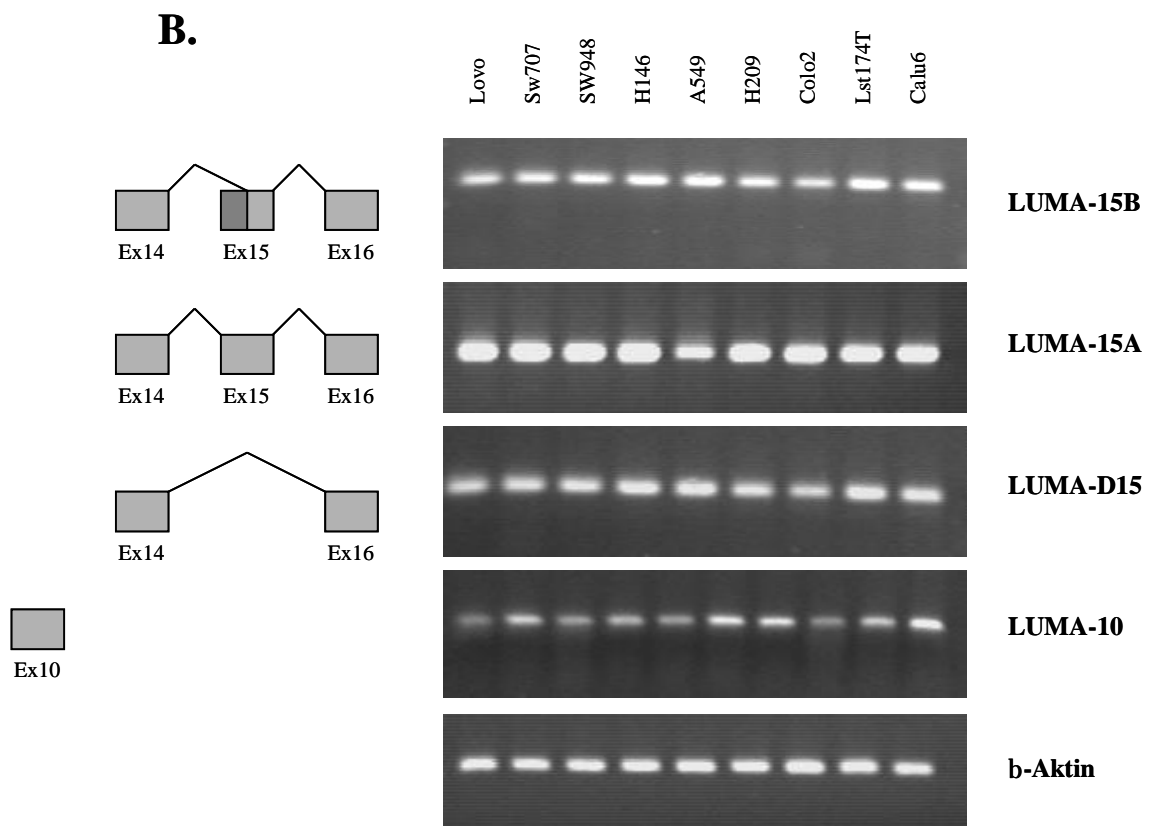
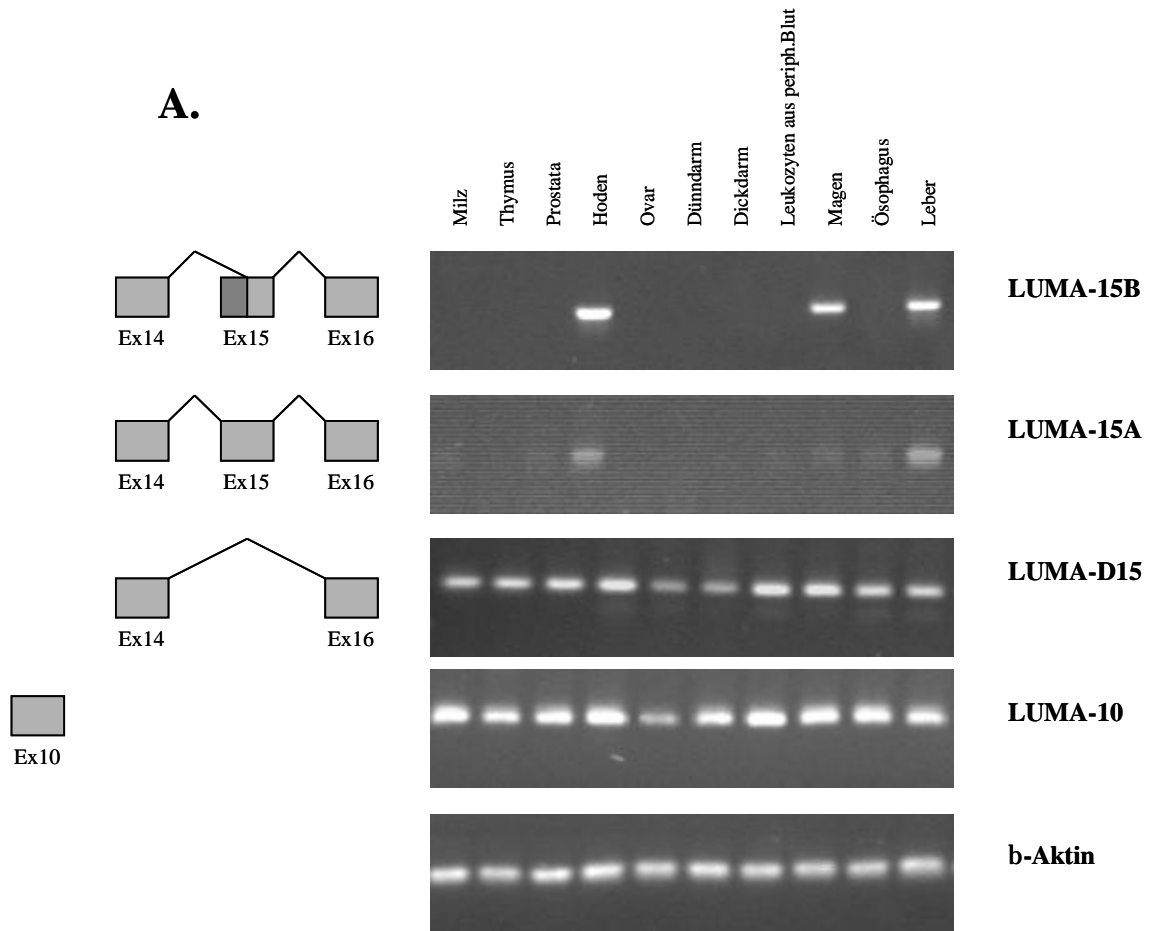
#### 4.8 Bestimmung gewebeübergreifender und spleißing-spezifischer LUMA-RNA-Expressionsprofile

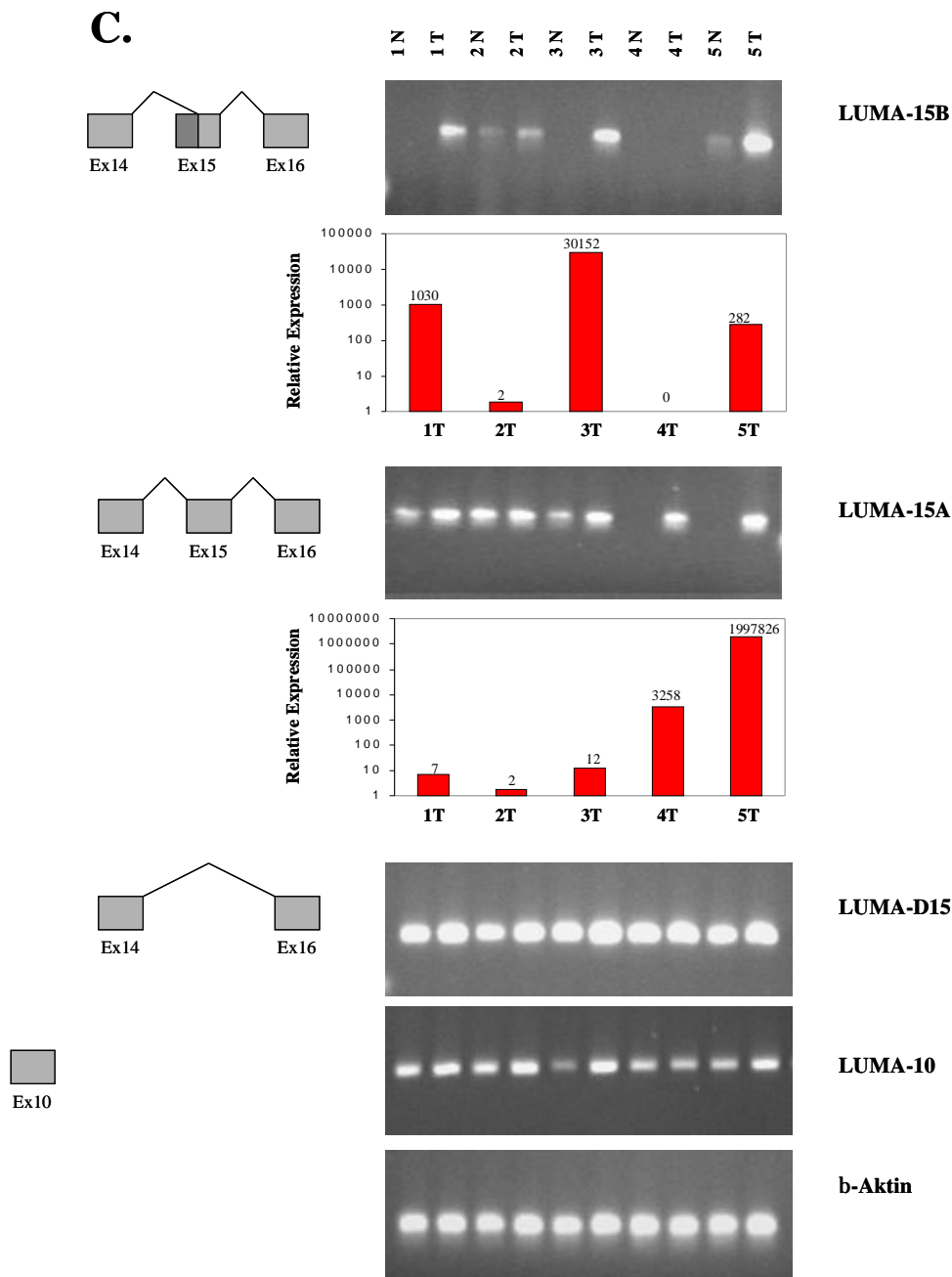
Zur weiteren Charakterisierung des Gens *LUMA* wurden RNA-Expressions-Analysen mit humanen Geweben, Tumor-Zelllinien sowie mit Lungen-Tumor- (Adenokarzinom) und korrespondierenden Normalgeweben durchgeführt.

Die Überexpression von *LUMA* in Lungen-Adenokarzinomen, die in der quantitativen Real-Time-PCR-Analyse nachgewiesen wurde (vgl. 4.5), wurde mit Primern detektiert, die den Bereich von Exon 15 einschließen. Da jedoch verschiedene alternative Spleiß-Varianten dieses Exons identifiziert wurden, war zu überprüfen, ob es sich bei der tumorspezifischen Überexpression um einen generellen Mechanismus des Gens handelt, oder ob dieser Spleiß-Varianten-spezifisch erfolgt. Durch die Auswahl von Primern, die spezifisch eine bestimmte Spleißvariante detektieren, konnte zwischen der Expression verschiedener *LUMA*-Transkripte diskriminiert werden. Für die Expressions-Analyse wurden alle Spleiß-Varianten des Exon 15 untersucht, da in diesem Bereich bereits die differentielle Expression in Lungen-Tumoren detektiert wurde. Es wurden spezifische Primer für die Spleiß-Variante *LUMA-15A*, welche die gesamte Exon 15 Sequenz umfasst, für die durch eine partielle Deletion von Exon 15 charakterisierte Spleiß-Variante *LUMA-15B*, und für ein *LUMA*-Transkript, das durch eine gesamte Deletion des Exons 15 charakterisiert ist (*LUMA-D15*, (D=Deletion)) ausgewählt (Abb. 4.17). Zudem wurden Primer, die einen in jeder Spleiß-Variante enthaltenen, konservierten Bereich des Genes in Exon 10 (Spleiß-Variante *LUMA-10*) abdecken, ermittelt (Abb. 4.17).

Die Expressionsprofile dieser *LUMA*-Spleiß-Varianten wurden mittels quantitativer Real-Time-PCR in 11 verschiedenen Normalgeweben (Abb. 4.16A), in 9 Zelllinien (Abb. 4.16B) und in 5 Lungen-Tumor- (Adenokarzinom) und Normalgewebepaaren (Abb. 4.16C) analysiert. Zur Normalisierung der eingesetzten RNA-Menge wurde bei jeder Real-Time-PCR das „House-keeping“-Gen  $\beta$ -Actin und als Negativkontrolle ddH<sub>2</sub>O mitgeführt. Die amplifizierten *LUMA*-Transkripte wurden auf einem Agarosegel analysiert. Die relative Expression in den Tumor-Patientenproben im Vergleich zur entsprechenden Probe des Normalgewebes wurde wie unter 3.7.4 beschrieben berechnet.







**Abb. 4.16: Vergleich der Expressionsprofile von LUMA Spleiß-Varianten.** Vergleichende Expressions-Analyse der Spleiß-Varianten *LUMA-15A*, *LUMA-15B*, *LUMA-D15*, *LUMA-10*. Die mittels Real-Time-PCR amplifizierten Produkte mit einer Größe zwischen 100 und 150 Basenpaaren wurden auf einem 2 %igen Agarosegel analysiert. Zur Normalisierung der eingesetzten RNA-Menge wurde das „House-keeping“-Gen  $\beta$ -Aktin mitgeführt. Folgende Primerkombinationen wurden eingesetzt: *LUMA-15A*: L-5364.3/L-5365, *LUMA-15B*: L-5365.4/L-5365.1, *LUMA-D15*: L-5364.46/L-5365.1, *LUMA-10*: L-63369F/L-5365.31.

A.) Expressionsprofil der Spleiß-Varainten in 11 humanen Normalgeweben. B.) Expressionsprofil der Spleiß-Varianten in 9 Tumor-Zelllinien. C.) Expressionsprofil der Spleiß-Varainten in 5 Lungen-Tumor- (Adenokarzinom) und den korrespondierenden Lungen-Normalgeweben. Mit (T) sind Tumorgewebe, mit (N) Normalgewebe bezeichnet. Gleiche Nummern bezeichnen Gewebe aus demselben Patienten. Für *LUMA-15A* und *LUMA-15B* ist die relative Expression dargestellt, welche die Normalisierung auf das „House-keeping“-Gen  $\beta$ -Aktin und auf die Expressionsdaten der Normalgewebe beinhaltet. Die Höhe der Säulen gibt die relative Genexpression im Tumor im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe im logarithmischen Maßstab an. Jede Säule repräsentiert eine Tumorprobe.

```

      Exon 10  @ Primer L-63369F TTGATCCAGAAAGTGTGTGAGC
5'-
... AGGAGAAGCTGGATGATAATCAGCTTAATTTGATCCAGAAAGTGTGTGAGCTCATCGGTGAAGTGAGAACAGAAAGGATTGACAATATGAAGGACCTAAAGAAAAAATGGTCTCTGCCAGCC
|||||
5'-
... TCTCTTCGACCTACTATTAGTCGAATTAACATAGGTCTTTCACACACTCGAGTAGCCACTTCACCTCTTGCTTCCCTAACTGTTATACTTCTCGGATTTCTTTTACCACGAGACGGTCCGG
                                                                Primer L-5365.31

TTTTTACCACGAGACGGTCCG

      Exon 11
CCGATGAAGGAATGAAAGAAAACCCAGCCAAAC.....
..
|||||
GGCATCTTCTTACTTTCTTTGGGTCGGTTTG.....

      @ Primer L-5364.4 CTCGTCAGGCG.....ATACTCCC
      @ Primer L-5364.46 TCAGGCG
.....
      @ Primer L-5364.3 CTCGTCAGGCGACCTTATATC

.. Exon 14      Exon 15A      Exon 15B
...CGATCCCAGCGGTGAGTGTCCCATGGGTCGTCAGGCGACCTTATATCCCAGGCTCAACTACTCCCAACTCTGCTTCCACATCATCCGATACTCCAGCAACCGTTTTTAAAGACTAAT
CT

|||||
...GCTACGGTCCGAGTCGACAGGGTACCAGCAGTCCCTGGAATATAGGTCCGAGTTATGAGGGTTGAAAGACGAAGGTGTAGTAGTCTATGAGGGTCTGCGAAAAATTTCTGATTA
GA

.....GTACCTATTAAACAC
      Exon 16B
CAAAGGCAGTAAAAATAACAAGATGGATTCAAAGGCCACAGACTTGTACCTATTAAACACAAAAAAGAAGTACGACATGTTTTCTACCCAATATGGCAGAAAATGTTCAACTGACAGCTTTTCAGGTT
CA
|||||
GTTCCCGTCATTTTATGTTCTACCTAAGTTTCCGGTGTCTGACATGGATAAATTTGTGTTTTTTCTTGACTGCTACAAAAGGATGGGTTATACCGTCTTTTACAACCTTGACTGTGCGAAAAGTCCAA
GT

                                                                Primer L-5365 CCGTCTTTTACAACCTTGACTGT

AACAGCTCCATCCAGATTCCCATTTAGAGCTGACTGGTGATGATA....-3'
|||||
TTGTCGAGGTAGGTCTAAGGTAATCTCGACTGACCACTACTAT....-3'
- Primer L-5365.1 GGGTAAATCTCGACTGACCAC

```

**Abb. 4.17: Ausschnitt der LUMA-Nukleotidsequenz mit Lokalisation der Primer.** Der Ausschnitt der Nukleotidsequenz umfasst die Bereiche, in denen Primer lokalisiert sind, die zur Expressions-Analyse eingesetzt wurden. Die Primer wurden so ausgewählt, dass sie verschiedene alternative Spleiß-Varianten detektieren. Pfeile geben die Orientierung der Primer an. Dargestellt sind Exon 10 bis Exon 11, Exon 14 (3'-Bereich), Exon 15, Exon 16B (5'-Bereich). Exon-Exon-Übergänge sind durch fettgedrucktes Unterstreichen markiert.

Die Spleiß-Variante *LUMA-10*, die einen konservierten Bereich des Gens abdeckt, zeigte eine ubiquitäre Expression in Normalgeweben sowie in Zelllinien, Lungen-Tumor- und Normalgewebepaaren. Die ubiquitäre Expression in Normalgeweben korreliert mit den Ergebnissen der Northern Blot Hybridisierung, bei der die Sonde den entsprechenden konservierten Gen-Bereich (Exon 9-10) abdeckte. Die Spleiß-Variante mit einer Deletion von Exon 15 (*LUMA-D15*) zeigte ebenso eine Expression in allen getesteten Normalgeweben, Zelllinien und Lungen-Tumor- und Normalgewebepaaren.

Im Gegensatz hierzu sind die Spleiß-Varianten *LUMA-15A* und *LUMA-15B* durch ein differenziertes Expressionsprofil charakterisiert. Für beide Transkripte wurde eine Expression in allen getesteten Tumor-Zelllinien sowie Lungenkarzinomen detektiert. In Normalgeweben hingegen wurde eine auf wenige Gewebe beschränkte Expression nachgewiesen. *LUMA-15A* wird lediglich in Hoden, Magen und Leber exprimiert, *LUMA-15B* in Hoden und Leber. Sehr

schwache Signale wurden für *LUMA-15B* in Prostata, Magen und Ösophagus detektiert. In Paaren von Lungen-Tumor- und Normalgeweben zeigten beide alternative Exon 15 Spleiß-Varianten eine differentielle Genexpression. Im Vergleich von Lungen-Adenokarzinomem und den korrespondierenden Normalgeweben war *LUMA-15A* in 4 von 5 Paaren im Tumor signifikant überexprimiert (mindestens 7-fach), in 2 Normalgeweben zeigte sich keinerlei Expression. *LUMA-15B* war in 3 von 5 Lungen-Tumoren überexprimiert (mindestens 280-fach). In 3 Normalgeweben war keine *LUMA-15B*-Expression detektierbar.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass einige *LUMA*-Transkripte ein breites Expressionsmuster aufweisen und sowohl in Normal- als auch in Tumorproben exprimiert werden. Die Spleiß-Varianten *LUMA-15A* und *LUMA-15B* jedoch weisen eine tumorspezifische Überexpression auf. Es konnte somit gezeigt werden, dass nicht das gesamte Gen tumorspezifisch überexprimiert ist, sondern dass die differentielle Expression spezifisch für die Spleiß-Varianten *LUMA-15A* und *LUMA-15B* ist. Alternatives Spleißen von Exon 15, welches in 3 verschiedenen Formen präsent sein kann -als ganzes Exon, ebenso wie teildeletiert oder ganz deletiert- führt zu differenzierten und sehr unterschiedlichen *LUMA*-Expressionsprofilen.

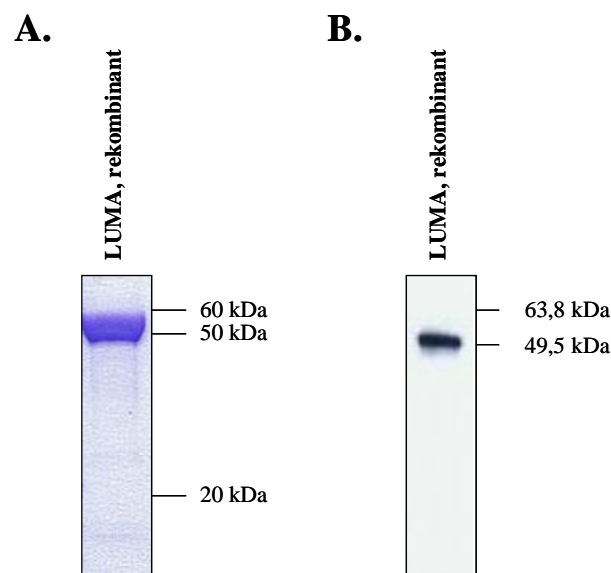
## 4.9 Expressionsanalyse von LUMA-Protein-Isoformen

### 4.9.1 Rekombinante Expression von *LUMA*

Um die Spezifität von generierten Antikörpern zu überprüfen, wurde das *LUMA*-Protein rekombinant hergestellt.

Mittels Long-Range-PCR wurde ein *LUMA*-Transkript amplifiziert, das den zu diesem Zeitpunkt bekannten Genbereich von Exon 9 bis Exon 16B beinhaltet. Als Expressionsvektor diente hierzu das Plasmid pTrcHis2-TOPO, welches das Protein als Histidin-getagtes Fusionsprotein exprimiert und so die Aufreinigung über eine Nickel-Säule ermöglicht. Zur Expression wurden *E. coli* TOP10 mit dem Vektor pTrcHis2-TOPO-*LUMA* transformiert. Durch einen Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *NcoI* wurden die Expressionsklone auf das klonierte *LUMA*-Insert überprüft. Das Enzym *NcoI* schneidet sowohl den Vektor pTrcHis2-TOPO als auch das *LUMA*-Insert einmal. Hierdurch entstanden bei einer erfolgreichen Klonierung des Inserts zwei Fragmente mit der Größe von 4647 bp (4381 bp Vektor + 266 bp Insert) und 896 bp (Insert). Ein mittels Restriktionsverdau und anschließender Sequenzierung bestätigter Expressionsklon, bei dem es sich um die Spleiß-Variante *LUMA*-

LUMA handelte, wurde in LB-Medium angezogen und die Protein-Expression mit IPTG induziert. Das rekombinante Protein wurde über eine HPLC-Anlage aus der unlöslichen Proteinfraction („*inclusion bodies*“-Fraktion) aufgereinigt. Der Reinheitszustand des Proteins wurde durch SDS-PAGE überprüft (Abb. 4.18). Es zeigte sich sowohl in der Coomassie-Färbung als auch im Western Blot bei dem erwarteten Molekulargewicht von 48,8 kDa eine Bande. Der Western Blot Nachweis wurde mit einem monoklonalen Antikörper, der spezifisch das Histidin-Tag bindet, durchgeführt.



