

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

vorgelegt von
Diplom-Biologin Kerstin Weigl
aus Mannheim
2001

**Systematische Analyse der
Genexpressionsmuster in epithelialen
Ovarialkarzinomen durch Differential Display**

Gutachter: Prof. Dr. Ekkehard K. F. Bautz
Prof. Dr. Herwig Ponstingl

Die vorliegende Arbeit wurde im Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, Abteilung „Molekulare Biologie der Mitose“ in der Zeit von April 1998 bis März 2001 unter Anleitung von Prof Dr. Herwig Ponstingl ausgeführt.

Bei Herrn Prof. Dr. Ponstingl bedanke ich mich ganz herzlich für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien sowie für die gewährte Freiheit bei der Durchführung dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bautz, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, diese Arbeit vor der Fakultät zu vertreten.

Vielen Dank für die Asservation der Gewebe an die klinischen Kooperationspartner der Universitäts Frauenkliniken in Heidelberg und Tübingen, insbesondere an Herrn Dr. U. Hahn (Heidelberg), Herrn Dr. R. Kurek (Tübingen), Herrn Dr. A. Marmé (Heidelberg), Herrn Prof. Dr. G. Bastert (Heidelberg) und Herrn Prof. Dr. D. Wallwiener (Tübingen).

Auch bei Herrn PD Dr. H.-P. Sinn möchte ich mich für die Aufarbeitung der histologischen Präparate herzlich bedanken.

Für die immerwährende und oft genutzte Diskussionsbereitschaft, für zahlreiche Anregungen und die sehr hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit möchte ich mich in besonderer Weise bei Herrn Dr. Hans-Peter Zimmermann bedanken.

Danke auch an Olga Mezler und Claudia Müller für ihre Hilfsbereitschaft, die den Laboralltag erleichtert hat.

Herr PD Dr. Ralf Bischoff gab mir viele Tips in Fragen der Proteinchemie und Jürgen Kretschmer half mir bei deren Umsetzung. Vielen Dank dafür.

Herrn Andreas Hunziker danke ich für die schnelle und genaue Sequenzierung der DNAs und Herrn Dr. Rüdiger Pipkorn für die Herstellung meiner Peptide.

Für die kritische und konstruktive Durchsicht des Manuskripts und viele hilfreiche Anregungen danke ich Sandra Kneißel und Herrn Dr. Hans-Peter Zimmermann.

Danke allen anderen Mitarbeitern des Labors. Die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit waren stets sehr hilfreich.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Hagen und seinen Eltern bedanken, die mich während der gesamten Zeit in jeder erdenklichen Weise unterstützten.

Für Hagen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Risikofaktoren für die Entstehung von Ovarialkarzinomen	1
1.1.1	Genetische Faktoren	1
1.1.2	Endokrine Faktoren	2
1.1.3	Umweltfaktoren	2
1.1.4	Molekulare Risikofaktoren	3
1.2	Metastasierung und Therapie	5
1.3	Zielsetzung	6
2	Material	9
2.1	Chemikalien.....	9
2.2	Reaktions-Kits, Bibliotheken und Fertiglösungen.....	10
2.3	Verbrauchsmaterial	11
2.4	Laborgeräte	11
2.5	Enzyme und Marker	12
2.6	E.coli-Stämme	12
2.7	cDNA-Bibliotheken	13
2.8	Phagen.....	13
2.9	Vektoren.....	13
2.10	Zelllinien	15
2.11	Histologische Befunde von Patientengeweben.....	16
2.12	Primer	17
3	Methoden	19
3.1	Gewebeentnahme	19
3.2	Isolierung von Gesamt-RNA	19
3.3	Konzentrationsbestimmung und Überprüfung der Qualität von RNA.....	20
3.3.1	UV-Photometrische Bestimmung der Konzentration von RNA und DNA.....	20
3.3.2	Spektrofluorometrische Bestimmung der RNA-Konzentration.....	20
3.3.3	Überprüfung der Qualität von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese	21
3.4	Hydrolyse von DNA mittels DNaseI	21
3.5	Reverse Transkription (RT) von mRNA- und cDNA- Amplifikation mit SMART™ PCR Synthese Kit	21
3.5.1	Reverse Transkription von mRNA	21
3.5.2	cDNA-Amplifikation.....	22
3.6	Reverse Transkription der mRNA	22
3.6.1	Reverse Transkription für unmodifizierte Differential Display-PCR.....	22
3.6.2	Reverse Transkription für modifizierte Differential Display-PCR oder (semi)quantitative PCR.....	23
3.7	Subtraktive Hybridisierung.....	23
3.7.1	Adapter-Ligation, erste und zweite Hybridisierungsreaktion.....	23
3.7.2	Erste und zweite Amplifikation der subtrahierten Proben.....	24
3.8	Differential Display-PCR	26
3.8.1	Differential Display-PCR vor Modifikation	27
3.8.2	Differential Display-PCR nach Modifikation.....	28
3.9	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	29
3.10	Ausschneiden signifikanter Banden	29

3.11	Reamplifikation von cDNA-Fragmenten	30
3.12	Agarose-Gelelektrophorese	30
3.13	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
3.14	TA-Klonierung	31
3.15	Bakterienkulturen	31
3.16	Minipräparation von Plasmid-DNA mittels Säulenchromatographie.....	31
3.17	Midipräparation von Plasmid-DNA mittels Säulenchromatographie.....	32
3.18	Automatische Sequenzierung von DNA	32
3.19	Sequenzvergleich mit publizierten Daten	32
3.20	(Semi)quantitative RT-PCR-Analyse	33
3.21	Northern Blot-Analyse	33
3.21.1	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	33
3.21.2	mRNA-Isolierung aus Gesamt-RNA	34
3.21.3	Herstellung eines Northern Blots.....	34
3.21.4	Northern-Hybridisierung	35
3.22	Aufreinigung markierter Sonden.....	36
3.23	Aufreinigung von PCR-Produkten	36
3.24	RACE's	36
3.25	Phagen Screening	37
3.25.1	Präparation von Phagen DNA	37
3.25.2	Durchführung eines Phagen-Screens	38
3.26	Herstellung von peptidspezifischen polyklonalen Antikörpern	39
3.27	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	40
3.28	Ligation von DNA	40
3.29	Herstellung kompetenter DH5 α -Zellen	40
3.30	Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	41
3.31	Einfrieren von Bakterienkulturen	41
3.32	in vitro Transkription/Translation	41
3.33	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
3.34	Nachweis von Proteinen durch Coomassie-Färbung.....	43
3.35	Immunblot-Analyse	43
3.36	Digoxigenin-Markierung von RNA für <i>in situ</i> Hybridisierung	44
3.36.1	Markierung der RNA	44
3.36.2	Überprüfung der Digoxigenin-Markierung mittels Dot Blot.....	45
4	Ergebnisse.....	47
4.1	Materialasservation, histologische Aufarbeitung und Qualitätskontrolle	47
4.2	Vergleich der verwendeten Gewebe bezüglich ihrer embryonalen Entwicklung.....	51
4.3	Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Erfassung der Expressionsmuster von Geweben	52
4.4	Durchführung der subtraktiven Hybridisierung mit Ovarialkarzinomzelllinien	53
4.5	Analyse der Genexpression mittels Differential Display	59
4.5.1	Isolierung der RNA aus Geweben	59
4.5.2	Hydrolyse der DNA und reverse Transkription der mRNA von Patientin 26	60
4.5.3	Differential Display-PCR mit cDNA von Patientin 26.....	60
4.5.4	Reamplifikation unterschiedlich exprimierter Fragmente.....	62
4.5.5	Klonierung von cDNA-Fragmenten	62
4.5.6	Datenbankanalyse der differentiell exprimierten Fragmente und Zusammen- fassung der wichtigsten Unterschiede aus Geweben von Patientin 26	64

4.5.7	Etablierung der Methode der semiquantitativen bzw. quantitativen PCR zur Überprüfung der Unterschiede.....	66
4.6	Modifikation der Differential Display-Methode.....	71
4.7	Charakterisierung von 26C/C9/2.....	78
4.7.1	Verlängerung der Sequenz des 26C/C9/2-Transkripts durch Datenbankanalyse.....	79
4.7.2	Northern Blot-Analyse	80
4.7.3	5'-RACE	81
4.7.4	Phagen-Screening.....	82
4.7.5	Auswertung der RACE-Sequenzen	83
4.7.6	Struktur des 26C/C9/2-Gens	87
4.7.7	Herstellung peptidspezifischer Antikörper	89
4.7.8	in vitro Transkription und Translation von 26C/C9/2 im Retikulozyten-Lysat	91
4.7.9	Eigenschaften des 26C/C9/2-Proteins	93
4.7.10	Homologe Proteine zu 26C/C9/2.....	95
4.8	Charakterisierung von 26C/G8/2	96
4.8.1	<i>in situ</i> Hybridisierung von 26C/G8/2 und 26C/C9/2.....	96
4.8.2	Struktur des 26C/G8/2-Gens	97
4.8.3	Eigenschaften des 26C/G8/2-Proteins.....	101
5	Diskussion.....	105
5.1	Problematik der Probengewinnung und Lösungsansätze	105
5.1.1	Gewebe von Patientinnen.....	105
5.1.2	Primärzellkulturen.....	109
5.2	Vor- und Nachteile der subtraktiven Hybridisierung und des Differential Displays....	109
5.3	Ergebnisse des Differential Displays.....	112
5.3.1	Unterschiedlich exprimierte Zelloberflächenproteine und extrazelluläre Signalproteine in Ovarialkarzinomzelllinien.....	112
5.3.2	Komponenten von Signalübertragungswegen, die in Tumoren differenziell exprimiert sind	114
5.3.3	26C/G8/2, ein Protein mit doppelsträngigen RNA Bindungs-Motiven.....	125
5.3.4	Ausblick.....	128
6	Zusammenfassung.....	131
7	Literatur.....	133

verwendete Abkürzungen:

APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
CHCl ₃	Chloroform
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	Expressed Sequence Tags
EtBr	Ehidiombromid
EtOH	Ethanol
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KOAc	Kaliumacetat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MOPS	2-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
n x g	nfache Erdbeschleunigung
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau Tetrazolium
OD	optische Dichte
pfu	plaque forming units
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfate)
TEMED	<i>N,N,N,N</i> -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat

1 Einleitung

Mit der Zunahme der Lebenserwartung in den vergangenen 50 Jahren veränderte sich die Altersstruktur der Gesellschaft. So gibt es zum heutigen Zeitpunkt sehr viel mehr ältere Menschen als in der Vergangenheit. Aufgrund dieser Veränderung stieg auch die absolute Zahl der an Krebs erkrankten Personen, da vom Kindes- bis zum hohen Alter die Krebssterblichkeit erheblich zunimmt (*Alberts et al., 1990*). Eine der häufigsten Krebsarten, die bei Frauen zum Tode führt, ist der Ovarialtumor.