**Abb. 4.18: Aufgereinigtes, rekombinantes LUMA-Protein (LUMA-15A).** 1  $\mu\text{g}$  über HPLC aufgereinigtes, rekombinantes Protein wurden in 2 x Lämmli-Probenpuffer für 5 min bei 95°C und 800 rpm inkubiert und auf einem 4-20 %igen Gradientengel mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

A.) Coomassie Brilliant Blue Färbung. Größenmarker: Bench Mark™ Protein Ladder (Gibco BRL/Invitrogen). B.) Western Blot. Rekombinantes Protein wurde vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und im Western Blot mit anti-Histidin-Tag-Primärantikörper, einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper und mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen. Größenmarker: Prestained Bench Mark™ Protein Ladder (Gibco BRL/Invitrogen).

#### 4.9.2 Generierung polyklonaler und monoklonaler LUMA-Antikörper

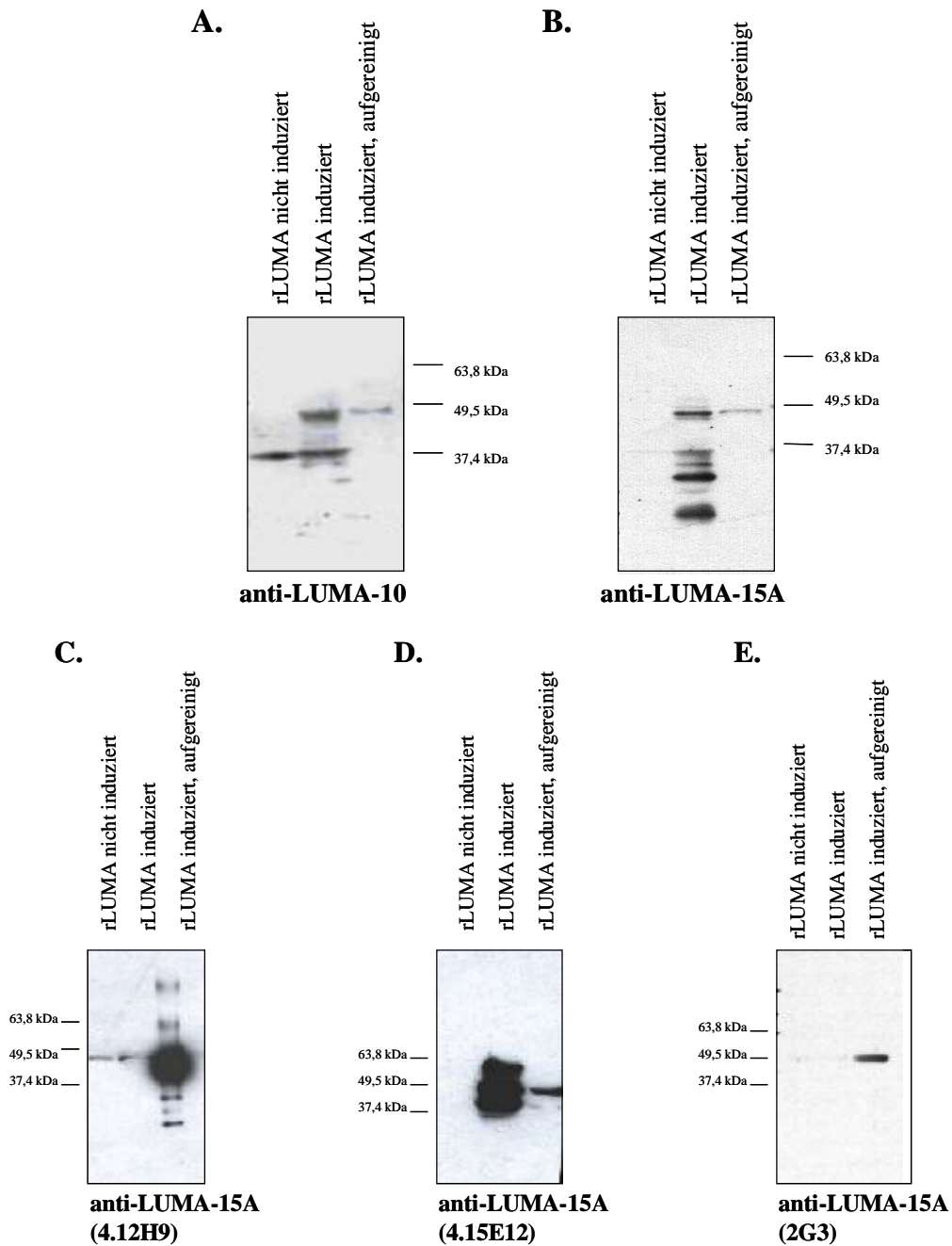
Um das LUMA-Protein und dessen intrazelluläre Lokalisation nachzuweisen, und um dessen Expression in Lungentumoren anhand von immunhistochemischen und -zytochemischen Färbungen zu untersuchen, wurden polyklonale und monoklonale LUMA-Antikörper generiert. Zur Herstellung der Antikörper wurden Kaninchen bzw. Mäuse mit Peptiden immunisiert, die von der LUMA-Aminosäuresequenz abgeleitet wurden. Ziel war es, nach der detektierten tumorspezifischen Überexpression auf RNA-Ebene, die Translation von LUMA-Protein-Isoformen in Hinsicht auf Tumorspezifität zu analysieren.

Da die Expressionsanalysen für die Transkripte *LUMA-15A* und *LUMA-15B* eine tumorspezifische Überexpression aufwiesen, kamen die davon codierten Epitope für die Antikörpergenerierung in Frage. Für den spezifischen Nachweis der Protein-Isoform LUMA-15B konnte kein Peptid zur Immunisierung identifiziert werden, da sich diese Protein-Isoform in lediglich 6 Aminosäuren von LUMA-15A unterscheidet, und diese Aminosäuren keine antigenen Bereiche enthielten. Für die Spleiß-Variante *LUMA-15A* hingegen, wurde ein entsprechendes spezifisches Peptid zur Immunisierung von Kaninchen und Mäusen ausgewählt (Peptid 1). Zusätzlich wurden Kaninchen mit einem Peptid (Peptid 2) immunisiert, bei dem es sich um ein Epitop handelt, das in jeder Protein-Isoform konserviert ist (Exon 10). Ziel war es, die kodierenden Protein-Isoformen der in den RNA-Expressionsanalysen detektierten Spleiß-Varianten-spezifischen Transkripte mittels spezifischer Antikörper nachzuweisen und zu analysieren, ob und welche Korrelation zwischen Transkription und Translation des *LUMA*-Gens besteht.

Um den Antikörper-Titer zu testen, wurden Blutproben der Kaninchen und Mäuse nach der 2. Immunisierung (49. Tag nach der Erst-Immunisierung) im Peptid-ELISA und Western Blot auf rekombinantem Protein getestet. Nach der 4. Immunisierung (ca. 73. Tag nach der Erst-Immunisierung) erfolgte das Ausbluten der Kaninchen und die anschließende Aufreinigung der polyklonalen Antiseren.

Monoklonale Antikörper wurden hergestellt, indem nach der 4. Immunisierung den Mäusen die Milzen entnommen wurden und die Milzzellen mit Myelomzellen fusioniert wurden. Hybridom-Zellüberstände wurden im Peptid-ELISA auf Antikörperproduktion gescreent (1. Screening). Als Negativkontrolle wurde Peptid-ELISA Platten, die mit einem unspezifischen Peptid (Dipeptidase, keine Sequenzähnlichkeit zum LUMA-Peptid) beschichtet wurden, verwendet. Nach zwei weiteren Wochen wurden positive Hybridome erneut im Peptid-ELISA (2. Screening) auf Stabilität und Spezifität getestet. Positive Hybridome wurden isotypisiert, rekloniert und die so erhaltenen, klonalen Populationen einem 3. Peptid-ELISA Screening unterzogen. Anschließend wurden die spezifischen Antikörper aus den Hybridom-Zellüberständen aufgereinigt.

Aufgereinigte polyklonale und monoklonale Antikörper wurden im Peptid-ELISA und in Western Blot Analysen auf Spezifität getestet (Abb. 4.19). Bei jeder Western Blot Analyse wurde zur Kontrolle eine Membran mit anti-His-Tag-Primärantikörper mitgeführt. Die polyklonalen Antikörper wurden mit „anti-LUMA-10“ und „anti-LUMA-15A“, monoklonale Antikörper wurden mit „anti-LUMA-15A“ und der jeweiligen Klonnummer bezeichnet.



**Abb. 4.19: Nachweis der Spezifität von aufgereinigten polyklonalen und monoklonalen LUMA-Antikörpern.** 1  $\mu$ g rekombinantes, aufgereinigtes LUMA-Protein (rLUMA induziert) und aufgereinigtes rekombinantes Protein (rLUMA induziert, aufgereinigt) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Als Negativkontrolle wurde Bakterienlysate aufgetragen, bei dem die Proteinexpression nicht induziert wurde (rLUMA nicht induziert). Proteine wurden vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet und im Western Blot mit polyklonalen oder monoklonalen Primärantikörpern in Konzentrationen zwischen 5 und 10  $\mu$ g/ml inkubiert. Alle Antikörper erkennen im Western Blot das rekombinante Protein (rLUMA induziert und rLUMA induziert, aufgereinigt) mit einem Molekulargewicht von 48 kDa. Zusätzliche Banden treten bei der Reaktion der polyklonalen Antikörper (anti-LUMA-10 und anti-LUMA-15A) und des monoklonalen Antikörpers anti-LUMA-15A (4.15E12) mit dem rekombinanten, nicht aufgereinigten Protein (rLUMA induziert) auf. A.-B.) Spezifitätstest der polyklonalen Antikörper anti-LUMA-10 und anti-LUMA-15A im Western Blot. C.-E.) Spezifitätstest der monoklonalen anti-LUMA-15A-Antikörper (4.12H9, 4.15E12, 2G3) im Western Blot.



Die aufgereinigten polyklonalen und monoklonalen LUMA-Antikörper zeigten im Western Blot eine spezifische Reaktion mit dem rekombinanten Protein (rLUMA induziert). Als Negativkontrolle wurde das Bakterienlysate aufgetragen, bei dem keine Proteininduktion erfolgte (rLUMA nicht induziert). Alle Antikörper erkennen das rekombinante, nicht aufgereinigte Protein mit einem Molekulargewicht von 48 kDa. Desweiteren zeigten alle Antikörper, bis auf anti-LUMA-15A (4.12H9), eine spezifische Reaktion mit dem aufgereinigten rekombinanten Protein (rLUMA induziert, aufgereinigt).

Insgesamt wurden 24 im Peptid-ELISA positiv getestete und klonierte monoklonale Antikörper der Subklassen IgG in Western Blot Analysen auf ihre Spezifität überprüft, wovon drei eine spezifische Reaktion zeigten (Abb. 4.19).

Die zur Verfügung stehenden polyklonalen und monoklonalen anti-LUMA-15A-Antikörper wurden anschließend in immunhistochemischen und -zytochemischen Färbungen ausgetestet und in Hinsicht auf Spezifität und Färbeintensität lichtmikroskopisch bewertet. Als Spezifitätskontrolle wurden die Antikörper in einer Peptid-Kompetition mit einem Überschuss an Peptid vorinkubiert, was zu einer vollständigen Reduktion der beobachteten Signale führen soll. Bezüglich Färbeintensität und Spezifität zeigte der polyklonale anti-LUMA-15A-Antikörper die besten Resultate aller generierten anti-LUMA-15A-Antikörper und wurde daher in allen folgenden Färbungen eingesetzt. Auch der polyklonale anti-LUMA-10-Antikörper war spezifisch und wies eine gute Färbeintensität auf.

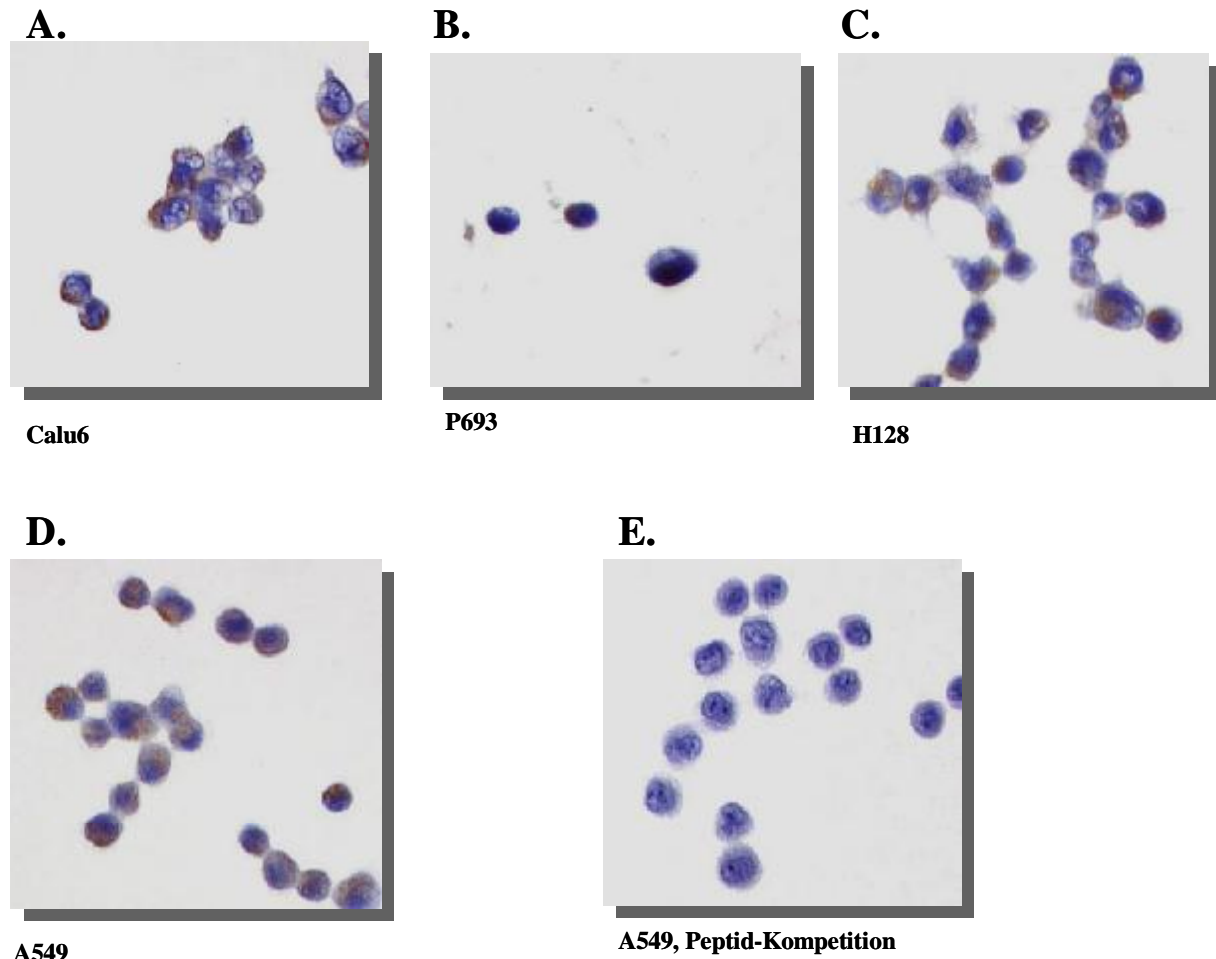
#### **4.9.3 Nachweis und Lokalisation des LUMA-Proteins**

Zum Nachweis des nativen humanen LUMA-Proteins und dessen intrazellulärer Lokalisation wurden immunzytochemische Färbungen an Zelllinien durchgeführt. Hierbei wurden die Lungenkarzinom-Zelllinien Calu6 und A549 (Adenokarzinom), P693 (Plattenepithelkarzinom) und H128 (kleinzelliges Lungenkarzinom) verwendet. Die Färbungen erfolgten mit den hergestellten polyklonalen Antikörpern anti-LUMA10 und anti-LUMA15A, die gegen unterschiedliche Protein-Epitope gerichtet sind. Der Nachweis von spezifischen Bindungen erfolgte mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und DAB als Substrat.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Transkription des *LUMA*-Gens auch zur Translation des Proteins führt. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Protein zytoplasmatisch lokalisiert ist (Abb. 4.20). Dieses Resultat wurde sowohl mit anti-LUMA-10- als auch mit anti-LUMA-15A-Antikörpern erzielt. Desweiteren zeigen die Ergebnisse, dass das Protein nicht nur in Lungen-Adenokarzinom-Zelllinien, sondern auch in einer Lungen-Plattenepithelkarzinom- und



einer Kleinzelligen-Lungenkarzinom-Zelllinie detektiert werden kann. Dies korreliert mit den Ergebnissen der RT-PCR Expressionsanalysen an Tumor-Zelllinien (vgl. Abb. 4.16B).



**Abb. 4.20: Nachweis und Lokalisation des LUMA-Proteins.** Immunzytochemische Färbung an Lungenkarzinom-Zelllinien mit dem polyklonalen Antikörper anti-LUMA-15A, mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper-System Envision und DAB als Substrat. Zellkerne zeigen die blaue Hämatoxin Gegenfärbung. Zytoplasmatische Lokalisation des Proteins in den Zelllinien Calu6 (A.), P693 (B.), H128 (C.), A549 (D.).

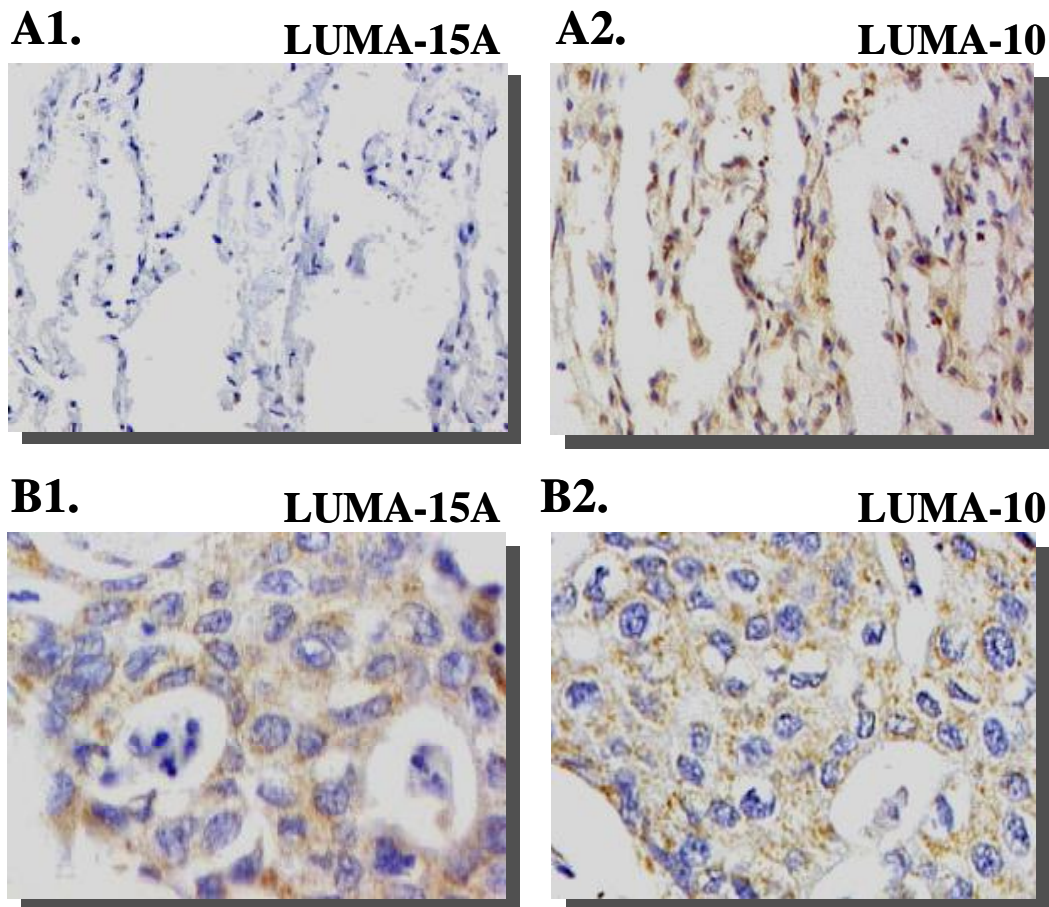
E.) Peptid-Kompetition an A549. Als Spezifitätskontrolle wurden der polyklonale anti-LUMA-15A-Antikörper mit einem 13-molaren Überschuss an spezifischem Peptid (Peptid 1) für 1h vorinkubiert, was zu einer vollständigen Reduktion der Signale führte.

#### 4.9.4 Immunhistochemische Expressionsanalyse der Protein-Isoformen LUMA-10 und LUMA-15A in Lungengeweben

Real-Time-PCR-Analysen hatten gezeigt, dass die Spleiß-Varianten *LUMA-10* und *LUMA-15A* sich bezüglich ihres Expressionsprofils in Lungengeweben stark unterscheiden (vgl. 4.7.7). Mittels immunhistochemischer Färbungen sollte analysiert werden, ob sich die Ergebnisse auch auf Protein-Ebene bestätigen.

Ein Multi-Tissue-Array, der aus Lungenkarzinom- und Normalgeweben besteht, wurde mit den Antikörpern, die spezifisch gegen die Protein-Isoformen LUMA-10 bzw. LUMA-15A gerichtet sind, gefärbt.

Die immunhistochemische Untersuchung der Expression unterschiedlicher Epitope des LUMA-Proteins konnte belegen, dass sich die Expressionsmuster von LUMA-10 (charakterisiert durch einen konservierten, nicht differentiell gespleißten Genbereich) und LUMA-15A (umfasst das ganze differentiell gespleißte Exon 15) auch auf Protein-Ebene unterscheiden. Die Protein-Isoform LUMA-10 konnte in allen getesteten Lungen-Normalgeweben ebenso wie in allen Lungenkarzinomen nachgewiesen werden. Im Unterschied hierzu wurde keine oder eine geringe LUMA-15A-Expression in Lungen-Normalgeweben detektiert. In Lungenkarzinomen wurden hingegen beide Protein-Isoformen nachgewiesen. Die Ergebnisse der RNA-Expressionsstudie, die eine tumorspezifische Überexpression der Spleiß-Variante *LUMA-15A*, hingegen aber ein ubiquitäres Expressionsprofil des Transkriptes *LUMA-10* zeigten, konnten somit auf Protein-Ebene bestätigt werden. Die Transkription der Spleiß-Varianten des Gens führt auch zur Translation der entsprechenden Protein-Isoformen. Abb. 4.21 zeigt den immunhistochemischen Nachweis von LUMA-10 und LUMA-15A in charakteristischen Färbebeispielen.