In West- und Nord-Europa, aber auch in den USA repräsentiert dieser Tumortyp den häufigsten Krebs des weiblichen Genitaltrakts mit weltweit etwa 200.000 neuen Fällen pro Jahr (*Runnebaum und Stickeler, 2001*). Da in etwa 70% der Fälle eine Krebsdiagnose erst in einem späten Stadium gestellt wird, ist der Eierstocktumor die fünft häufigste Krebstodesursache bei Frauen. Für die Entstehung dieses Tumortyps sind bislang erst wenige Risikofaktoren identifiziert worden. Dazu gehören genetische Faktoren, die eine familiäre Häufung von Eierstocktumoren bewirken, endokrine Faktoren, bei denen die Reproduktion eine Rolle spielt, Umweltfaktoren, die noch weitgehend unerforscht sind, und molekulare Risikofaktoren, zu denen somatische Mutationen unterschiedlicher Gene gezählt werden.

1.1 Risikofaktoren für die Entstehung von Ovarialkarzinomen

1.1.1 Genetische Faktoren

Lediglich etwa 10% aller epithelialer Ovarialkarzinome werden mit erblichen Faktoren in Verbindung gebracht (*Runnebaum und Stickeler, 2001*). Dabei ist das Erkrankungsrisiko auf etwa das 3,5fache erhöht (*Claus und Schwartz, 1995*). Die erblichen Tumoren können in drei verschiedene Typen unterteilt werden:

Bei dem häufigsten Typ handelt es sich um das Brust- und Ovarialkarzinom-Syndrom, das im Zusammenhang mit Keimzellmutationen der BRCA1- und BRCA2-Gene steht. BRCA1 wird hauptsächlich in Brust-, Ovar- und Hodengeweben exprimiert. Das 100 kb große Gen liegt auf dem Chromosomenabschnitt 17q21 und wurde von Miki et al. (1994) kloniert. Es besteht aus 24 Exons und kodiert für ein Protein von 1863 Aminosäureresten, das zellzyklus-abhängig exprimiert und phosphoryliert wird (*Chen et al., 1996*). Die aminoternale Region zeigt eine hohe Homologie zu einer Zinkfinger-Domäne, wie sie in zahlreichen Transkriptionsfaktoren vorkommt. BRCA1 spielt vermutlich eine Rolle bei der Zellzyklus-Regulation und der DNA-Reparatur (*Monteiro, 2000*). Wie BRCA1 ist auch BRCA2 an der Regulation der Transkription und der DNA-Reparatur beteiligt (*Venkitaraman, 2001*). BRCA2 ist jedoch bislang weniger gut untersucht als BRCA1.

Bei dem zweiten Tumortyp, der ebenfalls zu einer Erhöhung des Ovarialtumor- und Brustkrebs-Risikos bei Frauen und zu colorektalem Krebs bei Männern führt, handelt es sich um das (hereditary non-polyposis colorectal cancer) HNPCC- oder auch LynchII-Syndrom. Hierbei erzeugen Keimzellmutationen Defekte bei Enzymen, die in der DNA-Mismatch-Reparatur eine Rolle spielen (*Lynch et al., 1998*), was zu einer Anhäufung von Mutationen führt. In 90% der Fälle sind davon die Proteine von hMSH2 oder hMLH1 betroffen.

Der dritte Tumortyp wird als seltenes organspezifisches Ovarialtumor-Syndrom bezeichnet und betrifft die Ovarien. Auch in diesem Fall spielen Mutationen des BRCA1-Gens eine Rolle bei der Tumorentstehung (*Chuaqui et al., 1997*).

1.1.2 Endokrine Faktoren

Neben den genetischen Faktoren spielen auch endokrine Faktoren eine Rolle bei der Tumorentstehung in den Ovarien. Am deutlichsten wird dabei das Risiko durch die Anzahl der Schwangerschaften und die Länge der Stillzeit beeinflusst. Mit steigender Zahl an Schwangerschaften und zunehmender Länge der Stillzeit sinkt die Wahrscheinlichkeit, an diesem Tumortyp zu erkranken. Dies beruht vermutlich auf dem Einfluß der Gonadotropin-Sekretion während der Schwangerschaft (*Banks et al. 1997; Daly und Obrams, 1998*). Nach der „Gonadotropin“-Hypothese beschleunigen große Mengen zirkulierenden Gonadotropins die Transformation von Ovariepithelzellen. Pro Schwangerschaft nimmt das Risiko um 13-19% ab, wobei jedoch eine Schwangerschaft bei sehr jungen Frauen das Risiko erhöht (*Runnebaum und Stickeler, 2001*).

Ebenso zeigen orale Kontrazeptiva eine positive Wirkung. Bei einer Einnahme über einen Zeitraum von fünf Jahren und länger kann das Risiko bis auf die Hälfte reduziert werden (*Runnebaum und Stickeler, 2001*). Der positive Effekt der „Pille“ beruht wahrscheinlich auf der Unterdrückung des Eisprungs und der somit entfallenden ständigen Reparaturprozesse des Oberflächenepithels (*Fathalla, 1971*).

1.1.3 Umweltfaktoren

Auch Umweltfaktoren beeinflussen die Entstehung der Ovarialtumoren. Dabei stehen hauptsächlich Asbest und die Verwendung von Talkum-Pudern in der Diskussion. Dies spiegelte sich in den erhöhten Ovarialtumor-erkrankungen bei Arbeiterinnen, die ständig in Kontakt mit Asbest waren, und bei Frauen wieder, die Talkum-Puder-Produkte im Bereich des Perineums verwendeten (*Ness und Cottreau, 1999*).

Zum Einfluß der Ernährung liegen kaum Daten vor. Die vorliegenden Studien sprechen jedoch für einen positiven Effekt bei hohem Konsum an Früchten und Gemüse. Im Gegensatz dazu scheint der Verzehr großer Mengen an gesättigten tierischen Fetten und Fleisch mit einem erhöhten Krebsrisiko zu korrelieren (*Becker und Wahrendorf, 1997*).

1.1.4 Molekulare Risikofaktoren

Die maligne Transformation der nicht erblichen Ovarialtumoren ist durch eine Vielzahl genetischer Veränderungen gekennzeichnet. Dazu zählen die Hochregulation von Proto-Onkogenen und die Mutation oder Deletion von Tumorsuppressor-Genen.

Zur Analyse von Genexpressionsveränderungen stehen zahlreiche Methoden zur Verfügung. Dazu gehört neben dem relativ neu entwickelten Verfahren der cDNA Microarrays (*Emmert-Buck et al., 1996; Welsh et al., 2001*) und der subtraktiven Hybridisierung (*Rouvier et al., 1993; Hubank und Schatz, 1994*) auch das Differential Display (*Liang und Pardee, 1992; Liang und Pardee, 1995; Liang und Pardee, 1997*).

Die Analyse von unterschiedlich exprimierten Genen mit cDNA Microarrays bietet den großen Vorteil, nahezu einhunderttausend cDNAs gleichzeitig zu analysieren und zu identifizieren. Aufgrund der Probenanzahl ist eine Normalisierung der zu untersuchenden Proben gewährleistet. Ein deutlicher Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, daß große Mengen an RNA eingesetzt werden müssen. Weitere Nachteile gegenüber den Methoden der subtraktiven Hybridisierung und des Differential Displays sind die höhere Nachweisgrenze und eine geringere Sensitivität. Durch die höhere Nachweisgrenze können mit dem Verfahren der cDNA Arrays niedrig exprimierte mRNAs nicht erfaßt werden, durch die geringere Sensitivität können lediglich sehr deutlich ausgeprägte Unterschiede identifiziert werden. Diese Einschränkungen, vor allem aber die notwendigen großen Mengen an RNA, führten dazu, daß das Verfahren der Microarrays nicht in der vorliegenden Arbeit eingesetzt werden konnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Methoden der subtraktiven Hybridisierung und des Differential Displays getestet und bewertet. Vor- und Nachteile beider Methoden werden in Kapitel 5.2 diskutiert. Letztendlich fiel die Entscheidung zugunsten der Methode des Differential Displays. Bei dieser Methode reichen sehr geringe Mengen an Geweben für die Untersuchungen aus und eine Vielzahl an Gewebeproben können gleichzeitig betrachtet werden (*Sagerström et al., 1997*). Somit erlaubt das Differential Display die Identifizierung der mRNAs, die in Tumorzellen des Ovars stärker oder geringer repräsentiert sind als in den entsprechenden normalen Zellen (*Mok et al., 1994; Mok et al., 1996*). Für die systematische Analyse der Genexpressionsunterschiede mit Hilfe des Differential Displays wird zunächst die RNA aus den Geweben isoliert und die mRNA in cDNA umgeschrieben. Diese dient als Matrize in einer PCR, bei der Fragmente mit unterschiedlichen Primerkombinationen amplifiziert werden. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der cDNA-Fragmente werden die im Vergleich zu den Normalzellen über- oder unterrepräsentierten Fragmente isoliert, in einer PCR amplifiziert, in einen Vektor kloniert und schließlich bakteriell vermehrt. Die Ermittlung der Sequenz der Amplifikate ermöglicht eine Datenbankanalyse, bei der Expressed Sequence Tags (ESTs) und cDNA-Bibliotheken nach homologen Klonen

durchsucht werden, die evtl. die Verlängerung der Fragmente ermöglichen. Abschließend erfolgt die Überprüfung der ermittelten Unterschiede durch eine PCR.

Einige der bereits aus der Literatur bekannten Proto-Onkogene, deren veränderte Expression in Ovarialtumoren beschrieben ist, stehen im Zusammenhang mit Ergebnissen einer Analyse des Differential Displays mit Geweben einer Patientin. Zu diesen Proto-Onkogenen zählen das Akt2, K-Ras und c-Myc.

Das Gen von Akt2 ist ein im Menschen vorkommendes Homolog des viralen Onkogens v-akt (*Cheng et al., 1992; Staal., 1987*). Akt2 kodiert für ein 56 kDa großes Protein, welches zu den Serin/Threonin-Kinasen gezählt wird und auch die Bezeichnung PKB β trägt. Dieses Protein kann grob in vier Domänen eingeteilt werden. Am aminoterminalen Ende befindet sich eine pleckstrin-homologe Domäne, in zentraler Position sitzen eine helikale- und eine Kinase-Domäne, der C-terminale Abschnitt ist reich an Serinen und Threoninen (siehe Abb.: 1.1)

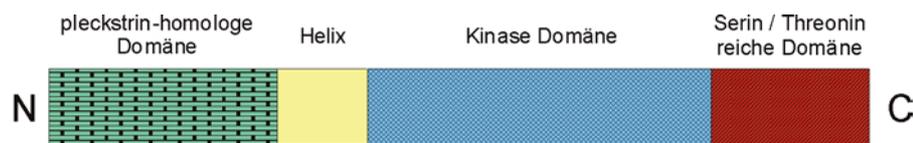


Abb.: 1.1 Schematische Darstellung des AKT2-Proteins.

Das Protein kann grob in vier Bereiche unterteilt werden. Der Amino-Terminus trägt eine pleckstrin-homologe Domäne, gefolgt von einer helikalen Region, der sich eine Kinase Domäne anschließt. Den carboxy-terminalen Abschnitt bildet eine Serin/Threonin reiche Domäne.