**Abb. 4.21: Vergleichende immunhistochemische Expressionsanalyse der Protein-Isoformen LUMA-10 und LUMA-15A.** Immunhistochemische Färbung einem Lungen-Adenokarzinom (B1., B2.) und Lungen-Normalgewebe (A1., A2.) mit den polyklonalen Antikörpern anti-LUMA-10 (A2., B2.) bzw. anti-LUMA-15A (A1., B1.) und dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper-System Envision. Der Nachweis spezifischer Protein-Antikörper-Bindungen erfolgte mit DAB, die Gegenfärbung mit Hämatoxylin. In Lungen-Normalgewebe ist eine LUMA-10- aber keine LUMA-15A-Expression nachweisbar (A1., A2.). Im Lungen-Adenokarzinom ist eine Expression von LUMA-10 und LUMA-15A nachweisbar (B1., B2.).

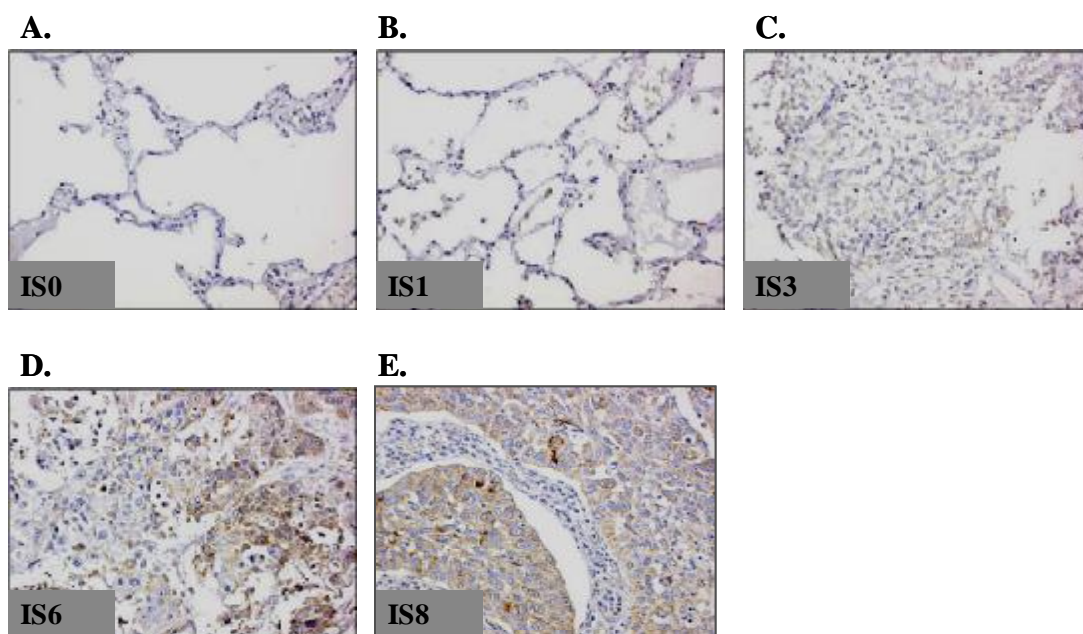
#### 4.9.5 Immunhistochemische Validierung von LUMA-15A als möglicher Marker zur Diagnose von Bronchialkarzinomen

Wie die vorhergehenden immunhistochemischen Analysen gezeigt haben (vgl. 4.7.11), bestätigte sich die Protein-Isoform LUMA-15A aufgrund von tumorspezifischer Überexpression als ein interessanter Kandidat für einen Lungenkrebs-Diagnostik-Marker.

Daher wurde die Expression dieser Protein-Isoform immunhistochemisch an einer größeren Anzahl von Lungengeweben in Form von Multi-Tissue-Arrays untersucht. Hierbei wurde die Analyse nicht nur auf Adenokarzinome beschränkt, sondern es wurde das gesamte Spektrum der Bronchialkarzinome untersucht. Zudem wurden Gewebe von Lungenmetastasen

verschiedener Tumorentitäten analysiert. Die Tumorgewebe repräsentieren die meisten Tumorstadien. Zu allen Lungentumoren und metastasierenden Tumoren wurden die korrespondierenden Lungen-Normalgewebe analysiert. Weitere Lungen-Normalgewebe stammten von gesunden Personen. Desweiteren gingen Gewebeproben von Patienten mit nicht karzinogenen Lungenerkrankungen in die Analyse mit ein.

Alle Gewebe sind auf den Multi-Tissue-Arrays in doppelter Ausführung vorhanden und wurden von einem Pathologen ausgewertet. Die Auswertungen erfolgten nach dem im Methoden-Teil beschriebenen Immuno-Scoring-System. Hierbei wurde für die Färbung ein Immuno-Score berechnet, der sich aus der Färbeintensität und aus dem Prozentsatz der angefärbten Zellen zusammensetzt. Es wurde sowohl das Epithel- als auch das Bindegewebe bewertet. Besondere Bedeutung für die Auswertung der Ergebnisse in Bezug auf einen Diagnostik-Marker hat hierbei jedoch das Epithel, da es sich bei Lungenkarzinomen um Epithelgewebe handelt. Abb. 4.22 zeigt Färbebeispiele mit den entsprechenden Scoring-Bewertungen.



**Abb. 4.22: Bewertung von immunohistochemischen Färbungen mittels Immuno-Score.** Beispiele für mit Immuno-Scores bewertete Lungen-Normal- und Tumorgewebe. Die Bewertung bezieht sich auf das Epithel. Die Färbungen wurden mit anti-LUMA-15A und dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper-system Envision durchgeführt. Der Nachweis der spezifischen Bindungen erfolgte mittels DAB als Substrat. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxilin. Der Immuno-Score (IS) berechnet sich aus der Färbeintensität multipliziert mit dem Prozentsatz der gefärbten Zellen. Die Färbeintensität wurde mit 0 (negativ), 1 (schwach), 2 (stark), der Prozentsatz der gefärbten Zellen mit 0 (keine positiven Zellen), 1 (1-10 % der Zellen positiv), 2 (11-50 % der Zellen positiv), 3 (51-90 % der Zellen positiv) und 4 (91-100 % der Zellen positiv) bewertet.

A.) IS0: Färbeintensität 0, Prozentsatz gefärbter Zellen 0. B.) IS1: Färbeintensität 1, Prozentsatz gefärbter Zellen 1. C.) IS3: Färbeintensität 1, Prozentsatz gefärbter Zellen 3. D.) IS6: Färbeintensität 3, Prozentsatz gefärbter Zellen 2. E.) IS8: Färbeintensität 2, Prozentsatz gefärbter Zellen 4.

Die Ergebnisse aller immunhistochemischer Färbungen von Multi-Tissue-Arrays sind in Tab. 4.3 in Form von Immuno-Score-Bewertungen aufgeführt und zeigen, dass LUMA-15A in sämtlichen Subklassen von Lungentumoren nachgewiesen wurde. Es wurde sowohl in Adeno- und Alveolazellkarzinomen als auch in Plattenepithelkarzinomen, großzelligen und kleinzelligen Karzinomen, anaplastischen Karzinomen, Mesotheliomen und Karzinoiden eine LUMA-15A-Expression detektiert. Zum größten Teil wurden hierbei starke LUMA-15A-Expressionen in Form von Immuno-Scores zwischen 4 und 8 detektiert. Ein Expressionsnachweis erfolgte zudem bei Lungenmetastasen von nicht pulmonalen Tumoridentitäten (Brust-, Pankreas-, Kolon-, Magen-, Zervix- und Ovarkarzinom, Ewing Sarkom). In Lungen-Normalgeweben und Geweben von nicht karzinogenen Lungenerkrankungen (Pneumonien, Pneumokoniosen, Fibrosen, Emphyseme, Ödeme, Bronchitis) hingegen war LUMA-15A tendenziell schwach oder gar nicht exprimiert, was die Bewertung mit Immuno-Scores zwischen 0 und 2 wiedergibt. Die Immuno-Scores für das Bindegewebe liegen sowohl in Tumor- als auch in Normalgeweben generell bei niedrigen Werten zwischen 0 und 2. Nur in einzelnen Fällen wurden Immuno-Scores von 3 oder 4 vergeben. Zudem zeigten Alveolarmakrophagen eine LUMA-15A-Expression.

Insgesamt wurden 75 Lungenkarzinome, 24 Lungenmetastasen verschiedener Tumorentitäten, 107 Lungen-Normalgewebe und 43 Gewebe nicht karzinogener Lungenerkrankungen analysiert. Abb. 4.23 zeigt exemplarisch eine Auswahl der immunhistochemischen Färbungen, die zeigen, dass die Protein-Isoform LUMA-15A eine Bedeutung in der Tumorgenese von Lungentumoren haben könnte.



**Tab. 4.3: Auswertung von immunhistochemischen LUMA-15A-Färbungen mittels Immuno-Scores.** Auswertungen von 3 Lungen-Multi-Tissue-Arrays (MTA) (MTA 01/03 (1), und MTA 03/03 (3), mtm laboratories AG), (High-Density-Lung-MTA (HD28), Clinomics Biosciences, Pittsfield, USA) nach Immuno-Scores für Epithel- und Bindegewebe. Der Immuno-Score berechnet sich aus Färbeintensität und aus dem Prozentsatz der angefärbten Zellen. Von den Geweben, die alle in doppelter Ausführung auf jedem MTA vorhanden sind, ist jeweils eine Position angegeben.

A) Lungenkarzinome und Lungenmetastasen. B) Lungen-Normalgewebe und Gewebe von Personen mit nicht karzinogenen Lungenerkrankungen. Bei den Normalgeweben handelt es sich zum Teil um zu den Tumoren korrespondierende Lungengewebe aus derselben Person, zum Teil um Normalgewebe aus gesunden Personen.

## A)

Position MTA	Gewebe	Diagnose	Immuno-Score	
			Epithel	Binde- gewebe
Af2 (HD28)	Lunge	Adenokarzinom	2	0
Ah4 (HD28)	Lunge	Adenokarzinom	2	2
Be7 (HD28), Ab3 (HD28), Bi4 (HD28)	Lunge	Adenokarzinom	3	0
Bi6 (HD28)	Lunge	Adenokarzinom	3	1
43 (3)	Lunge	Adenokarzinom	3	2
Ae3 (HD28), 29 (1),	Lunge	Adenokarzinom	3	3
Ae7 (HD28)	Lunge	Adenokarzinom	3	4
Ac3 (HD28), Ag5 (HD28)	Lunge	Adenokarzinom	6	1
37 (1)	Lunge	Adenokarzinom	6	2
Ad4 (HD28)	Lunge	Adenokarzinom	6	4
Bg7 (HD28)	Lunge	Adenokarzinom	8	1
Ag1 (HD28), Bc1 (HD28), 49 (1)	Lunge	Adenokarzinom	8	2
47 (3)	Lunge	Bronchio-Alveolar-Adenokarzinom	8	2
1 (1)	Lunge	Bronchio-Alveolarzellkarzinom	6	1
Aa5 (HD28)	Lunge	Bronchio-Alveolarzellkarzinom	2	1
9 (1)	Lunge	Bronchio-Alveolarzellkarzinom	6	0
Ab5 (HD28)	Lunge	Bronchio-Alveolarzellkarzinom	8	0
Bi3 (HD28)	Lunge	Plattenepithelkarzinom	3	0
Ab3 (HD28), Ag7 (HD28), Bh2 (HD28)	Lunge	Plattenepithelkarzinom	3	1
25 (3)	Lunge	Plattenepithelkarzinom	3	4
Ac5 (HD28), 21 (3)	Lunge	Plattenepithelkarzinom	4	1
3 (3), 17 (3)	Lunge	Plattenepithelkarzinom	4	2
Ac1 (HD28)	Lunge	Plattenepithelkarzinom	6	0
Ab5 (HD28), Ag3 (HD28), 55 (1)	Lunge	Plattenepithelkarzinom	6	1
Aa1 (HD28), Aa7 (HD28), Ab1 (HD28), Ab7 (HD28), Ae5 (HD28), 25 (1)	Lunge	Plattenepithelkarzinom	6	2
13 (3), 27 (3), 31 (3), 37 (3)	Lunge	Plattenepithelkarzinom	6	4
Ab1 (HD28)	Lunge	Plattenepithelkarzinom	8	0
Ai1 (HD28), Ai3 (HD28), Ab2 (HD28),	Lunge	Plattenepithelkarzinom	8	1
Ad6 (HD28), 7 (3), 9 (2), 19 (3), 33 (3), 35 (3)	Lunge	Plattenepithelkarzinom	8	2
1 (3), 15 (3), 41 (3)	Lunge	Plattenepithelkarzinom	8	4
Ae1 (HD28)	Lunge	Großzelliges Karzinom	6	2
Bh5 (HD28)	Lunge	Großzelliges Karzinom	0	0
51 (3)	Lunge	Groß- und rießenzelliges Karzinom	6	6
53 (3)	Lunge	Groß- und hellzelliges Karzinom	3	2
45 (1)	Lunge	Groß- und hellzelliges Karzinom	3	0
59 (3)	Lunge	Karzinoid	4	2
49 (3)	Lunge	Kleinzelliges Karzinom	0	2

Ac7 (HD28)	Lunge	Kleinzelliges Karzinom	6	0
Ai5 (HD28)	Lunge	Kleinzelliges Karzinom	8	1
Ai7 (HD28)	Lunge	Kleinzelliges Karzinom	6	-
Af4 (HD28)	Lunge	Anaplastisches Karzinom	6	-
Ab3 (HD28)	Lunge	Anaplastisches Karzinom	8	0
Aa3 (HD28)	Pleura	Mesotheliom	8	2
Ad2 (HD28)	Pleura	Mesotheliom	6	1
57 (3)	Lunge	Karnifizierende Pneumonie	4	2
55 (3)	Lunge	Karnifizierende Pneumonie	4	4
Ah2 (HD28)	Lymphknoten	Metastasierendes, bronchiogenes Plattenepithelkarziom	2	1
Ba1 (HD28)	Lunge	Metastasierendes Adenokarzinom	6	1
Bc4 (HD28)	Lunge	Metastasierendes Adenokarzinom	8	1
Bd4 (HD28)	Lunge	Metastasierendes Adenokarzinom	3	1
Bc4 (HD28)	Lunge	Metastasierendes großzelliges Karzinom	4	-
Be1 (HD28)	Lunge	Metastasierendes Plattenepithelkarzinom	1	0
Ba3 (HD28)	Lunge	Metastasierendes osteogenes Sarkom	6	1
Ba7 (HD28)	Lunge	Metastasierendes Kolon-Adenokarzinom	6	2
Be3 (HD28)	Lunge	Metastasierendes, rektales Adenokarzinom	2	0
Bd7 (HD28)	Lunge	Metastasierendes Pankreaskarzinom	4	1
Bb3 (HD28)	Lunge	Metastasierendes, Pankreaskarzinom	6	1
Bb5 (HD28)	Lunge	Metastasierendes Pankreas-Adenokarzinom	6	1
Bb7 (HD28), Bg1 (HD28)	Lunge	Metastasierendes Pankreas-Adenokarzinom	6	0
Bf4 (HD28)	Lunge	Metastasierendes Pankreas-Adenokarzinom	3	1
Bg3 (HD28), Bg5 (HD28)	Lunge	Metastasierendes Brust-Adenokarzinom	3	0
Cf2 (HD28)	Lunge	Metastasierendes Brustkarzinom	3	3
Bf6 (HD28)	Lunge	Metastasierendes, ovariales Zystenadenokarzinom	4	0
Ca2 (HD28)	Lunge	Metastasierendes, endozervikales Adenokarzinom	3	0
Bc7(HD28)	Lunge	Metastasierendes, gastroösophageales Adenokarziom	6	2
Be5 (HD28)	Lunge	Metastasierendes, gastroösophageales Adenokarziom	6	1
Bf2 (HD28)	Lunge	Metastasierendes, gastrisches Adenokarzinom	8	1
Bd2 (HD28)	Lunge	Metastasierendes Ewing Sarkom	6	1

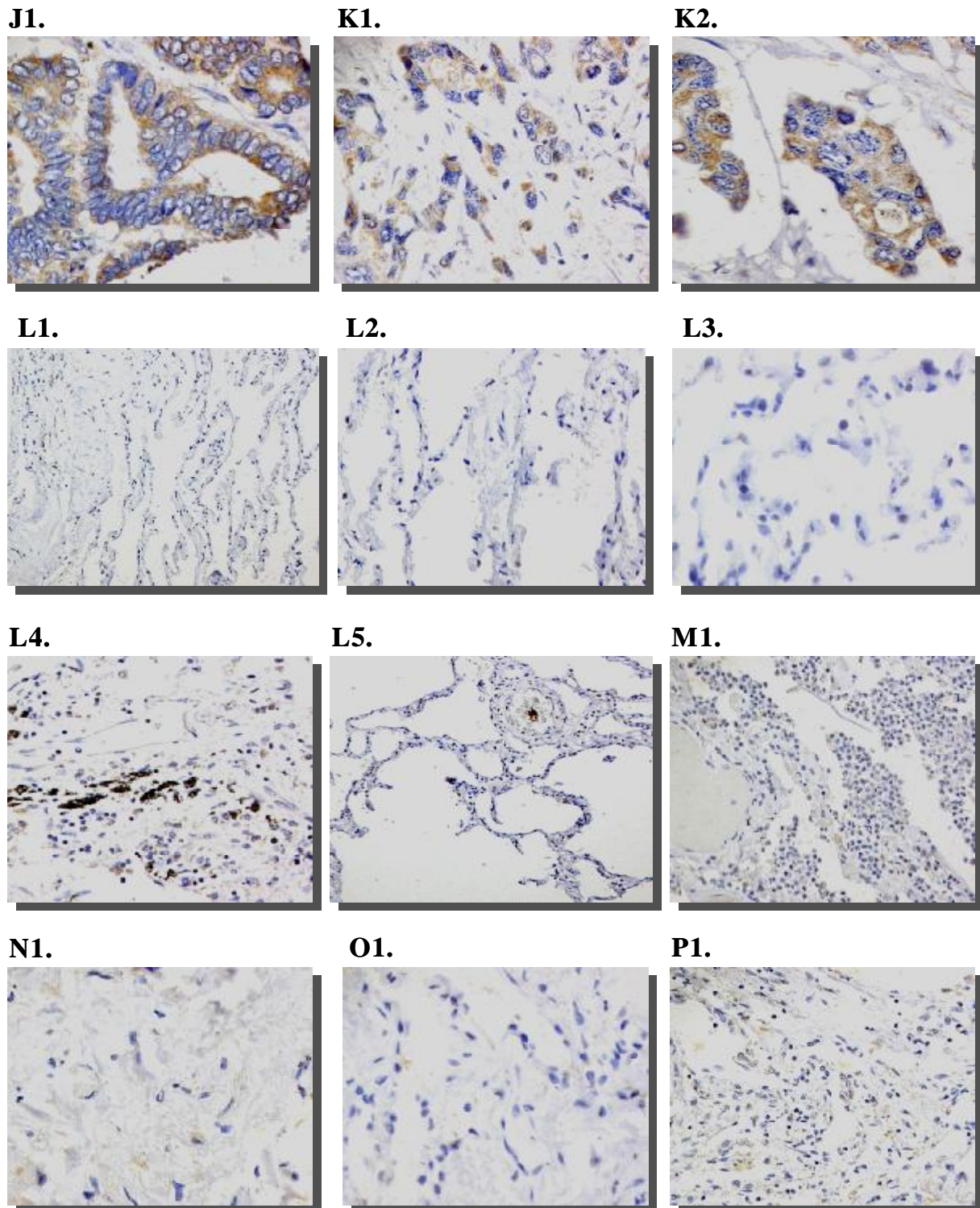
## B)

Position MTA	Gewebe	Diagnose	Immuno-Score	
			Epithel	Binde- gewebe
Ae2 (HD28) , Ag2 (HD28) Ag6 (HD28), Ah1 (HD28), Ai2 (HD28), Ai6 (HD28), Be6 (HD28), Bh1 (HD28), Bh7 (HD28), Ca6 (HD28), Cb1 (HD28), Cb2 (HD28), Cb4 (HD28), Cb8 (HD28), Cd1 (HD28), Cd3 (HD28), Ce4 (HD28), Cf1 (HD28), Dc6 (HD28), Dd6 (HD28), Dd7 (HD28), De1 (HD28), De3 (HD28), De4 (HD28), De5 (HD28), De7 (HD28), Df1 (HD28), Df2 (HD28) Df3 (HD28), Df4 (HD28), Df5 (HD28), Df6 (HD28), Df7 (HD28), Dg1 (HD28), Dg2 (HD28), Dg3 (HD28), Dg4 (HD28), Dg5 (HD28), Dh2 (HD28), Dh3 (HD28), Dh4 (HD28), Dh5 (HD28), Dh6 (HD28), Dh7 (HD28), Di1 (HD28), Di3 (HD28), Di6 (HD28), Di7 (HD28), 7 (1), 11 (1), 15 (1)	Lunge	Normal	0	0
Af3 (HD28), Cb6 (HD28), Cd7 (HD28), Dc7 (HD28), Dd5 (HD28), Dg6 (HD28), Dh1 (HD28)	Lunge	Normal	0	1
Af1 (HD28)	Lunge	Normal	0	2
Af6 (HD28), Ai4 (HD28), Ag4 (HD28), Ai4 (HD28), Ba2 (HD28), Bb1 (HD28), Bc3 (HD28), Cc2 (HD28), Ce6 (HD28), Eb5 (HD28), 3 (1), 35 (1), 51 (1), 53 (1)	Lunge	Normal	1	0
Ah5 (HD28), Bb6 (HD28), Bb8 (HD28), Bi1 (HD28), Da7 (HD28), 23 (3)	Lunge	Normal	1	1
Dd1 (HD28)	Lunge	Normal	1	2
Ah3 (HD28), Bd6 (HD28), Cd5 (HD28), Ce2 (HD28), Dg7 (HD28), Di2 (HD28), Di4 (HD28), Di5 (HD28)	Lunge	Normal	2	0
Af7 (HD28), Ah7 (HD28), Ba5 (HD28), Ca1 (HD28), Ca8 (HD28), Cc6 (HD28), 27 (1)	Lunge	Normal	2	1
Af5 (HD28), Bc6 (HD28), Bi5 (HD28), 43 (1), 5 (3), 45 (3)	Lunge	Normal	2	2
Dd2 (HD28)	Lunge	Normal	4	1
29 (3)	Lunge	Normal	4	4
Cc4 (HD28), 31 (1)	Lunge	Normal	6	0
11 (3)	Lunge	Normal	6	2
Bg6 (HD28), Ca3 (HD28), Cb7 (HD28), Cg7 (HD28), Ci5 (HD28), Ch4 (HD28), Ci7 (HD28), Da2 (HD28), Da4 (HD28), Dc4 (HD28)	Lunge	Emphysem	0	0
Cc1 (HD28)	Lunge	Emphysem	0	1
Ce3 (HD28), Cg1 (HD28), Db8 (HD28), 39 (1)	Lunge	Emphysem	1	0
Cg5 (HD28)	Lunge	Emphysem	1	1
Cb5 (HD28), Cc3 (HD28), Cc7 (HD28), Cg3 (HD28), Db6 (HD28)	Lunge	Emphysem	2	0
Ci3 (HD28)	Lunge	Emphysem	4	0
Da6 (HD28)	Lunge	Fibröse Lungenproliferation	2	2
Bh3 (HD28), Cd2 (HD28)	Lunge	Fibrose	1	0
Cb3 (HD28), Cf4 (HD28)	Lunge	Pneumokoniose	0	0
Bh4 (HD28)	Lunge	Pneumokoniose	1	0
Bh6 (HD28)	Lunge	Pneumonie	0	0
Bi2 (HD28), Bi7 (HD28)	Lunge	Pneumonie	2	1
Cc5 (HD28)	Lunge	Pneumonie	2	2
Db4 (HD28), Dc2 (HD28), Ci1 (HD28)	Lunge	Broncho-Pneumonie	0	0
Cd6 (HD28)	Lunge	Broncho-Pneumonie	0	4
Ce1 (HD28)	Lunge	Broncho-Pneumonie	1	0
Ce5 (HD28)	Lunge	Broncho-Pneumonie	2	0
Da8 (HD28)	Lunge	Broncho-Pneumonie	2	1
Ca7 (HD28)	Lunge	Bronchitis	8	3
Cd4 (HD28), Dd4 (HD28)	Lunge	Ödem	0	0
Db2 (HD28)	Lunge	Ödem	2	0





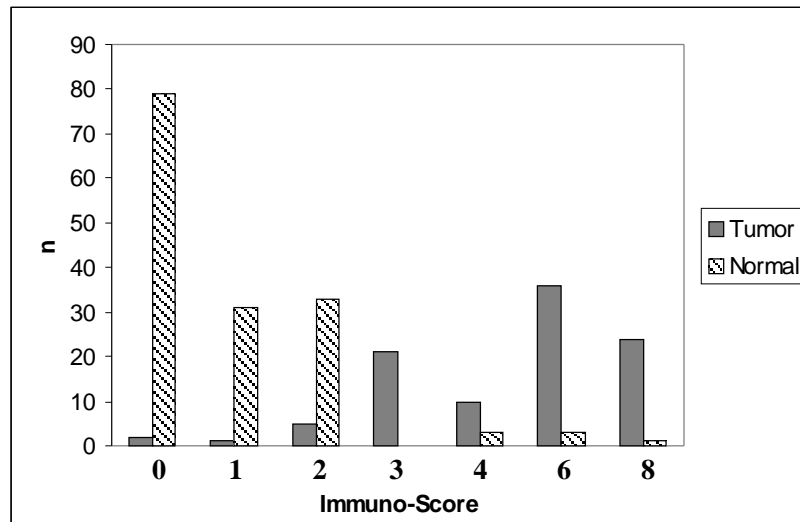




**Abb. 4.23: Immunhistochemische Expressionsanalyse von LUMA-15A in Lungen-Tumor- und Normalgeweben.** Auswahl der Färbungen von 3 Lungen Multi-Tissue-Arrays mit anti-LUMA-15A und dem HRP-konjugierten Sekundärantikörpersystem Envision. Der Nachweis der spezifischen Bindungen erfolgte mittels DAB, die Gegenfärbung mit Hämatoxilin.

A1.-A3.) Adenokarzinom. B1.-B5.) Plattenepithelkarzinom. C1.) Karzinoid. D1.) Anaplastisches Karzinom. E1.) Großzelliges Lungenkarzinom. F1.) Kleinzelliges Lungenkarzinom. G1.) Karnifizierende Pneumonie. H1.) Mesotheliom. I1.) Lungenmetastase, metastasiertes Brustkarzinom. J1.) Lungenmetastase, metastasiertes Kolon-Adenokarzinom. K1.-K2.) Lungenmetastase, metastasiertes Pankreaskarzinom. L1.-L5.) Lungen-Normalgewebe. M1.) Broncho-Pneumonie. N1.) Fibrose. O1.) Ödem. P1.) Emphysem .

Die Gesamtauswertung der in Tab. 4.3 aufgeführten immunhistochemischen Färbungen von Lungen-Tumor- und Normalgeweben nach Immuno-Scores bezüglich des Epithelgewebes ist in Abb. 4.24 wiedergegeben.



**Abb. 4.24: Immuno-Score-Verteilung.** Gesamtauswertung der immunhistochemischen Färbungen von 75 Lungenkarzinomen, 24 Lungenmetastasen verschiedener Tumorentitäten, 107 Lungen-Normalgewebe und 43 Gewebe nicht karzinogener Lungenerkrankungen mit anti-LUMA-15A nach Immuno-Scores. Der Immuno-Score berechnet sich aus der Färbeintensität und dem Prozentsatz der angefärbten Zellen. Gezeigt sind die Bewertungen des Epithels. „Tumor“ beinhaltet Lungenkarzinome und Lungenmetastasen, „Normal“ umfasst Lungen-Normalgewebe und nicht karzinogene Lungenerkrankungen. Auf der x-Achse sind die Immuno-Scores, auf der y-Achse die Anzahl der Fälle (n) angegeben.

Anhand der in Abb. 4.24 dargestellten Ergebnisse wurde der potentielle LUMA-Marker im Hinblick auf Spezifität und Sensitivität analysiert. Ein Krebs-Diagnostikmarker sollte sowohl durch eine hohe Sensitivität als auch durch eine hohe Spezifität charakterisiert sein. Die Sensitivität beinhaltet den Nachweis des Proteins in einer möglichst großen Anzahl von Karzinomen, wohingegen die Spezifität sich auf die spezifische Detektion von Karzinomen im Vergleich zu Normalgeweben bezieht. Um eine Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse durchführen zu können, muss ein Cut-off-Wert festgelegt werden, ab dem eine Probe als positiv gewertet wird.

Anhand der Verteilung der Ergebnisse in Abb. 4.24 wurden alle Fälle, die einen Immuno-Score größer oder gleich 3 zeigen, mit positiv bewertet. Als negativ wurden die Proben, die mit einem Immuno-Score von kleiner 3 bewertet wurden, angesehen. Die Bewertungen beziehen sich auf das Epithel. Durch die daraus resultierende Verteilung (Tab. 4.4) lässt sich der potentielle LUMA-Marker in Bezug auf Sensitivität und Spezifität beurteilen.

Die Ergebnisse der Analyse von 99 Lungentumoren oder Metastasen und 150 Normalgeweben oder nicht karzinogener Lungenerkrankungen ergeben für den potentiellen LUMA-Marker eine Sensitivität von 90,9 % und eine Spezifität von 95,3 % (Tab. 4.5).

**Tab. 4.4: Verteilung der Immuno-Scores.** Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von Lungen-Multi-Tissue-Arrays mit anti-LUMA-15A nach Bewertung der Immuno-Scores in positiv (Immuno-Score  $\geq 3$ ) und negativ (Immuno-Score  $< 3$ ). Bronchio-Alveolarzellkarzinome sind unter Adenokarzinome aufgeführt. Die Bewertung bezieht sich auf das Epithel.

	Anzahl	Positiv (Immuno-Score $\geq 3$ )	Negativ (Immuno-Score $< 3$ )
<b>Primäre Lungentumoren</b>			
Alle Karzinome	n = 73	67	6
Adenokarzinome	n = 23	20	3
Plattenepithelkarzinome	n = 37	37	0
Großzellige Karzinome	n = 5	4	1
Kleinzellige Karzinome	n = 4	3	1
Karzinoid	n = 1	1	0
Anaplastisches Karzinom	n = 2	2	0
Karnifizierende Pneumonie	n = 2	1	1
<b>Pleurale Tumoren</b>			
Mesotheliome	n = 2	2	0
<b>Lungen Metastasen</b>			
Alle Metastasen	n = 24	21	3
Adenokarzinome	n = 20	19	1
Plattenepithelkarzinome	n = 2	0	2
Sarkom	n = 2	2	0
<b>Lungen-Normalgewebe</b>			
Alle Normalgewebe	n = 150	7	143
Zum Tumorgewebe korrespondierende Normalgewebe	n = 75	5	70
Normalgewebe aus gesunden Personen	n = 32	0	32
Nicht karzinogene Lungenerkrankungen	n = 43	2	41

**Tab. 4.5: Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse eines potentiellen LUMA-Markers.** Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von 75 Lungenkarzinomen, 24 Lungenmetastasen, 107 Lungen-Normalgewebe und 43 Gewebe nicht karzinogener Lungenerkrankungen mit anti-LUMA-15A nach Bewertung der Immuno-Scores in positiv (Immuno-Score  $\geq 3$ ) und negativ (Immuno-Score  $< 3$ ).

	Tumor / Metastasen	Normal / nicht karzinogene Lungenerkrankungen	Sensitivität	Spezifität
<b>Immuno-Score positiv</b>	<b>90</b>	<b>7</b>	<b>90,9 %</b>	<b>95,3%</b>
<b>Immuno-score negativ</b>	<b>9</b>	<b>143</b>		

#### 4.9.6 Immunohistochemische Expressionsanalyse von LUMA-15A in verschiedenen Tumorentitäten

Da die Protein-Isoform LUMA-15A in Lungentumoren eine spezifische Überexpression zeigte, wurde das Expressionsprofil in weiteren Tumorentitäten immunohistochemisch analysiert. Hierbei standen Tumor- und Normalgewebe von Kolon, Ovar, Zervix, Magen und Blase zu Verfügung.

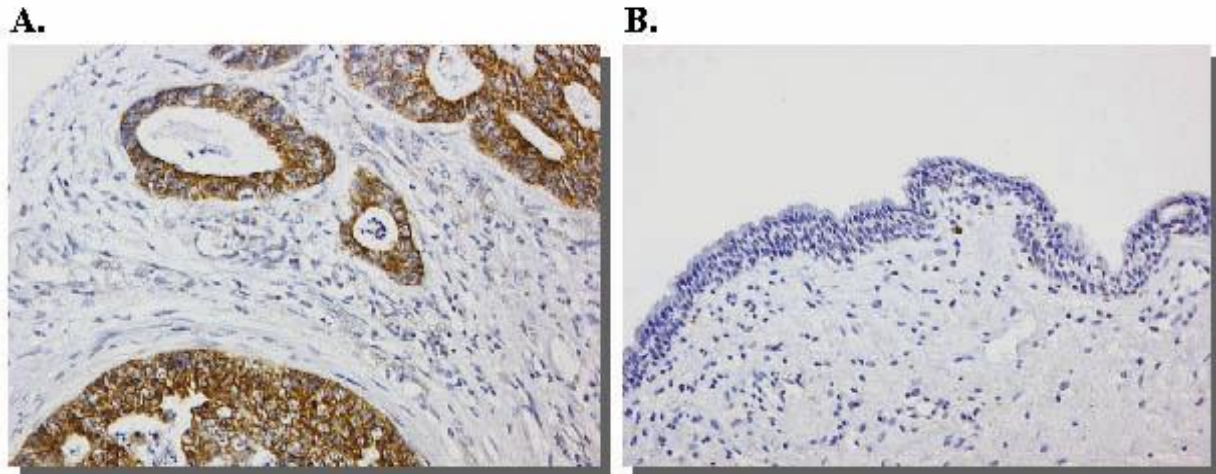
Die Ovar-, Zervix- und Magen-Multi-Tissue-Arrays mit jeweils 29 verschiedenen Tumor- und Normalgewebeproben zeigten keine signifikant veränderten Expressionsmuster im Vergleich von Tumor- und Normalgeweben (Daten nicht gezeigt). In Kolongeweben wurden LUMA-15A sowohl in den Normal- als auch in den Tumorgeweben detektiert. Hier ist in Kolonkarzinomen aufgrund der Färbeintensität auf eine erhöhte Expression von LUMA-15A zu schließen (Daten nicht gezeigt).

Signifikant erhöhte Expressionen von LUMA-15A wurden in Blasenkarzinomen identifiziert (Abb. 4.25). 79 % der Blasenkarzinome sind nach Bewertung des Epithels mittels Immuno-Score-Analyse für einen Immuno-Score von größer oder gleich 3 positiv. 5 von 6 Blasen-Normalgeweben zeigten eine niedrige oder keine LUMA-15A-Expression und wurden mit einem Immuno-Score kleiner 3 bewertet. Die Immuno-Scores für das Bindegewebe lagen zwischen 0 und 4.

**Tab. 4.6: Verteilung der Immuno-Scores.** Auswertung der immunohistochemischen Färbungen von einem Blasen Multi-Tissue-Arrays mit anti-LUMA-15A nach Bewertung der Immuno-Scores in positiv (Immuno-Score  $\geq 3$ ) und negativ (Immuno-Score  $< 3$ ). Die Bewertung bezieht sich auf das Epithel.

	Anzahl	Positiv (Immuno-Score $\geq 3$ )	Negativ (Immuno-Score $< 3$ )
<b>Blasen-Transitionalzell-Karzinome</b>	n = 62	49	13
<b>Blasen-Normalgewebe</b>	n = 6	1	5





**Abb. 4.25: Immunhistochemische Expressionsanalyse von LUMA-15A in Blasen-Tumor- und Normalgewebe.** Die Färbungen wurden mit anti-LUMA-15A und dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper-System Envision durchgeführt. Der Nachweis der spezifischen Bindungen erfolgte mittels DAB, die Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

A.) Nachweis von LUMA-15A in einem Blasen-Transitionalzell-Karzinom. B.) Blasen-Normalgewebe, das keine Expression von LUMA-15A zeigt.

#### 4.9.7 Immunzytochemischer Nachweis von LUMA-15A in Bronchialsekreten

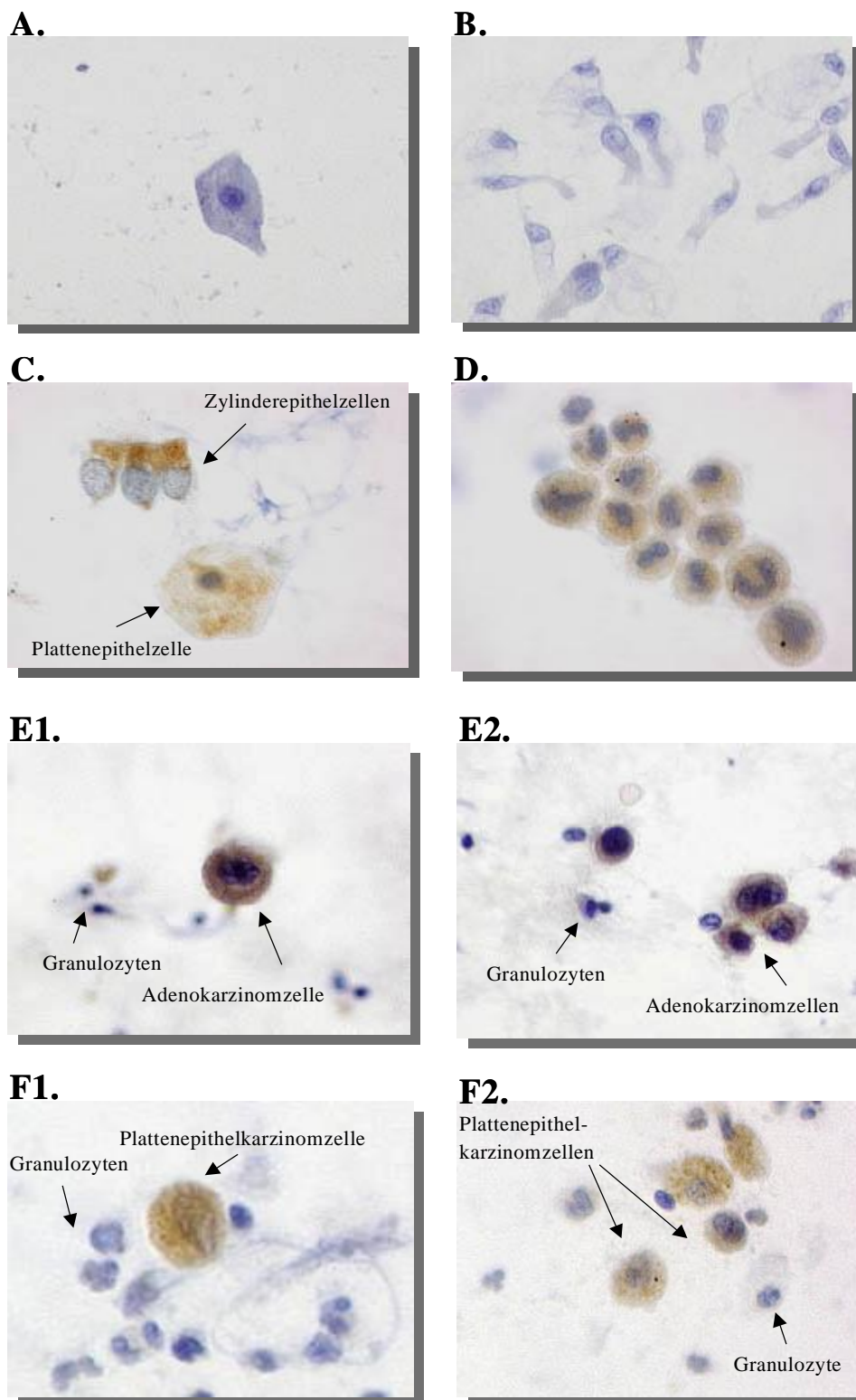
Nach dem immunhistochemischen Nachweis der Protein-Isoform LUMA-15A in Lungentumorgeweben wurden immunzytochemische Färbungen an Bronchialsekreten durchgeführt. Hierbei wurde analysiert, inwiefern sich die Resultate der Immunhistochemie in immunzytochemischen Färbungen bestätigen und der Nachweis von Tumorzellen mittels anti-LUMA-15A-Antikörper möglich ist.

Es standen Bronchialsekrete von gesunden Individuen und von an Lungenkarzinom-erkrankten Patienten zur Verfügung, die über eine Bronchial-Lavage aus der Lunge isoliert wurden. Bei den Bronchialsekreten handelte es sich um 3 Adenokarzinome und 2 Plattenepithelkarzinome. Die normalen Proben stammten von 7 verschiedenen, gesunden Personen. Die von Prof. Dr. A. Böcking (Zytopathologie, Düsseldorf) bereitgestellten Bronchialsekrete wurden zur Fixierung in Saccomanno-Lösung resuspendiert, mit Merckofix-Spray postfixiert und auf Objektträgern ausgestrichen. Nach verschiedenen Ansätzen zur Fixierung der Präparate erwies sich diese Methode als geeignet, da keine unspezifischen Färbereaktionen aufgrund des Sekundärantikörpers oder des in den Bronchialsekreten enthaltenen Schleims erfolgte. Mit Vortests, bei denen die Zelllinien P693, A549, Calu6 unter den gleichen Bedingungen behandelt wurden, konnten mit anti-LUMA-15A, dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper-System Envision und DAB als Substrat spezifische Signale nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Färbungen von Bronchialsekreten zeigten, dass LUMA-15A auch auf Zytologie-Ebene in Tumorzellen nachzuweisen ist. Adenokarzinom- und Plattenepithelkarzinomzellen wiesen in allen untersuchten Bronchialsekreten ein spezifisches, zytoplasmatisches Signal auf. Sowohl in Tumor- als auch in Normalbronchialsekreten waren zudem Alveolarmakrophagen, und teilweise Zylinderepithel- und Plattenepithelzellen gefärbt. In Granulozyten wurde hingegen keinerlei LUMA-15A-Expression detektiert. Die Resultate der immunzytochemischen Nachweise zeigen Tab. 4.7 und Abb. 4.26.

**Tab. 4.7: LUMA-15A-Expression in Bronchialsekreten.** Nachweis von LUMA-15A in Zellen von Normal- und Tumorbronchialsekreten.

	Zylinder- epithel- zellen	Platten- epithel- zellen	Alveolar- makro- phagen	Granulo- zyten	Tumorzellen	
					Adeno- karzinom	Plattenepithel- karzinom
<b>LUMA- 15A</b>	teilweise positiv	teilweise positiv	positiv	negativ	positiv	positiv



**Abb. 4.26: Immunzytochemischer Nachweis von LUMA-15A in Bronchialsekreten.** Die Färbungen von Normal- und Tumorbronchialsekreten wurden mit anti-LUMA-15A und dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper-System Envision durchgeführt. Der Nachweis der spezifischen Bindungen erfolgte mittels DAB, die Gegenfärbung mit Hämatoxilin.

A.) LUMA-15A-negative Plattenepithelzelle. B.) LUMA-15A-negative Zylinderepithelzellen. C.) LUMA-15A-positive Zylinderepithel- und Plattenepithelzellen. D.) LUMA-15A-positive Alveolarmakrophagen. E1.), E2.) LUMA-15A-positive Adenokarzinomzellen und LUMA-15A-negative Granulozyten. F1.), F2.) LUMA-15A-positive Plattenepithelkarzinomzellen und LUMA-15A-negative Granulozyten.



#### 4.9.8 Immunzytochemische Doppelfärbung von LUMA-15A und Ki67 in Bronchialsekreten

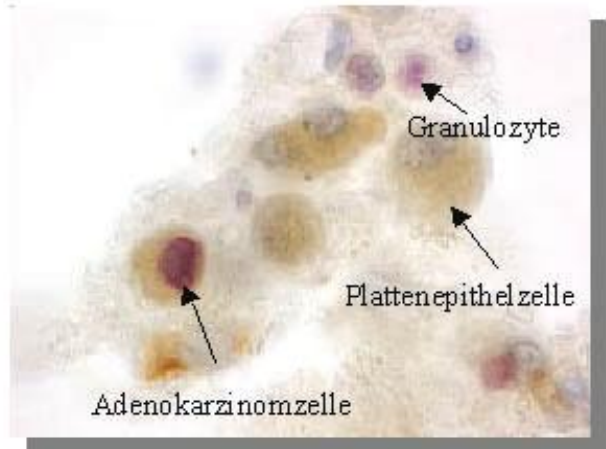
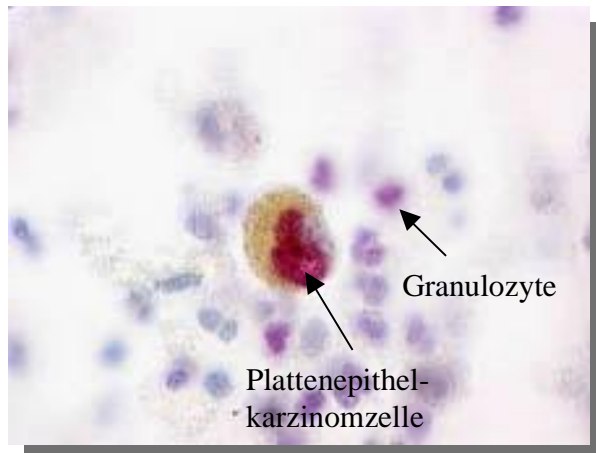
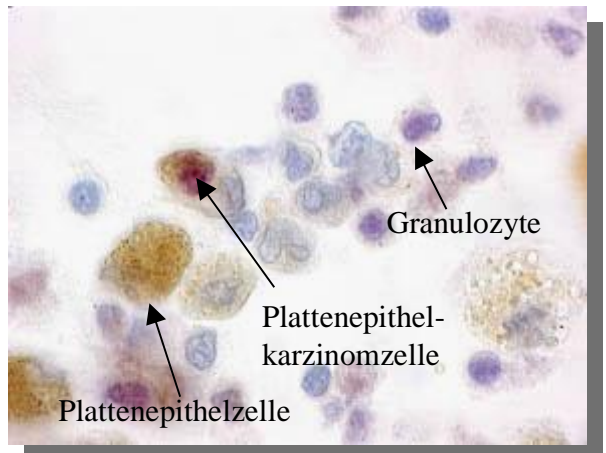
Die immunzytochemischen Färbungen an Bronchialsekreten zeigten zum Teil eine Expression von LUMA-15A in normalen, benignen Zellen, wie Zylinderepithelzellen, Plattenepithelzellen und Alveolarmakrophagen (vgl. Tab. 4.7 und Abb. 4.26). Da diese Expression ebenso stark wie in Tumorzellen auftritt, würde keine ausreichende Spezifität eines LUMA-Markers erreicht. Im Hinblick hierauf wurde in Ansätzen einer Doppelfärbung mit einem zweiten Protein versucht die Spezifität zu erhöhen.