Über die pleckstrin-homologe Domäne, die einer Vielzahl von Proteinen, wie beispielsweise einigen Regulatoren kleiner GTP bindender Proteine (ras-GAP, cdc24), Kinasen (ARK1/2) und allen bekannten Säuger-Phospholipasen (PLC- β , - δ , - γ), die am Transduktions-Weg teilnehmen (*Haslam et al., 1993; Mayer et al., 1993*), gemein ist, wird Akt2 durch die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) aktiviert. Die PI3K wird ihrerseits von einer Vielzahl an Stimuli, wie Wachstumsfaktoren (*Mitsuuchi et al., 1998*), Proteinphosphatase-Inhibitoren und Streß, beeinflusst (*Liu et al., 1998*). AKT2 ist in etwa 10-20% aller ovariellen Tumoren überexprimiert (*Bellacosa et al., 1995*), wobei seine Wirkungsweise jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Eines der bisher bekannten Ziele, die durch AKT2 phosphoryliert werden, ist das Protein BAD, ein Mitglied der BCL-2 Familie. Diese Phosphorylierung reduziert die Bindungsfähigkeit von BAD zu Bcl-x_L, was zur Suppression der Apoptose und somit zum Überleben der Zellen führt (*Datta et al., 1997*).

Wie Akt2 zählt K-Ras zu den Proto-Onkogenen. Es gehört zur Superfamilie der kleinen GTPasen und kodiert für ein Protein mit etwa 21 kDa. Dieses ist ein Knotenpunkt zahlreicher Signalübertragungswege und vermittelt Informationen zwischen Zelloberflächenrezeptoren

wie dem epidermalen Wachstumsfaktor, dem Cytokin-, Integrin- und PDGF-Rezeptor und den Transkriptions-Faktoren bzw. Zellzyklus-Proteinen des Zellkerns (*Ellis und Clark, 2000*). Im Zusammenhang mit Tumoren des Ovars sind überwiegend Mutationen im K-Ras-Gen beschrieben (*Mok et al., 1993; Gallion et al., 1995*). Nur in wenigen Fällen wird über veränderte Expressionsraten von K-RAS berichtet (*Filmus und Buick, 1985*).

c-MYC ist ein Mitglied der Helix-Loop-Helix/Leuzin Zipper Superfamilie. In ruhenden Zellen werden nur geringe Mengen an c-MYC exprimiert. Dies ändert sich jedoch nach mitotischer Stimulation. In proliferierenden Zellen bilden c-MYC und das sogenannte Max-Protein ein Heterodimer und binden an die Konsensus-Sequenz 5'-CACGTG-3' der DNA (*Knippers, 1997*). Die DNA-gebundenen Heterodimere rekrutieren Koaktivator- und Korepressorkomplexe, die Veränderungen in der Chromatin Struktur bewirken. Somit wird die Transkriptionsrate von Genen, die an der Differenzierung und der Apoptose beteiligt sind, verändert (*Grandori et al., 2000*).

Zu den wichtigsten Vertretern der Tumorsuppressor-Gene, die an der Ovarialtumorentstehung beteiligt sind, gehören BRCA1 und 2. Wie bereits erwähnt werden sie hauptsächlich mit dem erblich bedingten Brust- und Ovarialkarzinom-Syndrom in Verbindung gebracht. Neben diesen Proteinen ist p53 das bekannteste Tumorsuppressor-Gen. Das humane p53-Gen liegt am Ende des kurzen Arms von Chromosom 17. Es umfaßt ca. 20 kb und codiert für ein 2,8 kb langes Transkript. Bei mehr als der Hälfte aller menschlichen Krebszellen ist das p53-Gen geschädigt. So führt der Verlust eines Allels und eine korrespondierende Mutation im zweiten Allel in über 55% aller Ovarialtumoren zu einer vollständigen Inaktivierung von p53 (*Runnebaum und Stickeler, 2001*). Dies wird verständlich wenn die vielfältigen und wichtigen Aufgaben des p53-Proteins betrachtet werden. So übernimmt es Aufgaben, die zur Regulation der Transkriptionsaktivität zahlreicher Proteine, der Aufrechterhaltung der Genomintegrität und des programmierten Zelltods beitragen.

1.2 Metastasierung und Therapie

Nach heutigem Wissensstand leiten sich Ovarialtumoren hauptsächlich vom Oberflächenepithel der Eierstöcke ab. Dabei erfolgt die Metastasierung vermutlich durch Abschuppung der Zellen vom malignen Herd des Ovars. Anschließend wandern die Zellen durch die peritoneale Höhle und siedeln sich an beliebigen Stellen an (*Menzin et al., 1998*). Je nachdem, welche Organe vom Tumor betroffen sind, erfolgt eine Stadieneinteilung nach den Richtlinien der FIGO (Federation International of Gynecology and Obstetrics) oder TNM (Tumor Nodes Metastasis). In FIGO-Stadium I ist der Tumor auf die Ovarien begrenzt. Bei FIGO-Stadium II breitet sich der Tumor bereits im Beckenraum aus. Damit sinkt auch die 5-Jahres-Überlebensrate von 90% (FIGO I) auf 70%. FIGO III kennzeichnet das Stadium, bei

dem auch außerhalb des Beckens Metastasen nachgewiesen werden, die Krankheit jedoch auf das Abdomen beschränkt ist. Hier ist die 5 Jahres Überlebensrate statistisch auf 15% gesunken. Im vierten FIGO-Stadium existieren Fernmetastasen, wobei die Chance, fünf Jahre zu überleben, 1-5% beträgt.