Hierbei wurden Proteine ermittelt, die nukleär lokalisiert vorliegen, um zwischen einer zytoplasmatischen LUMA-Färbung diskriminieren zu können. Als Kernproteine wurde DNase X und Ki67 ausgewählt. Das X-chromosomal lokalisierte Protein DNase X wurde in immunhistochemischen Analysen bereits in Lungentumoren nachgewiesen. Ki67 ist ein Protein, das eine Funktion im Zellzyklus besitzt und in proliferierenden Zellen zu finden ist (Brown und Gatter, 2002). LUMA-15A wurde mittels des HRP-konjugierten Sekundärantikörper-Systems Envision und DAB als Substrat, DNase X oder Ki67 mit einem AP-gekoppeltem Sekundärantikörper und Fast Red als Substrat nachgewiesen. Bei den Bronchialsekreten handelte es sich um 3 Adenokarzinome, 2 Plattenepithelkarzinome und Proben von 7 verschiedenen, gesunden Personen. Hierbei zeigte sich, dass durch die Kombination von Antikörpern, die LUMA-15A bzw. Ki67 nachweisen, im Gegensatz zur Kombination von LUMA-15A mit DNase X (Daten nicht gezeigt) ein spezifischer Nachweis von Tumorzellen erfolgte (Tab. 4.8, Abb. 4.27). Lediglich Tumorzellen zeigten eine Expression von LUMA-15A und Ki67. Dies war in allen getesteten Präparaten detektierbar, bis auf eine Probe eines Patienten mit Adenokarzinom, in dem keine Tumorzellen nachweisbar waren. Ein Ki67-Signal wurde zusätzlich in Granulozyten detektiert.

Durch diese differenzierten Expressionsmuster von LUMA-15A und Ki67 in verschiedenen Zelltypen ist es möglich, Tumorzellen in Bronchialsekreten spezifisch mittels einer Doppelfärbung zu identifizieren.

**Tab. 4.8: LUMA-15A- und Ki67-Expression in Bronchialsekreten.** Nachweis von LUMA-15A und Ki67 in Zellen von Normal- und Tumorbronchialsekreten.

	Zylinder- epithel- zellen	Platten- epithel- zellen	Alveolar- makro- phagen	Granulo- zyten	Tumorzellen	
					Adeno- karzinom	Plattenepithel- karzinom
<b>LUMA-15A</b>	teilweise positiv	teilweise positiv	positiv	negativ	positiv	positiv
<b>Ki67</b>	negativ	negativ	negativ	positiv	positiv	positiv

**A1.****A2.****B1.****B2.**

**Abb. 4.27: Immunzytochemische Doppelfärbung von LUMA-15A und Ki67 in Bronchialsekreten.** Die Färbungen von Normal- und Tumorbronchialsekreten wurden mit anti-LUMA-15A und anti-Ki67-FITC (clone MIB-1) durchgeführt. LUMA-15A wurde mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper-System Envision und DAB als Substrat nachgewiesen, Ki67 mit einem AP-konjugierten anti-FITC-Sekundärantikörper und dem Chromogen Fast Red. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin.

A1.), A2.) LUMA-15A- und Ki67-positive Adenokarzinomzellen, Ki67-positive Granulozyten, LUMA-15A-positive Plattenepithelzellen. B1.), B2.) LUMA-15A- und Ki67-positive Plattenepithelkarzinomzellen, Ki67-positive Granulozyten, LUMA-15A-positive Plattenepithelzellen.

## 5 Diskussion

Trotz des zunehmenden Wissens über wiederholt auftretende genomische Abberationen und den entsprechend betroffenen und veränderten Genen beim kolorektalen Karzinom und Bronchialkarzinom ist der Pathomechanismus dieser zwei Krankheiten nicht entsprechend verstanden. Durch den Vergleich der Expression von Genen in Tumorgewebe mit benignem, korrespondierendem Normalgewebe können tumorspezifische Gene identifiziert werden, die für die Pathogenese des Tumors von Bedeutung sein können. Es ist daher sinnvoll und notwendig, die differentielle Genexpression zu untersuchen und die gewonnenen Daten in bestehende Modelle der Karzinomentstehung einzugliedern. Desweiteren ist es wünschenswert, dass differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, die in der Krebsdiagnostik eine Anwendung als molekulare Marker für den Nachweis von karzinogenen Zellen finden können.

### 5.1 Real-Time-PCR-basierende Quantifizierung von Transkripten aus Tumor- und Normalgewebe

Für die quantitativen Real-Time-PCR-Expressions-Analysen wurde RNA, die aus Gewebeproben isoliert wurde, eingesetzt. Entscheidende Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung der Analysen war die Verwendung von qualitativ hochwertiger RNA. Um eine Degradation der RNA zu verhindern, wurden die Gewebe unmittelbar nach der Operation in flüssigem Stickstoff gelagert. Die anschließende Extraktion der RNA wurde auf Eis in Anwesenheit von RNase-Inhibitoren durchgeführt. Mittels manueller Mikrodisektion wurden aus Gewebeschnitten distinkte Gewebebereiche ausgeschnitten. Dadurch war es möglich Tumorgewebe-Bereiche zu isolieren, und für die RNA-Extraktion einzusetzen, die keine Anteile von Normalgewebe beinhalten. Es zeigte sich jedoch, dass der Einsatz der manuellen Mikrodisektion aufgrund einer Erwärmung des Gewebes zu einer Beeinträchtigung der RNA-Stabilität führte. Um eine intakte RNA zu isolieren, wurde daher eine Aufarbeitung von Gesamt-RNA aus nicht-mikrodisektiertem Tumorgewebe durchgeführt. Hierbei wurden Normalgewebe-Anteile im direkten Anschluss an die Operation entfernt. Aufgrund der im Vergleich zur Mikrodisektion hochwertigen, intakten RNA-Qualität, wurde ein geringer Normalgewebe-Anteil bei den Tumorpräparaten in Kauf genommen. Zudem wurde die zu isolierende RNA-Menge so gewählt, dass in einer Extraktion pro Gewebeprobe, RNA für alle durchzuführenden quantitativen Expressions-Analysen generiert wurde. Hierdurch wurde gleichbleibend qualitativ einheitliches und hochwertiges Ausgangsmaterial gesichert.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Expressions-Analysen wurde als Ausgangsmaterial Gewebe gewählt. Dies ermöglicht im Gegensatz zur Verwendung von Zelllinien eine Analyse des Expressionsverhaltens von Zellen in ihrer natürlichen Umgebung. So ist bei benignen Zellen in Kultur zu beobachten, dass sie sich anders verhalten als Zellen im Gewebeverband, bei denen differenzierte Zell-Zell-Interaktionen stattfinden. Dieser Effekt wird zusätzlich durch die Verwendung von Wachstumsfaktoren und anderer Additiva im Kulturmedium verstärkt. Es ist bekannt, dass das Expressionsprofil von Tumorzellen durch benachbarte Zellen reguliert sein kann und auf die maligne Transformation einen entscheidenden Einfluss hat (Quaranta und Gianelli, 2003). Solche Expressionsveränderungen würden bei *in-vitro* Untersuchungen nicht erfasst werden.

## **5.2 Vergleich der Ansätze zur Identifizierung von tumorassoziierten Genen mittels Hybridisierung von Protein-Arrays und in-silico-Analyse von EST-Datenbanken**

In dieser Arbeit wurden mit der Hybridisierung von Protein-Arrays und der in-silico-Analyse von EST-Datenbanken zwei unterschiedliche Ansätze zur Identifizierung von tumorassoziierten Kandidaten-Genen angewandt. Beide Methoden sollten eine Vorauswahl von Genen liefern, um diese auf eine differentielle Genexpression hin zu analysieren.

Mittels der serumbasierten Hybridisierung von Protein-Arrays können tumorassoziierte Antigene aufgrund einer bereits im Patienten erfolgten Immunantwort identifiziert werden (Sahin *et al.*, 1997). Die Tatsache, dass Antikörper in Seren von Tumorpatienten spezifisch Strukturen erkennen, die selektiv auf autologen Tumoren, aber nicht auf normalen Zellen exprimiert werden, ist bekannt (Old und Chen, 1998).

Ein Nachteil der in dieser Arbeit eingesetzten Protein-Arrays besteht jedoch darin, dass diese aus einer Expressions-Bibliothek generiert wurden, die mittels Oligo(dT)-„*priming*“ hergestellt wurde. Das Umschreiben der mRNA in cDNA kann so nur am 3'-Ende der Gene gestartet werden und führt in vielen Fällen zum Fehlen von N-terminalen Bereichen größerer Proteine (Bussow *et al.*, 1998). Neue Ansätze bestehen in der Generierung von Filtern, die statt mit Oligo(dT)-geprimten Bibliotheken mit „*random*“-geprimten Bibliotheken hergestellt werden. Durch den Einsatz von Primern, die eine zufällige Sequenz besitzen („*random*“-Primer), wird der Start der cDNA-Synthese an beliebigen Positionen ermöglicht. Hierdurch erhält man cDNA-Bibliotheken, die auch Gensequenzen von N-terminalen Proteinen einschließen. Da es

sich bei der Bibliothek um eine redundante Expressions-Bibliothek handelte, können zudem gleiche Proteine in mehrfacher Anzahl auf den Filtern vorhanden sein (Cahill, 2001). Aufgrund dieser Redundanz ist die Auswahl der Proteine, die analysiert werden können, eingeschränkt. Nicht-redundante cDNA-Bibliotheken sollen zukünftig mittels Oligonukleotid-„Fingerprinting“ generiert werden (Herwig *et al.*, 1999). Auf Filtern immobilisierte cDNAs einer Expressionsbibliothek werden hierbei mit hunderten von kurzen Oligonukleotiden hybridisiert. Die generierten Hybridisierungssignale stellen einen sogenannten „Fingerprint“ für jeden Klon dar. Von Klonen mit identischem „Fingerprint“ wird lediglich ein Klon in die finale Expressions-Bibliothek aufgenommen, die für die Generierung der Protein-Arrays eingesetzt wird. Desweiteren ermöglicht die Protein-Array-Analyse aufgrund des bakteriellen Expressionssystems keine Detektion von durch Phosphorylierung oder Glykosylierung posttranslational modifizierten Proteinen, die oft antigene Eigenschaften aufweisen (Mamula *et al.*, 1999). Weitere Nachteile bestehen darin, dass die immobilisierten Proteine entweder komplett denaturiert oder in nicht-korrekt Faltung vorliegen und so zum Teil von spezifischen Antikörpern im Serum nicht gebunden werden können (Cahill, 2001; Holt *et al.*, 2000).

Die Vorteile des Protein-Array-Ansatzes bestehen jedoch in einer „high throughput“-Analyse, bei der, trotz des Einsatzes von Oligo(dT)-geprägten und redundanten Expressions-Bibliotheken, dennoch gleichzeitig tausende immobilisierte Proteine in einem Experiment analysiert werden können (Bussow *et al.*, 1998). Zudem werden Proteine nachgewiesen, die durch das Vorhandensein einer humoralen Immunantwort detektiert werden und so bereits ihre Immunogenität bewiesen haben. Ein weiterer Vorteil liegt in der gleichzeitigen Generierung von Protein- und DNA-Daten (Cahill, 2001). Auf den Filtern immobilisierte Proteine, an die spezifische Antikörper aus Tumorseum binden, werden mittels Chemilumineszenz-Signalen nachgewiesen. Anhand dieser Signale ist es möglich die entsprechenden Expressionsklone zu identifizieren. Dabei können über die Expressionsklone, anhand von Sequenzierungen der Plasmid-DNA, direkt die entsprechenden Gene identifiziert werden.

Es ist allgemein bekannt, dass häufig bei der Karzinogenese Gene von Bedeutung sind, die auch entwicklungsbiologisch relevant sind (Basora *et al.*, 1998; Ioannidis *et al.*, 2003; Schor *et al.*, 1991; Shiozawa *et al.*, 1988). Sogenannte onko-fötale Gene werden spezifisch in fötalem und malignen Gewebe hochreguliert. Mit den in dieser Arbeit eingesetzten Protein-Arrays, die aus einer fötalen Expressionsbibliothek generiert wurden, konnte so ein fötales Proteinexpressionsprofil auf tumorassoziierte Proteine hin analysiert werden.

Die in-silico-Analyse von EST-Datenbanken umfasste die Analyse von aus der Datenbank ermittelten Sequenzen, die über einen RAGE-Ansatz (*random activation of gene expression*) ermittelt wurden (Harrington *et al.*, 2001).

Im Vergleich zum Ansatz der Protein-Array-Analyse wurden über die in-silico-Analyse von EST-Datenbanken Kandidaten-Sequenzen auf mRNA-Ebene ausgewählt. Der Vorteil des RAGE-Ansatzes, aus dem die in dieser Arbeit analysierten ESTs ausgewählt wurden, liegt in der Aktivierung von Genen, die in normalen Zellen gewöhnlich inaktiviert vorliegen und erst durch das Klonieren eines Promotors exprimiert werden (Harrington *et al.*, 2001). Die Insertion des Promotors führt dazu, dass stark exprimierte Gene minder stark exprimiert werden und eine Normalisierung der Transkripte auftritt. Dies hat eine Anreicherung von sonst schwer identifizierbaren Sequenzen zur Folge, deren Transkripte in normalen Zellen nicht oder vermindert nachweisbar sind und die aber möglicherweise in Tumoren exprimiert werden. Durch eine Selektion von ESTs des RAGE-Ansatzes wurde in dieser Arbeit die Auswahl auf solche RAGE-ESTs beschränkt, die in Datenbanken eine zusätzliche Expression in mindestens einer Tumorentität aufwiesen. Hierdurch wurde eine Vorauswahl getroffen, welche die Identifizierung von potentiell tumorassoziierten Kandidaten-Genen ermöglichte.

Ein Problem bei der Analyse von ESTs besteht darin, dass es sich bei diesen auch um Sequenzierungsfehler oder um Sequenzen, die mit heterologen Sequenzen, z.B. mit Vektorsequenzen, kontaminiert sind, handeln kann. Da es sich bei den ESTs in vielen Fällen um unbekannte, unvollständige und nicht näher charakterisierte Gensequenzen handelt, existieren nur wenige oder keinerlei Informationen auf Protein-Ebene. Lediglich einige der über den RAGE-Ansatz detektierten ESTs, wurden exemplarisch von Harrington auf funktionell aktive Proteine überprüft (Harrington *et al.*, 2001). Um die in dieser Arbeit identifizierten, differentiell exprimierten EST-Sequenzen immunzytologisch bzw. – histologisch zu analysieren, musste demnach erst ein Nachweis der Translation der entsprechenden Proteine erfolgen. Auf RNA-Ebene detektierte differentiell exprimierte Gene können zudem auf Protein-Ebene veränderte Expressionsprofile aufweisen, da nicht immer eine direkte Korrelation zwischen der Genaktivität und der Proteinexpression besteht.

Bezüglich der Identifizierung von noch unbekanntem Genen hat die in-silico-Analyse von EST-Datenbanken gegenüber den Protein-Arrays Vorteile. Jedoch können auch mit dieser Methode unter anderem unbekannte Gene identifiziert werden. Mit beiden Methoden ist die Detektion von Spleiß-Varianten möglich. Es wurde nachgewiesen, dass viele RAGE-EST-Sequenzen differentiell gespleißte Transkripte darstellen (Harrington *et al.*, 2001). Das Spleißen der mRNA kann zu verschiedenen Protein-Isoformen führen, die unterschiedliche chemische und



biologische Funktionen besitzen (Black, 2003). So wurde bereits nachgewiesen, dass die Expression bestimmter Spleiß-Varianten mit Tumorprogression assoziiert ist (Bartel *et al.*, 2002; Baudry *et al.*, 2002; Caballero *et al.*, 2001).

### 5.3 Bewertung der identifizierten differentiell exprimierten Gene

Mit der sensitiven Real-Time-PCR-Technik war es in der vorliegenden Arbeit möglich, Gene zu identifizieren, die eine Hochregulierung in Lungen-Adenokarzinomen oder sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinomen im Vergleich zu den korrespondierenden Normalgeweben zeigten. Die hierbei detektierten differentiell exprimierten Gene wurden als Kandidaten-Gene sowohl über den Ansatz der Protein-Array-Analyse als auch über die *in-silico*-Analyse von EST-Datenbanken identifiziert.

Es wurden sechs Gene identifiziert, die eine erhöhte Expression in Kolonkarzinomen bzw. Lungen-Adenokarzinomen aufwiesen. Für drei der sechs Kandidaten-Gene besteht bisher kein Zusammenhang zur Karzinogenese. Fünf der Gene stellen Gene ohne bekannte Funktion dar, von denen jedoch zwei Gene Hinweise auf funktionelle Eigenschaften aufgrund homologer Gene geben. Bei EST 5088 konnte im Laufe der Arbeit anhand von Datenbankeinträgen geklärt werden, dass es sich um den funktionellen GRP-Rezeptor (GRPR) handelt. Der zu Beginn der Arbeit unbekannteste EST 5412 ist heute als *SMC1L* (*structural maintenance of chromosomes 1-like 2*) ohne bekannte Funktion in der Datenbank annotiert und zeigt Homologien zu dem humanen Chromosomen-Segregations-Protein SMC1.

Die Gene „*Homo sapiens cDNA FLJ26905 (Klon RCT01427)*“ und „*Hypothetical protein FLJ13725*“, die in 50 % bzw. 40 % der kolorektalen Karzinome erhöhte Expressionen zeigten, wurden bereits in zahlreichen Normalgeweben und Tumorentitäten, darunter in Kolonkarzinomen, Adenomen und Kolonkarzinom-Zelllinien nachgewiesen, jedoch ohne bekannte Zusammenhänge zur Karzinogenese. In dieser Arbeit wurden für beide Gene in ca. der Hälfte der Kolonkarzinome eine geringe Hochregulierung oder eine Herunterregulierung im Vergleich zu Kolon-Normalgeweben detektiert. Dies lässt vermuten, dass diese Gene eher von geringer Bedeutung für die Pathogenese des sporadisch auftretenden Kolonkarzinoms sind oder aber in bestimmten Karzinom-Subtypen eine Rolle spielen. Als molekulare Diagnostik-Marker sind diese Gene nicht geeignet, da sie anhand des Expressionsnachweis zu wenige der Tumoren detektieren würden.

Für 40 % der Kolonkarzinom-Patienten konnte ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau des GRP-Rezeptors im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe gezeigt werden. Der zu



den Bombesin-ähnlichen Rezeptoren gehörende GRPR, der durch die Bindung des Liganden GRP aktiviert wird, reguliert unter anderem Proliferations- und Differenzierungsprozesse in Tumorzellen (Kroog *et al.*, 1995). Erhöhte GRPR-Expressionen wurden in Kolon-, Magen-, Lungen-, Brust- und Prostata-Karzinomen nachgewiesen (Chave *et al.*, 2000; Marktwalder und Reubi, 1999; Moody und Cuttitta, 1993; Xiao *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit detektierte Überexpression des GRPR im kolorektalen Karzinom wird qualitativ auch von einer RT-PCR-Studie bestätigt, bei der in mindestens 70 % der untersuchten Kolonkarzinome eine GRPR-Überexpression gezeigt wurde (Chave *et al.*, 2000). Nachweisbar stimuliert GRP das Wachstum von SCLC-Zellen indem es durch einen autokrinen Rückkopplungsmechanismus sowohl zu einer erhöhten GRP- als auch GRPR-Expression kommt (Carney *et al.*, 1987). Die Tatsache, dass eine Hochregulation von GRPR häufig in SCLC-Karzinomen, aber selten in anderen NSCLC-Subtypen belegt ist (Carney *et al.*, 1987), steht in Übereinstimmung zu den GRPR-Expressionsprofilen dieser Arbeit, bei denen keine erhöhte Expression in Lungen-Adenokarzinomen detektiert wurde. Die GRPR-Expressionsdaten dieser Arbeit stehen somit in Übereinstimmung mit der Literatur und belegen die Zuverlässigkeit der durchgeführten Real-Time-PCR-Technik.

Die Hochregulierung von EST 3080 in Kolonkarzinomen lag im moderaten Bereich, zwischen 2-7-fach. Jedoch wiesen 75 % der Patienten (15 von 20) eine differentielle Expression auf, so dass dieses noch unbekanntes Gen in der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms eine Rolle spielen könnte. Im Hinblick auf einen Diagnostik-Marker zeigt dieses Gen, zumindest auf RNA-Ebene, aufgrund geringer Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe eine niedrige Spezifität bezüglich der Detektion von Kolonkarzinomen.

Das Gen *SMC1L* zeigte in 4 von 5 Lungen-Adenokarzinomen eine Überexpression. In einem Gewebepaar wurde eine Herunterregulierung detektiert. *SMC1L* wird laut Datenbank in B-Zellen des Keimzentrums, in Nabelschnurblut und in Brust- sowie Testisgeweben exprimiert. SMC1-Proteine sind während der Prophase und Anaphase der Mitose spezifisch an den Kinetochoren lokalisiert und werden als integrale Komponenten der funktionellen Kinetochoren diskutiert (Gregson *et al.*, 2002). Bisher sind keine Zusammenhänge von SMC1-Proteinen mit Tumorentstehung oder -progression bekannt.

EST 5364 wies von allen identifizierten differentiell exprimierten Genen die signifikanteste Überexpression in der größtmöglichen Anzahl von Tumoren im Vergleich zu den entsprechenden Normalgeweben auf und zeigte in keinem der analysierten Gewebepaare eine Herunterregulierung.

Aufgrund dieses tumorspezifischen Expressionsprofils wurde in dieser Arbeit das noch unbekannte Gen EST 5364 für eine nachfolgende Charakterisierung ausgewählt und mit *LUMA* (*Lung Marker*) benannt.

## 5.4 Charakterisierung des bisher unbekanntes Gens *LUMA*

Die vorliegende Arbeit charakterisiert das noch unbekannte Gen *LUMA* auf molekularbiologischer und dessen Genprodukte auf Protein-Ebene.

### 5.4.1 Gen- und Proteinstruktur

Es gelang, die vollständige cDNA-Sequenz einschließlich der gesamten Genstruktur des bisher unbekanntes Gens *LUMA* zu ermitteln. Die mittels Northern Blot detektierte Größe des Transkriptes konnte durch eine „*full-length*“-Klonierung bestätigt werden. Die zwei zum Anfang der Arbeit in der Datenbank annotierten ESTs umfassten den 3'-Bereich des Gens mit einem Poly-Adenylierungssignal. Der 5'-Bereich des Gens konnte mittels der RACE-Methode und einer PCR-basierenden Bestätigung von vorhergesagten Exons dargestellt werden. So konnte das gesamte, auf Chromosom 6q21 lokalisierte Gen, das aus 16 Exons besteht, nachgewiesen werden. Eine *LUMA*-cDNA, die 3410 bp umfasst, sowie ein offener Leserahmen, beginnend bei einem Start-Codon in Exon 7, konnten identifiziert werden.

Durch Sequenzierungen zur Ermittlung der vollen Länge der *LUMA*-cDNA wurde ein komplexes Spleißmuster des Gens detektiert. Generell haben alternative Spleißereignisse zur Folge, dass der offene Leserahmen entweder *in „frame“* weitergeführt wird oder aber durch einen „*frameshift*“ verändert wird. Durch diese alternative Prozessierung können unterschiedliche Protein-Isoformen entstehen. Beim differentielles Spleißen des *LUMA*-Gens treten sowohl „*in-frame*“-Deletionen als auch „*frameshifts*“ auf. Es wurde festgestellt, dass das Herausspleißen ganzer Exons zu „*in-frame*“-Deletionen führt. Die Verwendung von alternativen Spleiß-Stellen der Exons 15 und 16 hingegen hat Verschiebungen im offenen Leserahmen zur Folge. Es fiel auf, dass vor allem im 3'-Bereich des Gens alternative Spleißereignisse auftreten, wodurch drei verschiedene Carboxy-terminale Protein-Isoformen entstehen können. Differentielles Spleißen wird als einer der Hauptmechanismen zur Entstehung der Protein-Diversität diskutiert (Modrek und Lee, 2002). Es wird geschätzt, dass bis zu 60 % oder mehr Gene des menschlichen Genoms alternativ prozessiert werden (Modrek und Lee, 2002). Spleiß-Varianten, welche die Proteinsequenz beeinflussen, sind mit einer Vielzahl von Phänomenen in Verbindung gebracht worden, die von der

Geschlechtsbestimmung bei *Drosophila*, Apoptose, Ausbildung von Synapsen und Steuerung des Axonwachstums reichen (Baker, 1989; Black und Grabowski, 2001; Black, 2003; Cartegni *et al.*, 2002). Es ist bekannt, dass Proteine mit Veränderungen in der Proteinsequenz veränderte Ligandenbindungseigenschaften, Enzymaktivitäten, allosterische Regulationseigenschaften oder Protein-Lokalisationen zur Folge haben.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Transkription des *LUMA*-Gens auch zur Translation des Proteins führt. Das bisher unbekannte humane LUMA-Protein wurde in immunhistochemischen und -zytochemischen Färbungen in Lungen-Tumorzellen und -Tumorgewebe nachgewiesen. Hierbei wurde die intrazelluläre Lokalisation gezeigt. Das humane LUMA-Protein ist im Zytoplasma lokalisiert. Dies konnte mit Antikörpern, die gegen zwei unterschiedliche Protein-Epitope gerichtet sind, belegt werden.

Ein zu *LUMA* orthologes Gen wurde im Genom von *Mus musculus* nachgewiesen. Dies konnte über murine ESTs und genomische Sequenzen identifiziert werden. Das humane *LUMA*-Gen weist ausgeprägte Homologien zu diesem murinen unbekanntem Gen auf. Bisher ist nicht bekannt, ob auch im Maus-Ortholog alternative Spleißereignisse auftreten. Anhand des identifizierten offenen Leserahmens des Maus-Gens wurde ein murines LUMA-Protein abgeleitet. Dieses ist charakterisiert durch eine verlängerte Aminosäuresequenz, die durch ein im Vergleich zum humanen Protein weiter „*upstream*“ lokalisiertes Methionin entsteht. Dennoch ist die Proteinsequenzidentität mit 62 % und die Proteinsequenzähnlichkeit mit 75 % des humanen und murinen LUMA sehr ausgeprägt und deutet auf eine Konservierung der Protein-Funktion hin. Aufgrund dieser Daten eignet sich die Maus als Tiermodell zur funktionellen Analyse des *LUMA*-Gens. Einschränkend muss jedoch angefügt werden, dass der ORF des murinen Gens durch die Verlängerung im 5'-Bereich vom humanen Gen abweicht.

Desweiteren demonstrieren orthologe Sequenzen aus *Pan troglodytes*, *Bos taurus*, *Canis familiaris* und *Rattus norvegicus* die Präsenz dieses Gens in weiteren Mammaliern. Die Analyse der identifizierten orthologen Sequenzen anderer Spezies konnte bisher jedoch noch keinen Aufschluss über die Funktion des Gens geben, da es sich bei den bisher in den Datenbanken annotierten Sequenzen um nicht näher charakterisierte ESTs oder genomische Sequenzen handelt. Homologien zu strukturellen oder funktionellen Domänen bekannter humaner Proteine konnten hingegen nicht detektiert werden. Es gibt daher bisher noch keine Hinweise auf die Zugehörigkeit von *LUMA* zu einer humanen Genfamilie. Dies ist ungewöhnlich, da die meisten Proteine einer bekannten Genfamilie angehören oder zumindest funktionelle Domänen bekannter Proteine aufweisen.

Mit Hilfe von computerbasierenden Proteinanalyseprogrammen wurde vorhergesagt, dass es sich bei den LUMA-Protein-Isoformen um lösliche Proteine handelt. Es wurden weder Konsensussequenzen für Signal-Peptide noch für Transmembran-Domänen detektiert. Eine Hydrophobizitäts-Analyse zeigte, dass zwei der drei Carboxy-terminalen Protein-Isoformen (LUMA-15A, LUMA-15B) keine stark hydrophoben Aminosäure-Bereiche aufweisen. Eine Protein-Isoform (LUMA-16A) jedoch zeigte eine hydrophobe Aminosäure-Region im C-Terminus, die durch alternatives Spleißen generiert wird, und die eine potentielle Transmembran-Domäne darstellen könnte. Die Unterschiede in der Hydrophobizitäts-Verteilung im C-Terminus der Protein-Isoformen könnte von Bedeutung sein, da es sich bei LUMA-16A möglicherweise um ein Membranprotein handelt, wohingegen LUMA-15A und LUMA-15B keine membranständigen Proteine darstellen. Dieses Phänomen wurde bereits in einer Studie festgestellt, bei der 464 humane Gene, die eine Membrandomäne kodieren und zudem alternativ gespleißt werden, im Hinblick darauf analysiert wurden, ob aufgrund der alternativen Prozessierung auch lösliche Protein-Isoformen ohne Membran-Verankerung auftreten (Xing *et al.*, 2003). Hierbei konnte in 188 Genen mindestens eine Spleiß-Variante identifiziert werden, bei der die Sequenz für die Transmembran-Domäne aufgrund des Herausspleißens eines oder mehrerer Exons fehlte. Es wurde gezeigt, dass diese Spleiß-Varianten lösliche Protein-Isoformen darstellen, die sich bezüglich der Funktion gegenüber den membrangebundenen Isoformen unterscheiden. Beispiele für solche Gene sind *CD46*, *CD38*, *Cadherin-7*, *Syndecan-4*, *MCL1* (*myeloid cell leukemia sequence 1*), *BAX* (*BCL2-associated X protein*), *BAK1* (*BCL2-antagonist/killer 1*) und der Interleukin4-Rezeptor (Kawano *et al.*, 2002; Mosley *et al.*, 1998; Tsujimura *et al.*, 2001; Xing *et al.*, 2003). Möglicherweise hat die alternative Prozessierung des *LUMA*-Gens, die zu unterschiedlichen Protein-Isoformen führt, auch eine funktionelle Diversität in Bezug auf membranständige- und lösliche Protein-Isoformen zur Folge.

Weitere Ansätze zur funktionellen Charakterisierung der LUMA-Protein-Isoformen ergaben die Präsenz von mehreren superspiralisierten Coiled-coil-Strukturen. Diese bestehen aus sich in paralleler oder antiparalleler Weise zusammengelagerten  $\alpha$ -Helices und sind Hinweise auf verschiedene funktionelle Eigenschaften von Proteinen. Proteine mit Coiled-coil-Motiven können z.B. in Signal-Transduktions- und Bewegungsprozesse oder in die mechanische Stabilität von Zellen involviert sein (Burkhard *et al.*, 2001). Durch die Superspiralisierung von  $\alpha$ -helikalen Bereichen können Dimere und Multimere gebildet werden. Unter anderem dimerisieren die Zytoskelettproteine  $\alpha$ -Keratin und Vimentin durch superspiralisierte Domänen, ebenso wie die Motorproteine Myosin, Kinesin und Dynein (Burkhard *et al.*, 2001).

Auch der bei der Fusion von Membranen ausgebildete SNARE-Komplex (*soluble NSF attachment receptor*) besteht aus  $\alpha$ -helikalen Proteinen (Dietrich *et al.*, 2003). Die vorhergesagten Coiled-coil-Strukturen in LUMA legen nahe, dass auch hier möglicherweise eine Interaktion von verschiedenen LUMA-Protein-Isoformen oder von LUMA-Protein-Isoformen mit anderen Proteinen stattfindet. Mittels des „Two-Hybrid“-Systems beispielsweise könnten Analysen zu Protein-Protein-Interaktionen durchgeführt werden, die Aufschluss über mögliche Bindungspartner der LUMA-Protein-Isoformen geben.

#### 5.4.2 RNA- und Protein-Expression

Zur eingehenden Charakterisierung des *LUMA*-Gens wurde in dieser Arbeit mittels Real-Time-PCR ein umfassendes Expressionsprofil erstellt, das die Analyse von verschiedenen alternativen Spleiß-Varianten miteinbezog. Hierbei zeigte sich, dass die Spleiß-Varianten sehr differenzierte, gewebespezifische Expressionsmuster aufwiesen. Mit Primern, die einen konstitutiven, nicht differentiell gespliceiten Bereich des Gens amplifizierten, wurde ein ubiquitäres Expressionsmuster in normalen und karzinogenen Zellen (Gewebe und Tumor-Zelllinien) detektiert (*LUMA-10*). Dies korreliert mit den Ergebnissen der Northern Blot Analyse, bei der die Sonde den entsprechenden Genbereich abdeckte. Eine ebensolches ubiquitäres Expressionsmuster in benignen und malignen Zellen wurde für das Transkript mit einer Exon 15 Deletion nachgewiesen (*LUMA-D15*). Im Gegensatz hierzu konnte für die Spleiß-Varianten *LUMA-15A* (umfasst das ganze Exon 15) und *LUMA-15B* (charakterisiert durch eine Teildeletion von Exon 15) eine auf wenige Gewebe beschränkte Expression nachgewiesen werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass diese beiden Spleiß-Varianten tumorspezifisch überexprimiert werden. Die Resultate deuten darauf hin, dass die alternative Prozessierung des Exons 15, von dem drei verschiedenen Formen detektiert wurden, eine zentrale Rolle bei der tumorspezifischen Genexpression des *LUMA*-Gens spielt.

Da nicht bei allen Genen von der Transkription auf die Translation geschlossen werden kann, wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt, um zu analysieren, ob sich die in RNA-Expressionsanalysen detektierte Überexpression von *LUMA*-Spleiß-Varianten auch auf Protein-Ebene für die entsprechenden Protein-Isoformen bestätigt. Die Abläufe in einer Zelle können, durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren, prinzipiell nicht allein aus der Analyse der Nukelinsäuren verstanden werden. Von RNA und DNA kann nur bedingt auf die Hauptfunktionsträger in der Zelle, die Proteine, geschlossen werden. Dies liegt an vielfältigen regulatorischen Rückkopplungen und posttranslationalen Ereignissen, zusätzlich spielen die

Lokalisation und das „*Trafficking*“ in der Zelle eine Rolle. Die Protein-Isoform LUMA-15A, die durch das tumorsassoziierte differentielle Spleißen des Exons 15 generiert wird, sollte mit Antikörpern gegen das davon codierte Epitop detektiert werden. Parallel hierzu wurden Antikörper generiert, die einen nicht differentiell gespleißten Bereich des LUMA-Proteins repräsentieren. Mit Hilfe von immunhistochemischen Analysen, die mit diesen Antikörpern durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass das in Lungen-Adenokarzinomen überexprimierte Transkript *LUMA-15A* auch zu einer starken Überexpression der zugehörigen Protein-Isoform führt. Analog der quantifizierten RNA-Expression wurde mit Antikörpern, die gegen ein konstitutiv auftretendes Epitop gerichtet sind (LUMA-10), eine ubiquitäre Protein-Expression in Lungen-Normal- und Tumorgewebe identifiziert.

Die Ergebnisse der LUMA-Expressionanalysen in Lungengewebe auf RNA- sowie Protein-Ebene belegen korrespondierende Expressionsprofile der verschiedenen Spleiß-Varianten, d.h. für dieses Gen besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Genaktivität und der Proteinexpression. Eine detaillierte Analyse von Bronchialkarzinomgewebe der verschiedensten Tumorstadien und Tumor-Subtypen (Adeno-, Alveolarzell-, Plattenepithel-, Anaplastische-, groß- und kleinzellige Karzinome, Karzinoide, Mesotheliome), sowie von Lungenmetastasen anderer Tumorentitäten (Brust-, Kolon-, Pankreas-, Magen-, Zervix- und Ovarkarzinom, Ewing Sarkom) konnte belegen, dass die Protein-Isoform LUMA-15A nicht nur in Adenokarzinomen, sondern in allen untersuchten Lungentumoren meist stark exprimiert wird. Die Tumorspezifität der Protein-Isoform LUMA-15A wurde desweiteren an Gewebeproben von nicht karzinogenen Lungenerkrankungen (Pneumonien, Pneumokoniosen, Fibrosen, Emphyseme, Ödeme, Bronchitis) bestätigt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass in nicht karzinogenen Lungenerkrankungen keine oder eine geringe Expression dieser Protein-Isoform vorliegt. Ebenso wurden diese Resultate an normalen Lungengewebe detektiert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in Lungen-Normalgewebe und in Gewebe von nicht karzinogenen Lungenerkrankungen keine oder eine geringe LUMA-15A-Expression vorlag, aber in Lungenkarzinomen eine deutliche Überexpression nachweisbar war. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen legen nahe, dass die Protein-Isoform LUMA-15A durch den Nachweis in den verschiedensten Bronchialkarzinom-Entitäten, von NSCL über SCLC, von allgemeiner Bedeutung für die Pathogenese im Lungenkarzinom sein könnte. Die in sämtlichen Lungenkarzinom-Subklassen detektierte LUMA-Hochregulierung ist eher ungewöhnlich, da bisher nur wenige Gene identifiziert wurden, die sowohl in SCLC als auch in NSCL eine Überexpression zeigen. Vielmehr sind Gene bekannt, die vermehrt nur in einer der



zwei Klassen oder lediglich in NSCL-Subtypen hochreguliert werden. Daten diverser cDNA-Microarray-Expressionsstudien, die an humanen Lungentumoren generiert wurden, belegen, dass divergierende Expressionsprofile zwischen den histologischen Bronchialkarzinom-Subtypen bestehen (Garber *et al.*, 2001; Sanchez-Cespedes, 2003). Beispielsweise wurde für Plattenepithelkarzinome eine starke Hochregulierung von *p53* gezeigt, die hingegen in keinem anderen Lungenkarzinom-Subtyp nachgewiesen wurde (Hibi *et al.*, 2000).

#### **5.4.3 Alternativ gespleißte LUMA-Transkripte und deren mögliche Rolle bei der Karzinogenese**

Während der Tumorentstehung und –progression können Variationen bei der alternativen Prozessierung auftreten (Caballero *et al.*, 2001).

Es wurde bereits nachgewiesen, dass lediglich bestimmte Spleiß-Varianten eines Gens, und nicht das ganze Gen, tumorspezifisch überexprimiert werden und/oder in die Tumorgenese involviert sein können. So wird das Zelloberflächen-Adhensionsmolekül CD44 in verschiedenen Spleiß-Varianten exprimiert, von denen einige mit spezifischen Tumortypen und Metastasierung assoziiert sind (Sy *et al.*, 1997). Durch die Transfektion von Tumorzellen mit einer CD44-Metastase-assoziierten Spleiß-Variante trat ein metastasierendes Verhalten der sonst nicht metastasierenden Zellen auf. Im Gegenzug konnte mit spezifischen Antikörpern gegen diese Spleiß-Variante in den Zellen ein vermindertes Metastasierungsverhalten erreicht werden (Seiter *et al.* 1993). Das Proto-Onkogen *WNT2* ist durch alternative Prozessierungsereignisse in verschiedenen Protein-Isoformen existent, von denen lediglich einige in humanen Tumorzelllinien überexprimiert werden (Katoh, 2001). Ein weiteres Beispiel für tumorassoziiertes alternatives Spleißen ist das Gen *MDM2*, dessen Proteinprodukt spezifisch an den Tumorsuppressor *p53* bindet und dessen Degradation ermöglicht (Momand *et al.*, 1992). Über 40 *MDM2*-Spleiß-Varianten wurden nachgewiesen, von denen einige erhöhte Expressionen in verschiedenen Tumortypen aufweisen und mit Tumorgenese assoziiert wurden (Bartel *et al.*, 2002). Einem Großteil der alternativ prozessierten Transkripte fehlt jedoch die Sequenz, welche die *p53*-Bindungsstelle codiert. Für diese Spleiß-Varianten werden andere, *p53*-unabhängige Funktionen vorgeschlagen, so dass derzeit die Hypothese, dass *MDM2* ein Onkogen darstellt, kontrovers diskutiert wird (Bartel *et al.*, 2002; Fridman *et al.*, 2003). In Analogie zu diesen bekannten Beispielen belegen die Expressionsstudien dieser Arbeit, dass es sich bei dem Gen *LUMA* um einen ebensolchen Mechanismus des tumorassoziierten Spleißens handelt. Es konnte gezeigt werden, dass nicht das gesamte Gen in Lungentumoren



hochreguliert wird, sondern lediglich bestimmte Spleiß-Varianten. Das differenzierte LUMA-Expressionsprofil konnte belegen, dass zwei der alternativ gespleißten Transkripte (*LUMA-15A*, *LUMA-15B*) und deren Genprodukte eine potentielle pathogenetische Rolle im Bronchialkarzinom spielen. Für die Spleiß-Variante *LUMA-15B* konnte dies auf mRNA-Ebene, für *LUMA-15A* sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene belegt werden. Ob die anderen identifizierten Spleiß-Varianten auch Proteine kodieren, und ob diese tumorassoziiert reguliert werden, kann derzeit nicht beantwortet werden und muss in weiteren Experimenten analysiert werden.

Desweiteren wurde in dieser Arbeit analysiert, ob tumorspezifisches Spleißen bei *LUMA* einen generellen Mechanismus darstellt, oder ob dieses Expressionsverhalten spezifisch in Lungengewebe auftritt. Aufgrund der detektierten tumorspezifischen *LUMA-15A*-Expression in Lungengewebe war es von Interesse, das Expressionsprofil dieser Protein-Isoform auch in weiteren Tumorentitäten zu analysieren. In der RNA-Expressionsstudie an Normalgewebe konnte das *LUMA-15A*-Transkript im Kolon nicht nachgewiesen werden. Weitere RNA-Expressionsanalysen an Kolon-Tumor- und Normalgewebe-Paaren (Daten nicht gezeigt) belegen jedoch, dass diese Spleiß-Variante in Kolon-Normal- und Tumorgewebe exprimiert wird. Diese Resultate wurden auch auf Protein-Ebene detektiert. In immunhistochemischen Analysen war eine Expression in benignen und malignen Kolongewebe detektierbar. Es ist daher eher davon auszugehen, dass *LUMA-15A* im kolorektalen Karzinom keine zentrale Bedeutung zukommt. Ebenso scheint dies, aufgrund der immunhistochemischen Expressionsstudien, für weitere Tumorentitäten wie für das Ovar-, Magen-, und Zervixkarzinom der Fall zu sein. Im Gegensatz hierzu konnte in Blasengewebe eine differentielle Expression von *LUMA-15A* nachgewiesen werden. Im Epithelgewebe von 79 % der Blasenkarzinome war diese Protein-Isoform zum Teil stark exprimiert, wohingegen in normalem Blasengewebe geringe bis keine Signale auftraten. Diese Resultate können erste Hinweise auf eine potentielle pathogenetische Bedeutung von *LUMA-15A* nicht nur für das Bronchialkarzinom, sondern auch für das Blasenkarzinom sein. Da mit 6 Blasen-Normalgewebe lediglich eine geringe Anzahl an benignen Proben analysiert wurde, müssen die Untersuchungen an einer größeren Anzahl von individuellen Gewebeproben klären, ob sich diese Vermutung auch an einem umfassenden Patientenkollektiv zeigt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass bei den bisher untersuchten Tumorentitäten eine Überexpression von *LUMA-15A* im Bronchial- und Blasenkarzinom auftritt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Spleiß-Variante *LUMA-15A* nicht in allen Tumoren

überexprimiert wird, sondern die alternative Prozessierung tumorentitätspezifisch erfolgt. Beispiele, dass Gene lediglich in bestimmten Tumorentitäten differentiell gespleißt und/oder überexprimiert werden sind bekannt. So wurde beispielsweise eine Überexpression von bestimmten Spleiß-Varianten des Gens *BRCA1* in Brust- und Ovarialkarzinomen, nicht aber in anderen Tumorentitäten nachgewiesen (Orban und Olah, 2003).

Die Kontrolle alternativer Spleißereignisse ist komplex und noch weitgehend unklar. Eine Reihe von Faktoren sind bekannt, die bei der Kontrolle eine Rolle spielen. Diese gehören größtenteils zur Gruppe der hnRNP-Proteine (*heterologous nuclear RNP proteins*), die im Kern mit primären Transkripten assoziieren und an der Bildung von RNP-Komplexen (Ribonukleoprotein-Partikel) beteiligt sind, oder zur Gruppe der SR-Proteine, die bei Überexpression das Spleißmuster verändern können (Caceres und Kornblihtt, 2002; Smith und Valcarcel, 2000). Es ist unbekannt durch welche Signaltransduktionsprozesse Spleißereignisse übertragen werden.

## **5.5 LUMA-15A als potentieller molekularer Diagnostik-Marker**

Die Auswertung der immunhistochemischen und -zytochemischen Expressions-Analysen an Lungengeweben in Bezug auf Sensitivität und Spezifität zeigen, dass LUMA-15A als potentieller Diagnostik-Marker eingesetzt werden könnte.

In der Histologie konnte dies durch eine umfassende Gewebe-Analyse von fast allen auftretenden Bronchialkarzinom-Subklassen und deren Tumorstadien, Lungenmetastasen von verschiedenen Tumorentitäten, sowie an einer großen Anzahl von Normalgeweben und Geweben von benignen Lungenerkrankungen belegt werden. Durch die Bewertung mittels eines Immuno-Score-Systems wurde auf Histologie-Ebene eine Sensitivität von 90,9 % und eine Spezifität von 95,3 % für einen möglichen LUMA-Diagnostik-Marker ermittelt. Diese Werte bewegen sich in einem Bereich, der für einen Tumormarker wünschenswert wäre. Bis heute fehlt es in der Lungenkrebs-Diagnostik an molekularen Markern, die bei den mittels Bronchoskopien entnommenen Zellmaterial spezifisch karzinogene Zellen mit hoher Sensitivität und Spezifität nachweisen (Hirsch *et al.*, 2002). Derzeit verfügbare Kandidaten-Gene können aufgrund zu geringer Sensitivität keine Anwendung als Lungenkarzinom-Diagnostik-Marker finden. In einer europäischen Studie, in der die Serum-Tumormarker CYFRA 21-1, CEA, SCCA, ProGRP und NSE miteinander verglichen wurden, zeigte CYFRA 21-1 mit 46 % die größte Sensitivität (Ebert *et al.* 1994; Wieskopf *et al.*, 1995). Erhöhte CYFRA 21-1

Expressionen wurden hierbei in 58 % der Plattenepithelkarzinome, 42 % der Adenokarzinome und 46 % der kleinzelligen Karzinome detektiert. Auch durch Kombinationen mehrerer Marker konnte keine erhöhte Sensitivität erreicht werden. Diese Marker finden daher ihre Anwendung als Verlaufskontrollen von Therapien, zur Detektion des histologischen Bronchialkarzinom-Subtyps oder zum Nachweis von Metastasen. Ob LUMA-15A auch im Blut bzw. Serum von Lungenkarzinom-Patienten spezifisch nachgewiesen werden kann, müssen weitere Analysen klären.