Im FIGO-Stadium I ist eine fertilitätserhaltende Operation bei jungen Frauen möglich. Bei allen anderen Stadien steht an erster Stelle die radikale Operation mit der Entfernung der beiden Eierstöcke, der Gebärmutter und der beiden Eileiter sowie betroffener Lymphknoten. Sind aufgrund eines fortgeschrittenen Stadiums bei der Erstdiagnose noch weitere Organe betroffen, werden auch diese, soweit möglich, entfernt. Das Ziel der Operation ist es, alle Tumoranteile zu entfernen. Zusätzlich erfolgt in der Regel eine Chemotherapie mit einer cisplatinhaltigen Zweierkombination. Nach Auersperg et al. (1998) schlägt die Behandlung in 60-80% aller Fälle zunächst an, jedoch entwickeln die meisten Patienten in kurzer Zeit Vielfach-Resistenzen gegen Chemotherapeutika. Dieses Phänomen wird als Multiple Drug Resistance (MDR) bezeichnet. Bisher wurden zahlreiche molekulare Veränderungen identifiziert, die zur MDR beitragen. Beispiele dafür sind ein veränderter Transportefflux, der Zellgifte aus den Zellen befördert, Inaktivierung der Therapeutika durch Bindung an bestimmte Proteine, Einlagerung der Substanzen in Organellen, wodurch diese ihre Ziele nicht erreichen können, Erhöhung der Toleranz der Zellen gegenüber Giften oder einer erhöhten DNA-Reparatur-Aktivität, die das Überleben der Zelle sichert, obwohl sie unter normalen Bedingungen sterben würde.

Da bereits in Phase I nur eine begrenzte Heilungschance besteht, ist es um so wichtiger, einen Ovarialtumor so früh wie möglich zu erkennen.

1.3 Zielsetzung

Da das epitheliale Ovarialkarzinom aufgrund mangelnder Frühsymptome und geeigneter Screening-Marker unter den gynäkologischen Tumoren die schlechteste Prognose hat, könnte die Identifikation eines oder mehrerer Marker die Diagnostik und Therapie bedeutend verbessern und damit zahlreiche Menschenleben retten. Deshalb besteht das langfristige Ziel der Forschung darin, relevante Genprodukte aufzufinden und ihre Rolle bei der Entstehung und Progression der Ovarialtumoren zu untersuchen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, Genexpressionsmuster epithelialer Ovarialkarzinome systematisch zu analysieren.

Unabhängig von der verwendeten Methode ist es notwendig, Tumorgewebe mit entsprechendem Referenzgewebe zu vergleichen. Gerade bei Ovargewebe ist es schwierig, entsprechendes gesundes Normalgewebe zu erhalten, da entweder gesundes Ovar nicht

entnommen werden kann, da noch ein Kinderwunsch besteht, oder das Gewebe bereits aufgrund zahlreicher Ovulationen stark vernarbt ist und somit nicht zum Vergleich herangezogen werden kann. Als Kompromiß bietet sich daher der Vergleich mit Geweben gleichen embryonalen Ursprungs an. Nach eingehender Literaturrecherche erwies sich das Infundibulum des Oviducts als geeignete Normalprobe (siehe Kapitel 5.1.1).

Ebenso wichtig ist, daß die verwendeten Gewebeproben möglichst ausschließlich aus Zellen des entsprechenden Gewebetyps bestehen und nicht durch die anhaftende Basalschicht oder Blut verunreinigt sind. Solche Verunreinigungen würden bei Vergleich von Geweben zu nicht epithelspezifischen Unterschieden führen (*Martin und Pardee, 1999*). Lösungsansätze dazu sind in Kapitel 4.1 beschrieben.

Wenn beide notwendigen Voraussetzungen erfüllt werden, kann durch eine geeignete Methode, wie subtraktive Hybridisierung oder Differential Display, der Gewebevergleich erfolgen. Wie sich im Verlauf der Arbeit zeigte, ist für das untersuchte Gewebe die Methode des Differential Displays geeignet, da nur mit dieser Methode die zur Verfügung stehende Menge an RNA aus den Geweben sinnvoll analysiert werden konnte.

Anschließend sollten Unterschiede bei der Expression identifiziert und die entsprechenden cDNAs kloniert werden. Nach Sequenzierung konnten Homologien zu bereits bekannten Proteinen oder ESTs ermittelt werden. Soweit möglich, wurden die ermittelten Unterschiede durch PCR verifiziert, wovon einige besonders wichtig erscheinende in weiteren Experimenten untersucht wurden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Die nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden bei Merck, Darmstadt in einem möglichst hohen Reinheitsgrad erworben. In Klammern angegebene Abkürzungen werden im folgenden stellvertretend für die vollständigen Namen verwendet.

α - ³² P-desoxy-Adenosintriphosphat	Amersham, Braunschweig, D
α - ³² P-desoxy-Cytosintriphosphat	Amersham, Braunschweig, D
α - ³³ P-desoxy-Adenosintriphosphat	Amersham, Braunschweig, D
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen, D
2-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Gerbu, Gaiberg, D
5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (X-Gal)	Sigma, Deisenhofen, D
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe, D
Agarose	Apligene/Oncor, Heidelberg, D
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg, D
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt, D
Ampicillin trihydrat	Boehringer Bioproducts, Ingelheim, D
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto-Tryptone	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto-Yeast-Extract	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bindsilan-Lösung	Pharmacia, Freiburg, D
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg, D
Blueslick	Serva, Heidelberg, D
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roche, Mannheim, D
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, D
Chloroform (CHCl ₃)	Baker, Deventer, NL
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen, D
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt, D
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Ehidiombromid (EtBr)	Gibco BRL, Eggenstein, D
Eisessig p.a.	Ridel de Haen, Seelze, D
Ethanol (EtOH) p.a.	Baker, Deventer, NL
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt, D
Formamid deionisiert	Merck, Darmstadt, D
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel, D
Glucose	Merck, Darmstadt, D
Glycerol 86%	Merck, Darmstadt, D
Harnstoff p.a.	Merck, Darmstadt, D
Isopropanol p.a.	Baker, Deventer, NL
Kaliumacetat (KOAc)	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, D
Lachssperma	Gibco BRL, Eggenstein, D
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt, D
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, D
Milchpulver (Skim Milkpowder)	Fluka, Neu-Ulm, D
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen, D
Mowiol	Calbiochem, Schwalbach, D