Um eine erste Validierung des LUMA-15A-Proteins in Bezug auf einen diagnostischen Lungen-Marker auf Zytologie-Ebene durchzuführen, wurden immunzytochemische Färbungen an zytologischem Patientenmaterial in Form von Bronchialsekreten durchgeführt. Bronchialsekrete stellen ein wichtiges Ausgangsmaterial für die Lungenkrebs-Diagnostik dar, da sie einfach, wenig invasiv und kostengünstig isoliert und analysiert werden können. Molekulare Marker können hierbei mit antikörperbasierten Methoden wie immunzytochemischen Färbungen oder, nach einem Aufschluss der Zellen, mit der ELISA-Technik nachgewiesen werden. In dieser Arbeit konnte die Protein-Isoform LUMA-15A in allen untersuchten Bronchialsekreten von Patienten mit Plattenepithel- und Adenokarzinom in Tumorzellen detektiert werden. Die Expression in Lungen-Karzinomzellen korreliert mit den histologischen Expressionsergebnissen, die an Geweben gewonnen wurden. Aufgrund nicht vorhandener Bronchialsekrete von SCLC-Patienten liegen keine Daten vor, die den LUMA-15A-Expressions-Nachweis in SCLC-Geweben auch auf Zytologie-Ebene bestätigen. Eine LUMA-15A-Expression in Alveolarmakrophagen, die aus differenzierten Monozyten entstehen und ins Lungengewebe einwandern, wurde in Bronchialsekreten von benignen und malignen Patienten detektiert und korreliert mit den Resultaten der immunhistochemischen Färbungen an Lungengeweben. Die zytologische Analyse zeigte zudem, dass in einigen Fällen eine Expression von LUMA-15A auch in normalen Zellen feststellbar war. Benigne Zylinder- und Plattenepithelzellen waren zum Teil LUMA-15A-positiv, größtenteils jedoch LUMA-15A-negativ. Die Ursache für diese teilweise in normalen Zellen auftretende LUMA-15A Expression könnte darin begründet sein, dass es beim Ablösen einzelner Zellen und der damit verbundenen Kontaktinhibition zu einer LUMA-15A Expression kommt.

Um Tumorzellen in Bronchialsekreten spezifisch detektieren zu können, wurde daher der Ansatz einer Doppelfärbung gewählt. Es konnte nachgewiesen werden, dass mit einer Doppelfärbung, bei der ein gleichzeitiger Expressionsnachweis von LUMA-15A und dem nukleär lokalisierten Protein Ki67 erfolgte, die Unterscheidung zwischen malignen Lungenkarzinomzellen und benignen Zelltypen gelingt. Dieses Resultat trat in allen

analysierten Bronchialsekreten von Patienten mit Adeno- als auch mit Plattenepithelkarzinom auf. Hierbei wurde eine Expression von LUMA-15A und Ki67 lediglich in Tumorzellen nachgewiesen. Diese ersten Ansätze auf Zytologie-Basis zeigen, dass die Spezifität eines potentiellen LUMA-Markers durch die Kombination mit einem weiteren potentiellen Marker (Ki67) erhöht wird. Ob für eine größere Anzahl dieser NSCLC-Karzinome und andere Subtypen des Lungenkarzinoms ein ebensolcher zytologischer Nachweis in Bronchialsekreten möglich ist, muss an weiteren Patientenproben analysiert werden.

Erste Ansätze in immunhistochemischen Färbungen konnten zudem eine Überexpression von LUMA-15A in Blasentumoren im Vergleich zu normalen Blasengeweben belegen. Möglicherweise führt diese Überexpression im karzinogenen Blasenepithel auch dazu, dass LUMA-15A in erhöhter Konzentration im Urin von Patienten mit Blasenkarzinom auftritt. Mittels eines diagnostischen Markers könnte der Nachweis von Blasenkarzinomzellen im Urin anhand der ELISA-Technik erfolgen. Für die Diagnose des Blasenkarzinoms stehen derzeit keine Tumormarker zur Verfügung, welche eine ausreichende Spezifität und Sensitivität erreichen (Glas *et al.*, 2003; Eissa *et al.*, 2003).

## 6 Zusammenfassung

Trotz des zunehmenden Wissens über die genomischen Abberationen und den entsprechend veränderten Genen beim kolorektalen Karzinom und Bronchialkarzinom, ist der Pathomechanismus dieser zwei Krankheiten nicht ausreichend verstanden. Die Progression von benignen Neoplasien zu malignen Tumoren wird von spezifischen Veränderungen des Genexpressionsmusters begleitet. Die Analyse der differentiellen Genexpression kann daher der Aufklärung der molekularen Mechanismen in der Pathogenese eines Tumors dienen. Zudem können tumorspezifisch überexprimierte Gene in der Krebsdiagnostik eine Anwendung als molekulare Marker finden, indem sie karzinogene Zellen nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei alternative Methoden, die Hybridisierung von Protein-Arrays und die in-silico-Analyse von EST-Datenbanken, eingesetzt, mit denen es möglich war potentiell tumorassoziierte Kandidaten-Gene zu identifizieren. Sechs der gefundenen Kandidaten-Gene konnten durch die Anwendung der Real-Time-PCR-Technik als differentiell regulierte Gene im Kolon- oder Lungenkarzinom nachgewiesen werden. Bis auf ein identifiziertes überexprimiertes Gen (*GRPR*), sind für die Gene bisher weder eine Funktion noch eine differentielle Expression detektiert worden. Aufgrund der signifikanten Überexpression in Lungen-Adenokarzinomen wurde das unbekannte Gen EST 5364 für eine nähere Charakterisierung ausgewählt und mit *LUMA* (*Lung Marker*) benannt. Die vorliegende Arbeit charakterisiert das Gen *LUMA* auf molekularbiologischer und die Genprodukte auf Protein-Ebene.

Die vollständige Länge des *LUMA*-Transkriptes konnte durch eine „full-length“-Klonierung isoliert werden und korrelierte mit der in einer Northern Blot Analyse detektierten Transkript-Größe. Anhand von Sequenzierungen konnte eine komplexe Vielfalt von alternativen *LUMA*-Spleiß-Varianten identifiziert werden, die zu drei verschiedenen Carboxy-terminalen Protein-Isoformen führen. Zu *LUMA* orthologe, bisher unbekannte Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen wurden in verschiedenen Organismen identifiziert und weisen auf eine evolutionäre Konservierung und funktionelle Bedeutung des bisher unbekanntes Gens hin. Da keine paraloge Gene ermittelt werden konnten, bestehen derzeit keine Hinweise auf die Zugehörigkeit von *LUMA* zu einer humanen Genfamilie.

Eine computerbasierende Analyse der *LUMA*-Protein-Isoformen ergab, dass es sich wahrscheinlich um lösliche Proteine handelt, die zudem Coiled-Coil-Strukturen aufweisen. Die hydrophobe Aminosäureverteilung im C-Terminus einer Spleiß-Variante (*LUMA*-16A), die

durch alternatives Spleißen generiert wird, könnte eine potentielle Transmembran-Domäne darstellen. Mit generierten polyklonalen und monoklonalen Antikörpern konnte nachgewiesen werden, dass das transkribierte Gen auch translatiert wird und, dass das LUMA-Protein im Zytoplasma lokalisiert ist.

Eine detaillierte RNA-Expressionsstudie an verschiedenen Normalgeweben, Tumor-Zelllinien und Paaren von Lungen Tumor- und Normalgeweben, konnte belegen, dass bestimmte Spleißvarianten sich in ihren Expressionsmustern unterscheiden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass zwei Spleiß-Varianten (*LUMA-15A*, *LUMA-15B*), die sich durch Sequenzunterschiede im Exon 15 auszeichnen, tumorspezifisch überexprimiert werden. Eine weitere Spleiß-Variante des Exons 15 (*LUMA-D15*) zeigte hingegen ein ubiquitäres Expressionmuster in benignen und karzinogenen Zellen. Die Resultate deuten darauf hin, dass die alternative Prozessierung des Exons 15, von dem drei verschiedenen Formen detektiert wurden, eine zentrale Rolle bei der tumorspezifischen Genexpression von *LUMA* spielt. In immunhistochemischen Analysen an Lungengeweben konnten die auf RNA-Ebene detektierten Expressionsprofile der Spleiß-Varianten auch für die entsprechenden Protein-Isoformen auf Protein-Ebene bestätigt werden.

Durch umfassende immunhistochemische Analysen an Lungengeweben wurde nachgewiesen, dass die Protein-Isoform *LUMA-15A* in sämtlichen analysierten Lungenkarzinom-Subtypen, von NSCL über SCLC, sowie in Lungemetastasen anderer Tumorentitäten meist stark exprimiert wird. Demgegenüber zeigten Lungen-Normalgewebe und Gewebeproben von nicht karzinogenen Lungenerkrankungen keine oder geringe *LUMA-15A*-Expressionen. Die Auswertung dieser Ergebnisse in Hinsicht auf einen potentiellen *LUMA*-Diagnostik-Marker zeigte, dass Werte von 90,9% für die Sensitivität und 95,3% für die Spezifität erreicht wurden. In immunhistochemischen Analysen konnte zudem eine erhöhte Expression von *LUMA-15A* in Blasenkarzinomen im Vergleich zu Blasen-Normalgeweben nachgewiesen werden.

Eine *LUMA-15*-Expression wurde auch auf zytologischer-Ebene in Zellen aus Bronchialsekreten detektiert. Durch eine Doppelfärbung von *LUMA-15A* und Ki67 war es in Bronchialsekreten von Lungenkarzinom-Patienten (Plattenepithel- und Adenokarzinom) möglich, maligne Zellen spezifisch zu identifizieren. Eine Expression von *LUMA-15A* als auch von Ki67 wurde lediglich in Tumorzellen nachgewiesen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine potentielle pathogenetische Bedeutung von *LUMA*-Spleiß-Varianten bzw. Protein-Isoformen im Bronchial- und Blasenkarzinom hin und bieten möglicherweise die Basis für die Entwicklung eines Krebs-Diagnostik-Tests.

## 7 Summary

Despite increasing knowledge of genomic aberrations and modified genes in colorectal and bronchial carcinoma, the pathogenetic mechanism of these two diseases is not sufficiently understood. The progression of benign neoplasia to malign tumours is attended by specific changes in gene expression patterns. Therefore the analysis of differential gene expression can be used to detect molecular pathogenetic mechanisms in tumourigenesis. In addition, tumour-specific overexpressed genes can find application as molecular markers in cancer diagnostics detecting malign cells.

In the present work two alternative methods were used to identify potentially tumour-associated candidate-genes: hybridisation of protein-arrays and in-silico-analysis of EST-databases. Six of the identified candidate-genes were shown to be differentially regulated genes using quantitative Real-Time-PCR-technology. Except one gene (*GRPR*), neither function nor differential expression was identified for the six analysed candidate-genes so far. Due to significant overexpression in lung-adenocarcinomas, the unknown gene EST 5364 was selected for further analysis and named *LUMA* (*Lung Marker*). The present work is characterising the molecular aspects of the gene *LUMA* and its gene products.

The complete *LUMA* transcript was isolated by full-length-cloning and correlated with the detected size of a transcript from a Northern Blot analysis. A complex variety of alternatively spliced forms of human *LUMA* was identified by sequence analysis resulting in three different carboxy-terminal protein isoforms. Unknown orthologous *LUMA* nucleotide and amino acid sequences were detectable in several organisms. This indicates the conservation and functional importance of the previously unknown gene. As no paralogous *LUMA* gene was detectable, there is no information for the membership of *LUMA* to a human gene family.

Computerbased analysis of *LUMA* protein isoforms predicted soluble proteins and calculated coiled-coil motifs. A hydrophobic amino acid distribution in the C-terminus of one spliced form (*LUMA-16A*), which is generated by alternative splicing, represents a potential transmembrane domain. By generating polyclonal and monoclonal antibodies it was shown that the transcribed gene is also translated into a protein and that the *LUMA* protein is localized in cytoplasm.

A detailed RNA-expression study of different normal tissues, tumour cell lines and pairs of lung tumour and normal tissues identified different expression patterns for various alternatively spliced transcripts. It was shown that two types of alternatively spliced forms (*LUMA-15A*,



*LUMA-15B*), characterized by differences in the exon 15 sequence, have tumour-specific expression patterns. Another alternatively spliced transcript of exon 15 (*LUMA-D15*) was found to have an ubiquitous expression in benign and malign cells. These results suggest that the alternative splicing of exon 15, which was detected in three different forms, plays a central role in the tumour-specific gene expression of *LUMA*. In immunohistochemical analyses of lung tissues the expression profiles of the alternatively spliced forms, which were detected on RNA-level, were confirmed by the corresponding protein-isoforms on protein-level.

Detailed immunohistochemistry analyses of lung tissues demonstrated a mostly strong expression of LUMA-15A in all subtypes of lung carcinomas, including NSCL and SCLC, as well as in lung metastases of other tumour entities. On the other hand, in lung normal tissues and tissues of non cancerous lung diseases none or low LUMA-15A-expression was detected. Regarding these results in relation to a potential LUMA-diagnostic-marker, values of 90,9 % for sensitivity and 95,3 % for specificity were revealed. In addition, increased expression of LUMA-15A in bladder carcinomas compared to normal bladder tissues was shown in immunohistochemical analyses.

LUMA-15A-expression was also detected on cytological-level in cells of bronchial secretion. Using double-staining of Ki67 and LUMA-15A a specific identification of malign cells in bronchial secretions of lung cancer patients (squamous cell carcinoma and adenocarcinoma) was revealed. The expression of LUMA-15A as well as of Ki67 was only demonstrated in tumour cells.

The results of the present work indicate a potential pathogenetic relevance of alternatively spliced LUMA forms and protein isoforms in bronchial and bladder carcinoma and provide a possible basis for the development of a cancer-diagnostic-test.

## 8 Referenzen

Ahlquist, D. A., Skoletsky, J. E., Boynton, K. A., Harrington, J. J., Mahoney, D. W., Pierceall, W. E., Thibodeau, S. N., und Shuber, A. P. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology*, *119*: 1219-1227, 2000.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., und Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, *25*: 3389-3402, 1997.

Alvarez-Sala, R., Prados, C., Gomez de Terreros, F. J., Blasco, R., Pino, J. M., und Gomez, L. Carcinoembryonic antigen in the diagnosis of lung cancer using bronchoalveolar lavage: a comparative study with healthy subjects, chronic bronchitis, respiratory infections and interstitial pulmonary diseases. *Int.J.Oncol.*, *6*: 1093-1098, 1995.

Baker, B. S. Sex in flies: the splice of life. *Nature*, *340*: 521-524, 1989.

Bartel, F., Taubert, H., und Harris, L. C. Alternative and aberrant splicing of MDM2 mRNA in human cancer. *Cancer Cell*, *2*: 9-15, 2002.

Basora, N., Desloges, N., Chang, Q., Bouatrouss, Y., Gosselin, J., Poisson, J., Sheppard, D., und Beaulieu, J. F. Expression of the alpha9beta1 integrin in human colonic epithelial cells: resurgence of the fetal phenotype in a subset of colon cancers and adenocarcinoma cell lines. *Int.J.Cancer*, *75*: 738-743, 1998.

Baudry, D., Faussillon, M., Cabanis, M. O., Rigolet, M., Zucker, J. M., Patte, C., Sarnacki, S., Boccon-Gibod, L., Junien, C., und Jeanpierre, C. Changes in WT1 splicing are associated with a specific gene expression profile in Wilms' tumour. *Oncogene*, *21*: 5566-5573, 2002.

Beduschi, M. C., und Oesterling, J. E. Percent free prostate-specific antigen: the next frontier in prostate-specific antigen testing. *Urology*, *51*: 98-109, 1998.

Benchimol, S., Fuks, A., Jothy, S., Beauchemin, N., Shirota, K., und Stanners, C. P. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell*, *57*: 327-334, 1989.

Berger, B., Wilson, D. B., Wolf, E., Tonchev, T., Milla, M., und Kim, P. S. Predicting coiled coils by use of pairwise residue correlations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *92*: 8259-8263, 1995.

Bertioli, D. Rapid amplification of cDNA ends. *Methods Mol.Biol.*, *67*: 233-238, 1997.

Bishop, J. M. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, *64*: 235-248, 1991.

Black, D. L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu.Rev.Biochem.*, *72*: 291-336, 2003.

Black, D. L., und Grabowski, P. J. Alternative pre-mRNA splicing and neuronal function. *Prog.Mol.Subcell.Biol.*, *31*: 187-216, 2003.

Bos, J.L. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.*, *49*: 4682-4689, 1989.

- Brambilla, C., Fievet, F., Jeanmart, M., de Fraipont, F., Lantuejoul, S., Frappat, V., Ferretti, G., Brichon, P. Y., und Moro-Sibilot, D. Early detection of lung cancer: role of biomarkers. *Eur.Respir.J.Suppl*, 39: 36s-44s, 2003.
- Brescia, F. J. Lung cancer-a philosophical, ethical, and personal perspective. *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, 40: 139-148, 2001.
- Bronner, C. E., Baker, S. M., Morrison, P. T., Warren, G., Smith, L. G., Lescoe, M. K., Kane, M., Earabino, C., Lipford, J., und Lindblom, A. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*, 368: 258-261, 1994.
- Brown, D. C., und Gatter, K. C. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology*, 40: 2-11, 2002.
- Burke, D., und Allen-Mersh, T. G. Colorectal liver metastases. *Postgrad.Med.J.*, 72: 464-469, 1996.
- Burkhard, P., Stetefeld, J., und Strelkov, S. V. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.*, 11: 82-88, 2001.
- Bussow, K., Cahill, D., Nietfeld, W., Bancroft, D., Scherzinger, E., Lehrach, H., und Walter, G. A. Method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library. *Nucleic Acids Res.*, 26: 5007-5008, 1998.
- Bustin, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J.Mol.Endocrinol.*, 25: 169-193, 2000.
- Caballero, O. L., de Souza, S. J., Brentani, R. R., und Simpson, A. J. Alternative spliced transcripts as cancer markers. *Dis.Markers*, 17: 67-75, 2001.
- Caceres, J. F., und Kornblihtt, A. R. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet.*, 18: 186-193, 2002.
- Cahill, D. J. Protein and antibody arrays and their medical applications. *J.Immunol.Methods*, 250: 81-91, 2001.
- Caplan, A., und Kratz, A. Prostate-specific antigen and the early diagnosis of prostate cancer. *Am.J.Clin.Pathol.*, 117 *Suppl*: S104-S108, 2002.
- Carbone, D. P. The biology of lung cancer. *Semin.Oncol.*, 24: 388-401, 1997.
- Carney, D. N., Cuttitta, F., Moody, T. W., und Minna, J. D. Selective stimulation of small cell lung cancer clonal growth by bombesin and gastrin-releasing peptide. *Cancer Res.*, 47: 821-825, 1987.
- Carney, D. N., Gazdar, A. F., Bepler, G., Guccion, J. G., Marangos, P. J., Moody, T. W., Zweig, M. H., und Minna, J. D. Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer Res.*, 45: 2913-2923, 1985.
- Cartegni, L., Chew, S. L., und Krainer, A. R. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat.Rev.Genet.*, 3: 285-298, 2002.

- Charames, G. S., und Bapat, B. Genomic instability and cancer. *Curr.Mol.Med.*, 3: 589-596, 2003.
- Chave, H. S., Gough, A. C., Palmer, K., Preston, S. R., und Primrose, J. N. Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa. *Br.J.Cancer*, 82: 124-130, 2000.
- Chino, O., Kijima, H., Shimada, H., Nishi, T., Tanaka, H., Kise, Y., Kenmochi, T., Himeno, S., Machimura, T., Tanaka, M., Inokuchi, S., Tajima, T., Osamura, R. Y., und Makuuchi, H. Accumulation of p53 in esophageal squamous cell carcinoma. *Int.J.Mol.Med.*, 8: 359-363, 2001.
- Cooke, T., Reeves, J., Lanigan, A., und Stanton, P. HER2 as a prognostic and predictive marker for breast cancer. *Ann.Oncol.*, 12 *Suppl 1*: S23-S28, 2001.
- Curran, T., und Franza, B.R. Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell*, 55: 395-397, 1988.
- De Pinho, R., Mitschke, L., Hatton, K., Ferrier, P., Zimmerman, K., Legouy, E., Tesfaye, A., Collum, R., Yancopoulos, G., und Nisen, P. Myc family of cellular oncogenes. *J.Cell Biochem.*, 33: 257-66, 1987.
- Devereux, J., Haerberli, P., und Smithies, O. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.*, 12: 387-395, 1984.
- Di Bisceglie, A. M., Carithers, R. L., Jr., und Gores, G. J. Hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 28: 1161-1165, 1998.
- Dienemann, H., Stieber, P., und Zimmermann, A. Tumormarker CYFRA 21-1 in non small lung cancer (NSCLC): Role for detection of recurrence. *Lung Cancer*, 11: 46-53, 1994.
- Dietrich, L. E., Boeddinghaus, C., La Grassa, T. J., und Ungermann, C. Control of eukaryotic membrane fusion by N-terminal domains of SNARE proteins. *Biochim.Biophys.Acta.*, 18: 1641-1643, 2003.
- Drewinko, B., Yang, L. Y., Barlogie, B., Romsdahl, M., Meistrich, M., Malahy, M. A., und Giovanella, B. Further biologic characteristics of a human carcinoembryonic antigen-producing colon carcinoma cell line. *J.Natl.Cancer Inst.*, 61: 75-83, 1978.
- Ebert, W., Dienemann, H., Fateh-Moghadam, A., Scheulen, M., Konietzko, N., Schleich, T., und Bombardieri, E. Cytokeratin 19 fragment CYFRA 21-1 compared with carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen and neuron-specific enolase in lung cancer. Results of an international multicentre study. *Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem.*, 32: 189-199, 1994.
- Eddy, D. M. Screening for lung cancer. *Ann.Intern.Med.*, 112: 73-74, 1990.
- Eissa, S., Kassim, S., und El-Ahmady, O. Detection of bladder tumours: role of cytology, morphology-based assays, biochemical and molecular markers. *Curr.Opin.Obstet.Gynecol.*, 15: 395-403, 2003.
- Etzioni, R., Urban, N., Ramsey, S., McIntosh, M., Schwartz, S., Reid, B., Radich, J., Anderson, G., und Hartwell, L. The case for early detection. *Nat.Rev.Cancer*, 3: 243-252, 2003.