Natriumacetat (NaOAc)	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, D
Natriumhydroxid (NaOH)-Plätzchen	Roth, Karlsruhe, D
Nitroblau Tetrazolium (NBT)	Biomol, Hamburg, D
Phenol	Roth, Karlsruhe, D
Ponceau S-Rot	Sigma, Deisenhofen, D
RNase A	Sigma, Deisenhofen, D
Saccharose	Merck, Darmstadt, D
Salzsäure, rauchend	Merck, Darmstadt, D
Tetracyclin	Boehringer Bioproducts, Ingelheim, D
<i>N,N,N,N</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen, D
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe, D
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma, Deisenhofen, D
Triton X-100	Serva, Heidelberg, D
Tween 20	Serva, Heidelberg, D
Ultrapure dNTP Set	Amersham-Pharmacia, Braunschweig, D
Xylen-Cyanol FT	Serva, Heidelberg, D

2.2 Reaktions-Kits, Bibliotheken und Fertiglösungen

λ TripleEX Ovar Bibliothek	Clontech, Heidelberg, D
DIG RNA Labeling Kits	Roche, Mannheim, D
dNTP-Mix	Amersham, Cleveland, USA
ECL-System	Amersham-Pharmacia, Braunschweig, D
Marathon-Ready cDNA RACE-Bibliotheken	Clontech, Heidelberg, D
NonaPrimer Kit II	Appligene/Oncor, Cambridge, USA
Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden, D
Oligotex-Kit	Qiagen, Hilden, D
PCR-Purification Kit	Qiagen, Hilden, D
PCR-SELECT™ cDNA Subtraktion Kit	Clontech, Heidelberg, D
PicoGreen™ ds DNA Quantifizierung-Kit	Molecular Probes, Leiden, NL
Plasmid Midi Kits	Qiagen, Hilden, D
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAshredder-Säulen	Qiagen, Hilden, D
RiboGreen™ RNA Quantifizierung-Kit	Molecular Probes, Leiden, NL
RNeasy Mini-Kit	Qiagen, Hilden, D
Sequagel complete	Biozym, Hess. Oldendorf, D
Sequagel XR extender range	Biozym, Hess. Oldendorf, D
SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit	Clontech, Heidelberg, D
TNT® gekoppeltes Retikulozyten-Lysat	Promega, Madison, USA
Translations System RTS 500	Roche, Mannheim, D
Uni-ZAP XR Ovar Bibliothek	Stratagene, La Jolla, USA

2.3 Verbrauchsmaterial

ECL-Reagenz (enhanced chemoluminescence)	Amersham Pharmacia, Braunschweig, D
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
Faltenfilter 3 hw	Neolab Migge, Heidelberg, D
Injektionspritzen, 10 ml und 50 ml	Terumo, Tokio, Japan
Hybond ⁺	Amersham Pharmacia, Braunschweig, D
Kodak Röntgenfilm BIOAX TM MR-1	Kodak-Aldrich, Steinheim, D
3MM Gel Blotting Papier GB002	Schleicher & Schüll, Dassel, D
MTN Blots I und II	Clontech, Heidelberg, D
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden, D
Nitrozellulose Hybond M ⁺	Amersham, Braunschweig, D
Nitrozellulose Filter Hybond M ⁺ (132 mm)	Amersham, Braunschweig, D
Nona Primer KitII	Appligene/Oncor, Heidelberg, D
Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen, D
0,5 ml PCR Tubes	Biozym, Hess. Oldendorf, D
Petrischalen (9-15 cm Durchmesser)	Greiner, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen mit Filter	Greiner, Frickenhausen, D
RNase freie Eppendorf-Reaktionsgefäße	Biozym, Hess. Oldendorf, D
1 x Sterilfilterhalter 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel, D
Toppits Frischhaltefolie	Melitta, Minden, D
Zentrifugenröhrchen, 15 ml und 50 ml	Greiner, Frickenhausen, D

2.4 Laborgeräte

Agfa Filmentwickler, Typ Curix 242	Agfa, Westfalen, D
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn, D
Analytische Feinwaage, Typ Toledo PB 60Z	Mettler, Gießen, D
Eagle Eye II, Typ 230 VAC	Stratagene, La Jolla, USA
Elektrophoresis Power Supply, Typ PS3002	GIBCO BRL, Eggenstein, D
Expositionskassette 35,6 x 43,2 cm	Rego, Heidelberg, D
Fluoroskan Ascent	Labsystems, Frankfurt, D
Forma Scientific -86°C Freezer	Life Sciences International, Frankfurt, D
Geltrockner BIO-RAD, Modell 583	Bio-Rad, Martinsried, D
Hybridisierungsröhre, Par No FHB11	Techne, Cambridge, GB
Leuchtplatte	Rex, Heidelberg, D
LKB Biochrom Powerd Supply	Grant, Cambridge, GB
LKB Bromma constant Power Supply	Grant, Cambridge, GB
Mains Power Supply Unit 500/100	DESAGA, Heidelberg, D
Microcomputer elektrophoresis Power Supply	Grant, Cambridge, GB
Micromat AEG 135 -Typ EEH8633	Eppendorf, Hamburg, D
Mikrokühlzentrifuge, Typ 5402	Eppendorf, Hamburg, D
Mikrozentrifuge, Typ 5417	Eppendorf, Hamburg, D
pH-Meter, Typ Toledo MP220	Mettler, Gießen, D
Sepatech Varifuge 3,0R	Heraeus, Hanau, D
DNA-Sequencing System, Modell S2	GIBCO BRL, Eggenstein, D
Spektrophotometer, Typ DU 7400	Beckman, Fullerton, USA
Speed Vac Concentrator, Typ SVC 1004	Bachhofer, Reutlingen, D
Speed Vac Plus SC110A	Thermo Quest, Egelsbach, D
Sterilwerkbank	Baker, Sanford, USA