- Fearon, E. R., und Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61: 759-767, 1990.
- Fishel, R., Lescoe, M. K., Rao, M. R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Garber, J., Kane, M., und Kolodner, R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, 75: 1027-1038, 1993.
- Fridman, J.S., Hernando, E., Hemann, M.T., de Stanchina, E., Cordon-Cardo, C., und Lowe, S.W. Tumor promotion by Mdm2 splice variants unable to bind p53. *Cancer Res.*, 63: 5703-5706, 2003.
- Frohman, M. A., Dush, M. K., und Martin, G. R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 85: 8998-9002, 1988.
- Fry, W. A., Phillips, J. L., und Menck, H. R. Ten-year survey of lung cancer treatment and survival in hospitals in the United States: a national cancer data base report. *Cancer*, 86: 1867-1876, 1999.
- Fujiyama, S., Tanaka, M., Maeda, S., Ashihara, H., Hirata, R., und Tomita, K. Tumor markers in early diagnosis, follow-up and management of patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology*, 62 *Suppl 1*: 57-63, 2002.
- Garber, M. E., Troyanskaya, O. G., Schluens, K., Petersen, S., Thaesler, Z., Pacyna-Gengelbach, M., van de Rijn, M., Rosen, G. D., Perou, C. M., Whyte, R. I., Altman, R. B., Brown, P. O., Botstein, D., und Petersen, I. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc.Natl.Acad.Sci. U S A*, 98: 13784-13789, 2001.
- Gazdar, A. F., Carney, D. N., Russell, E. K., Sims, H. L., Baylin, S. B., Bunn, P. A., Jr., Guccion, J. G., und Minna, J. D. Establishment of continuous, clonable cultures of small-cell carcinoma of lung which have amine precursor uptake and decarboxylation cell properties. *Cancer Res.*, 40: 3502-3507, 1980.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., und Parks, W. P. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J.Natl.Cancer Inst.*, 51: 1417-1423, 1973.
- Gibson, U. E., Heid, C. A., und Williams, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.*, 6: 995-1001, 1996.
- Glas, A. S., und Roos, D., Deutekom, M., Zwinderman, A. H., Bossuyt, P. M., und Kurth, K. H. Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review. *J.Urol.*, 169:1975-1982, 2003.
- Goessl, C. Noninvasive molecular detection of cancer - the bench and the bedside. *Curr.Med.Chem.*, 10: 691-706, 2003.
- Gold, P., und Freedman, S. O. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J.Exp.Med.*, 122: 467-481, 1965.
- Gregson, H. C., Van Hooser, A. A., Ball, A. R., Jr., Brinkley, B. R., und Yokomori, K. Localization of human SMC1 protein at kinetochores. *Chromosome.Res.*, 10: 267-277, 2002.

- Gupta, S., Bent, S., und Kohlwes, J. Test characteristics of alpha-fetoprotein for detecting hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C. A systematic review and critical analysis. *Ann.Intern.Med.*, 139: 46-50, 2003.
- Hammarstrom, S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin.Cancer Biol.*, 9: 67-81, 1999.
- Hanahan, D., und Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70, 2000.
- Harrington, J. J., Sherf, B., Rundlett, S., Jackson, P. D., Perry, R., Cain, S., Leventhal, C., Thornton, M., Ramachandran, R., Whittington, J., Lerner, L., Costanzo, D., McElligott, K., Boozer, S., Mays, R., Smith, E., Veloso, N., Klika, A., Hess, J., Cothren, K., Lo, K., Offenbacher, J., Danzig, J., und Ducar, M. Creation of genome-wide protein expression libraries using random activation of gene expression. *Nat.Biotechnol.*, 19: 440-445, 2001.
- Herwig, R., Poustka, A. J., Muller, C., Bull, C., Lehrach, H., und O'Brien, J. Large-scale clustering of cDNA-fingerprinting data. *Genome Res.*, 9: 1093-1105, 1999.
- Hibi, K., Trink, B., Patturajan, M., Westra, W. H., Caballero, O. L., Hill, D. E., Ratovitski, E. A., Jen, J., und Sidransky, D. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U S A*, 97: 5462-5467, 2000.
- Hirsch, F. R., Bunn, P. A., Jr., Dmitrovsky, E., Field, J. K., Franklin, W. A., Greenberg, R. E., Hansen, H. H., Henschke, C. I., Rigas, J. R., Smith, R. A., Toennesen, P., und Mulshine, J. L. IV international conference on prevention and early detection of lung cancer, Reykjavik, Iceland, August 9-12, 2001. *Lung Cancer*, 37: 325-344, 2002.
- Hockenbery, D.M. The bcl-2 oncogene and apoptosis. *Semin.Immunol.*, 4: 413-420, 1992.
- Holt, L. J., Bussow, K., Walter, G., und Tomlinson, I. M. By-passing selection: direct screening for antibody-antigen interactions using protein arrays. *Nucleic Acids Res.*, 28: E72, 2000.
- Hunter, T. Cooperation between oncogenes. *Cell*, 64: 249-270, 1991.
- Iida, Y. Quantification analysis of 5'-splice signal sequences in mRNA precursors. Mutations in 5'-splice signal sequence of human beta-globin gene and beta-thalassemia. *J.Theor.Biol.*, 145: 523-533, 1990.
- Ioannidis, P., Mahaira, L., Papadopoulou, A., Teixeira, M. R., Heim, S., Andersen, J. A., Evangelou, E., Dafni, U., Pandis, N., und Trangas, T. CRD-BP: a c-Myc mRNA stabilizing protein with an oncofetal pattern of expression. *Anticancer Res.*, 23: 2179-2183, 2003.
- Johnson, P. J. The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. *Clin.Liver Dis.*, 5: 145-159, 2001.
- Kastrinakis, W. V., Ramchurren, N., Rieger, K. M., Hess, D. T., Loda, M., Steele, G., und Summerhayes, I. C. Increased incidence of p53 mutations is associated with hepatic metastasis in colorectal neoplastic progression. *Oncogene*, 11: 647-652, 1995.



- Kato, I., Severson, R. K., und Schwartz, A. G. Conditional median survival of patients with advanced carcinoma: surveillance, epidemiology, and end results data. *Cancer*, 92: 2211-2219, 2001.
- Katoh, M. Differential regulation of WNT2 and WNT2B expression in human cancer. *Int.J.Mol.Med.*, 8: 657-660, 2001.
- Kawano, R., Matsuo, N., Tanaka, H., Nasu, M., Yoshioka, H., und Shirabe, K. Identification and characterization of a soluble cadherin-7 isoform produced by alternative splicing. *J.Biol.Chem.*, 277: 47679-47685, 2002.
- Kearney, J. F., Radbruch, A., Liesegang, B., und Rajewsky, K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J.Immunol.*, 123: 1548-1550, 1979.
- Khleif, S. N., DeGregori, J., Yee, C. L., Otterson, G. A., Kaye, F. J., Nevins, J. R., und Howley, P. M. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 93: 4350-4354, 1996.
- Kinzler, K. W., Nilbert, M. C., Su, L. K., Vogelstein, B., Bryan, T. M., Levy, D. B., Smith, K. J., Preisinger, A. C., Hedge, P., und McKechnie, D. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*, 253: 661-665, 1991.
- Klaes, R., Friedrich, T., Spitzkovsky, D., Ridder, R., Rudy, W., Petry, U., Dallenbach-Hellweg, G., Schmidt, D., und von Knebel Doeberitz, M. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int.J.Cancer*, 92: 276-284, 2001.
- Kroog, G. S., Jensen, R. T., und Battey, J. F. Mammalian bombesin receptors. *Med.Res.Rev.*, 15: 389-417, 1995.
- Kyte, J., und Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J.Mol.Biol.*, 157: 105-132, 1982.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- Lee, L. G., Connell, C. R., und Bloch, W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.*, 21: 3761-3766, 1993.
- Leibovitz, A., Stinson, J. C., McCombs, W. B., III, McCoy, C. E., Mazur, K. C., und Mabry, N. D. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.*, 36: 4562-4569, 1976.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., und Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396: 643-649, 1998.
- Mamula, M. J., Gee, R. J., Elliott, J. I., Sette, A., Southwood, S., Jones, P. J., und Blier, P. R. Isoaspartyl post-translational modification triggers autoimmune responses to self-proteins. *J.Biol.Chem.*, 274: 22321-22327, 1999.



- Maniatis, T., Fritsch, E. F., und Sambrook J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- Markwalder, R., und Reubi, J. C. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. *Cancer Res.*, 59: 1152-1159, 1999.
- McWilliams, A., und Lam, S. New approaches to lung cancer prevention. *Curr.Oncol.Rep.*, 4: 487-494, 2002.
- Menard, S., Pupa, S. M., Campiglio, M., und Tagliabue, E. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. *Oncogene*, 22: 6570-6578, 2003.
- Merrill, R. M., Henson, D. E., und Ries, L. A. Conditional survival estimates in 34,963 patients with invasive carcinoma of the colon. *Dis.Colon Rectum*, 41: 1097-1106, 1998.
- Mills, N. E., Fishman, C. L., Scholes, J., Anderson, S. E., Rom, W. N., und Jacobson, D. R. Detection of K-ras oncogene mutations in bronchoalveolar lavage fluid for lung cancer diagnosis. *J.Natl.Cancer Inst.*, 87: 1056-1060, 1995.
- Mizejewski, G. J. Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)*, 226: 377-408, 2001.
- Modrek, B., und Lee, C. A genomic view of alternative splicing. *Nat.Genet.*, 30: 13-19, 2002.
- Molina, R., Jo, J., Filella, X., Zanon, G., Farrus, B., Munoz, M., Latre, M. L., Pahisa, J., Velasco, M., Fernandez, P., Estape, J., und Ballesta, A. M. C-erbB-2, CEA and CA 15.3 serum levels in the early diagnosis of recurrence of breast cancer patients. *Anticancer Res.*, 19: 2551-2555, 1999.
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., und Levine, A. J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69: 1237-1245, 1992.
- Moody, T. W., und Cuttitta, F. Growth factor and peptide receptors in small cell lung cancer. *Life Sci.*, 52: 1161-1173, 1993.
- Mosley, B., Beckmann, M. P., March, C. J., Idzerda, R. L., Gimpel, S. D., VandenBos, T., Friend, D., Alpert, A., Anderson, D., und Jackson, J. The murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms. *Cell*, 59: 335-348, 1989.
- Mulshine, J. L., und Smith, R. A. Lung cancer. 2: screening and early diagnosis of lung cancer. *Thorax*, 57: 1071-1078, 2002.
- Ohara, O., Dorit, R. L., und Gilbert, W. One-sided polymerase chain reaction: the amplification of cDNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 86: 5673-5677, 1989.
- Old, L. J., und Chen, Y. T. New paths in human cancer serology. *J.Exp.Med.*, 187: 1163-1167, 1998.
- Orban, T. I., und Olah, E. Emerging roles of BRCA1 alternative splicing. *Mol.Pathol.*, 56: 191-197, 2003.

- Ostermeyer, A. G., Runko, E., Winkfield, B., Ahn, B., und Moll, U. M. Cytoplasmically sequestered wild-type p53 protein in neuroblastoma is relocated to the nucleus by a C-terminal peptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 93: 15190-15194, 1996.
- Partin, A. W., Catalona, W. J., Southwick, P. C., Subong, E. N., Gasiorn, G. H., und Chan, D. W. Analysis of percent free prostate-specific antigen (PSA) for prostate cancer detection: influence of total PSA, prostate volume, and age. *Urology*, 48: 55-61, 1996.
- Picardo, A. L., Diez, M., Torres, A., Maestro, M., Ortega, D., Hernando, F., Gomez, A., Garcia-Asenjo, J., und Balibrea, J. L. Analysis of the prognostic significance of cytosolic determination of CA 125 tumor-associated antigen, carcinoembryonic antigen and squamous cell carcinoma antigen in patients with non small cell lung carcinoma. *Cancer*, 77: 1066-1072, 1996.
- Quaranta, V., und Giannelli, G. Cancer invasion: watch your neighbourhood! *Tumori.*, 89: 343-348, 2003.
- Rakowicz-Szulczynska, E., Mozdzanowski, J., Lundberg, T., Kaczmarek, W., und Speicher, D. Gamma-interferon-induced nerve growth factor receptors in colorectal carcinoma cell lines. *Growth Factors*, 6: 337-346, 1992.
- Rivera, M. P., Detterbeck, F., und Mehta, A. C. Diagnosis of lung cancer: the guidelines. *Chest*, 123: 129S-136S, 2003.
- Rocco, J. W., und Sidransky, D. p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp.Cell Res.*, 264: 42-55, 2001.
- Roth, J. A. Molecular events in lung cancer. *Lung Cancer*, 12 Suppl 2: S3-15, 1995.
- Rotman, G., und Shiloh, Y. ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene*, 18: 6135-6144, 1999.
- Ruibal, M. A. CEA serum levels in non-neoplastic disease. *Int.J.Biol.Markers*, 7: 160-166, 1992.
- Rye, H. S., Yue, S., Wemmer, D. E., Quesada, M. A., Haugland, R. P., Mathies, R. A., und Glazer, A. N. Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications. *Nucleic Acids Res.*, 20: 2803-2812, 1992.
- Sahin, U., Tureci, O., und Pfreundschuh, M. Serological identification of human tumor antigens. *Curr.Opin.Immunol.*, 9: 709-716, 1997.
- Sanchez-Cespedes, M. Dissecting the genetic alterations involved in lung carcinogenesis. *Lung Cancer*, 40:111-121, 2003.
- Sano, T., Oyama, T., Kashiwabara, K., Fukuda, T., und Nakajima, T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am.J.Pathol.*, 153: 1741-1748, 1998.

- Schor, S. L., Grey, A. M., Picardo, M., Schor, A. M., Howell, A., Ellis, I., und Rushton, G. Heterogeneity amongst fibroblasts in the production of migration stimulating factor (MSF): implications for cancer pathogenesis. *EXS*, 59: 127-146, 1991.
- Screaton, R. A., Penn, L. Z., und Stanners, C. P. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, cooperates with Myc and Bcl-2 in cellular transformation. *J.Cell Biol.*, 137: 939-952, 1997.
- Seiter, S., Arch, R., Reber, S., Komitowski, D., Hofmann, M., Ponta, H., Herrlich, P., Matzku, S., und Zoller, M. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J.Exp.Med.*, 177: 443-455, 1993.
- Sherman, M. Alphafetoprotein: an obituary. *J.Hepatol.*, 34: 603-605, 2001.
- Shiozawa, M., Ochiya, T., Hatada, I., Imamura, T., Okudaira, Y., Hiraoka, H., und Matsubara, K. The lca as an onco-fetal gene: its expression in human fetal liver. *Oncogene*, 2: 523-526, 1988.
- Smith, C. W., und Valcarcel, J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem.Sci.*, 25: 381-388, 2000.
- Stenman, U. H., Leinonen, J., Alfthan, H., Rannikko, S., Tuhkanen, K., und Alfthan, O. A complex between prostate-specific antigen and alpha 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Res.*, 51: 222-226, 1991.
- Stephan, C., Jung, K., Lein, M., Sinha, P., Schnorr, D., und Loening, S. A. Molecular forms of prostate-specific antigen and human kallikrein 2 as promising tools for early diagnosis of prostate cancer. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 9: 1133-1147, 2000.
- Stieber, P., Dienemann, H., Schalhorn, A., Schmitt, U. M., Reinmiedl, J., Hofmann, K., und Yamaguchi, K. Pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP)--a useful marker in small cell lung carcinomas. *Anticancer Res.*, 19: 2673-2678, 1999.
- Sutedja, G. New techniques for early detection of lung cancer. *Eur.Respir.J.Suppl*, 39: 57s-66s, 2003.
- Sy, M. S., Mori, H., und Liu, D. CD44 as a marker in human cancers. *Curr.Opin.Oncol.*, 9: 108-112, 1997.
- Tai, P., Tonita, J., Yu, E., und Skarsgard, D. Twenty-year follow-up study of long-term survival of limited-stage small-cell lung cancer and overview of prognostic and treatment factors. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.*, 56: 626-633, 2003.
- Thunnissen, F. B. Sputum examination for early detection of lung cancer. *J.Clin.Pathol.*, 56: 805-810, 2003.
- Tom, B. H., Rutzky, L. P., Oyasu, R., Tomita, J. T., Goldenberg, D. M., und Kahan, B. D. Human colon adenocarcinoma cells. II. Tumorigenic and organoid expression in vivo and in vitro. *J.Natl.Cancer Inst.*, 58: 1507-1512, 1977.

Towler, B., Irwig, L., Glasziou, P., Kewenter, J., Weller, D., und Silagy, C. A systematic review of the effects of screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, hemoccult. *BMJ*, 317: 559-565, 1998.

Toyooka, M., Konishi, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Iwama, T., und Miyaki, M. Somatic mutations of the adenomatous polyposis coli gene in gastroduodenal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res.*, 55: 3165-3170, 1995.

Trevisani, F., D'Intino, P. E., Morselli-Labate, A. M., Mazzella, G., Accogli, E., Caraceni, P., Domenicali, M., De Notariis, S., Roda, E., und Bernardi, M. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *J.Hepatol.*, 34: 570-575, 2001.

Tsujimura, A., Nunoue, K., Inoue, N., Shida, K., Kurita-Taniguchi, M., Matsumoto, M., Nomura, M., Takeya, T., und Seya, T. Three soluble form messages of murine CD46 are produced through alternative mRNA splicing. *J.Biochem.(Tokyo)*, 130: 841-848, 2001.

Van Cangh, P. J., De Nayer, P., De Vischer, L., Sauvage, P., Tombal, B., Lorge, F., Wese, F. X., und Opsomer, R. Free to total prostate-specific antigen (PSA) ratio improves the discrimination between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia (BPH) in the diagnostic gray zone of 1.8 to 10 ng/mL total PSA. *Urology*, 48: 67-70, 1996.

Varley, J. M., Brammar, W. J., Lane, D. P., Swallow, J. E., Dolan, C., und Walker, R. A. Loss of chromosome 17p13 sequences and mutation of p53 in human breast carcinomas. *Oncogene*, 6: 413-421, 1991.

Vashi, A. R., Wojno, K. J., Henricks, W., England, B. A., Vessella, R. L., Lange, P. H., Wright, G. L., Jr., Schellhammer, P. F., Weigand, R. A., Olson, R. M., Dowell, B. L., Borden, K. K., und Oesterling, J. E. Determination of the "reflex range" and appropriate cutpoints for percent free prostate-specific antigen in 413 men referred for prostatic evaluation using the AxSYM system. *Urology*, 49: 19-27, 1997.

Verma, M., und Srivastava, S. New cancer biomarkers deriving from NCI early detection research. *Recent Results Cancer Res.*, 163: 72-84, 2003.

Vogelstein, B., Lane, D., und Levine, A. J. Surfing the p53 network. *Nature*, 408: 307-310, 2000.

von Knebel Doeberitz, M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur.J.Cancer*, 38: 2229-42, 2002.

Weston, K.M. The myb genes. *Semin.Cancer Biol.*, 1: 371-382, 1990.

Wieskopf, B., Demangeat, C., Purohit, A., Stenger, R., Gries, P., Kreisman, H., und Quoix, E. Cyfra 21-1 as a biologic marker of non-small cell lung cancer. Evaluation of sensitivity, specificity, and prognostic role. *Chest*, 108: 163-169, 1995.

Woodrum, D. L., Brawer, M. K., Partin, A. W., Catalona, W. J., und Southwick, P. C. Interpretation of free prostate specific antigen clinical research studies for the detection of prostate cancer. *J.Urol.*, 159: 5-12, 1998.

Wulfskuhle, J. D., Liotta, L. A., und Petricoin, E. F. Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat.Rev.Cancer*, 3: 267-275, 2003.

Xiao, D., Wang, J., Hampton, L. L., und Weber, H. C. The human gastrin-releasing peptide receptor gene structure, its tissue expression and promoter. *Gene*, 264: 95-103, 2001.

Xing, Y., Xu, Q., und Lee, C. Widespread production of novel soluble protein isoforms by alternative splicing removal of transmembrane anchoring domains. *FEBS Lett.*, 555: 572-578, 2003.

Yamasaki, L. Role of the RB tumor suppressor in cancer. *Cancer Treat.Res.*, 115: 209-239, 2003.

Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V. E., Kern, S. E., Hruban, R. H., Hamilton, S. R., Vogelstein, B., und Kinzler, K. W. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science*, 276: 1268-1272, 1997.

## 9 Abkürzungen

A	Adenin
A	Alanin
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C	Cystein
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CIN	engl., cervical intraepithelial neoplasia
CT	Computer-Tomographie
C <sub>T</sub>	engl., Treshold Cycle
CTP	Cytosintriphosphat
d	desoxy
D	Asparginsäure
DAB	Diaminobenzidin
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DNTB	5'5-Dithio-bis2-Nitrobensoicacid
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ELISA	engl., enzyme-linked immunosorbent assay
engl.	Englisch
EST	engl., expressed sequence tag
et al.	et alii
etc.	et cetera
f	frei
F	Fluoreszenzintensität
F	Phenylalanin
FAP	engl., familial adenomatous polyposis
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FOBT	engl., fecal occult blood test
g	Gramm
G	Glycin
G	Guanin
GTP	Guanintriphosphat
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase
HNPCC	engl., hereditary non-polyposis colorectal cancer
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

---

H	Hypoxanthin
I	Isoleucin
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-beta-D-Thiogalactosid
k	Kilo
K	Lysin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
L	Leucin
m	milli
M	Methionin
M	Molar
MHC	engl., major histocompatibility complex
min	Minute
MIN	Mikrosatelliteninstabilität
mRNA	Boten-RNA
MTA	engl., multi tissue array
n	Anzahl der Fälle
N	Aspargin
NSCLC	engl., non small cell lung cancer
OD	optische Dichte
ORF	engl., open reading frame
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylen-Glykol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Arginin
RACE	engl., rapid amplification of cDNA ends
RAGE	engl., random activation of gene expression
RAYS	engl., recombinant antigen expression on yeast surface
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
S	Serin
SCLC	engl., small cell lung cancer
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde
t	total
T	Threonin
T	Thymidin
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TTP	Thymidintriphosphat
UTR	untranslatierte Region
V	Valin
vgl.	vergleiche
X <sub>R</sub>	relative Expression



Y Tyrosin  
z.B. zum Beispiel

## 10 Danksagung

Ich danke Herrn Dr. Peter Pack und Herrn Dr. Rüdiger Ridder für die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit bei der mtm laboratories AG und der Überlassung des Themas.

Bei Herrn Professor Dr. S. Dübel und Herrn Professor Dr. W. Buselmaier möchte ich mich herzlich für das Interesse und die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Professor Dr. Magnus von Knebel Doeberitz danke ich herzlich für die Unterstützung und das Interesse an dieser Arbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern der mtm laboratories AG für Hilfsbereitschaft, Kollegialität und gute Zusammenarbeit. Herrn Dr. Marcus Trunk-Gehmacher danke ich für die pathologische Begutachtung der immunhistologischen und -zytologischen Färbungen sowie Frau Heidi Lang für ihr Know-How und ihren Einsatz bei der Etablierung der Doppelfärbung. Ich danke Herrn Dr. Wolfgang Rudy für fachliche und persönliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Johannes Coy für die außergewöhnlich persönlich-fachliche Betreuung, umfassende Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der Anfertigung dieser Arbeit.