Szintillationszähler LS1801	Beckman, Fullerton, USA
Techne Hybridiser HB-1D	Techne, Cambridge, GB
Thermocycler, Typ PTC-200	Biozym, Hess. Oldendorf, D
Thermomixer, Typ 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Thermoschüttler, Typ Certomat HK	Braun, Melsungen, D
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, La Jolla, USA
Waage, Typ Mettler P 1000	Mettler, Gießen, D
Wasserbad Julabo SW-200	Buddeberg, Mannheim, D

2.5 Enzyme und Marker

Restriktionsenzyme, Ligasen, Phosphatasen und Kinasen wurden von den Firmen GIBCO BRL (Eggenstein), MBI Fermentas (St.Leon-Roth) oder NEB (Schwalbach) bezogen und nach Angaben der Hersteller verwendet. Für die reversen Transkriptionen wurde die SuperScript II RNaseH⁻ Reverse Transcriptase der Firma Gibco BRL (Eggenstein) eingesetzt. Ebenso wurde die Desoxyribonuclease I von dieser Firma bezogen. Für Standard-PCR-Reaktionen wurde ein Advantage cDNA-Polymerase-Mix der Firma Clontech (Heidelberg) oder die Goldstar DNA Polymerase der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) verwendet. In einigen Fällen wurde die Pfu-Polymerase der Firma Stratagene (La Jolla, USA) eingesetzt. Die RNase und Proteinase-Inhibitoren wurden von Roche (Mannheim) geliefert. Der RNA-Größenmarker 0,24-9,5 kb RNA I stammte von der Firma Gibco BRL (0,24 kb, 1,35 kb, 2,37 kb, 4,4 kb, 7,46 kb und 9,49 kb). Als DNA-Größenstandard wurden die GeneRuler 100 bp (100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1031 bp, 1200 bp, 1500 bp, 2000 bp, 3000 bp) oder 1kb (0,5 bp, 0,75 bp, 1,0 bp, 1,5 bp, 2,0 bp, 2,5 bp, 3,0 bp, 3,5 bp, 4,0 bp, 5,0 bp, 6,0 bp, 8,0 bp, 10,0 bp) Leitern der Firma MBI Fermentas eingesetzt. Die entsprechenden Protein-Größenmarker waren SDS-7 (14, 20, 29, 36,45 und 66 kDa) und SDS-6H (29, 45, 66, 97, 116 und 205 kDa) von Sigma (Deisenhofen).

2.6 E.coli-Stämme

BL21(DE)pLYS: F-ompThsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysS.

DH5α: (F[']/endA1 hsdR17(r_k⁻m_k⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR (Φ80dlacΔ(lacZ) M15).

Top10F[']: F['] (lacI^q Tn10 (Tet^R) mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG (Invitrogen, Groningen, NL).

XL1-Blue MRF[']:Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac(F['] proAB lacI^qZΔM15Tn10 (Tet^r)) (Stratagene, La Jolla, USA).

2.7 cDNA-Bibliotheken

Ovarbibliothek im Uni-ZAP XR Vektor (Stratagene, La Jolla, USA)

λ TriplEx Ovarbibliothek (Clontech, Heidelberg)

Marathon-Ready cDNA Bibliotheken von Eierstöcken, Brustgeweben, Hoden, Gehirn und Föten (Clontech, Heidelberg)

2.8 Phagen

ExAssist Helfer Phage (Stratagene, La Jolla, USA)

2.9 Vektoren

pCRII (Invitrogen, Groningen, NL) siehe Abb.: 2.1

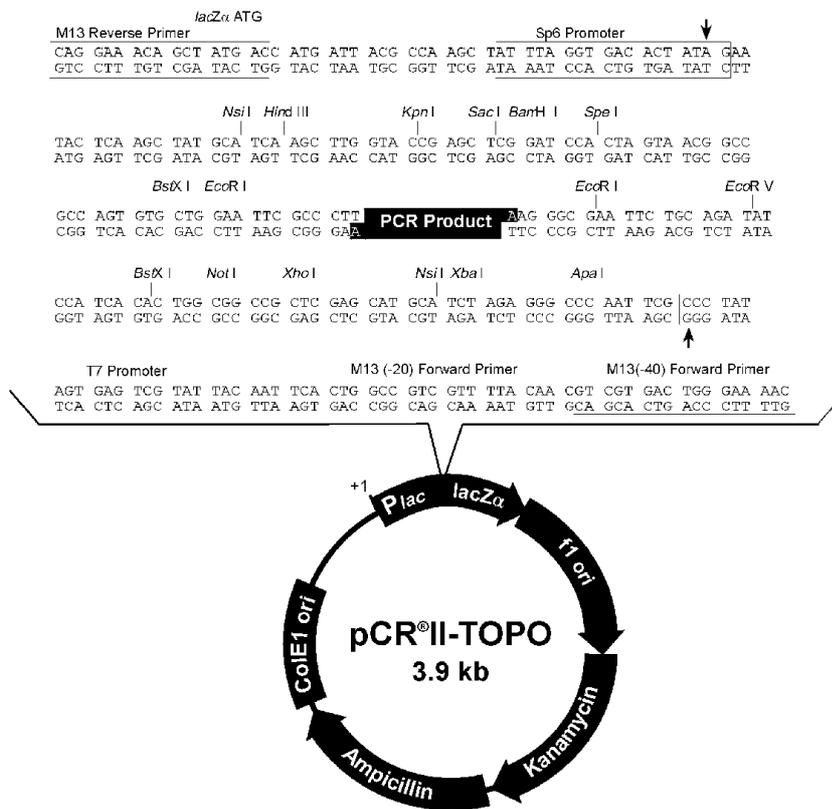
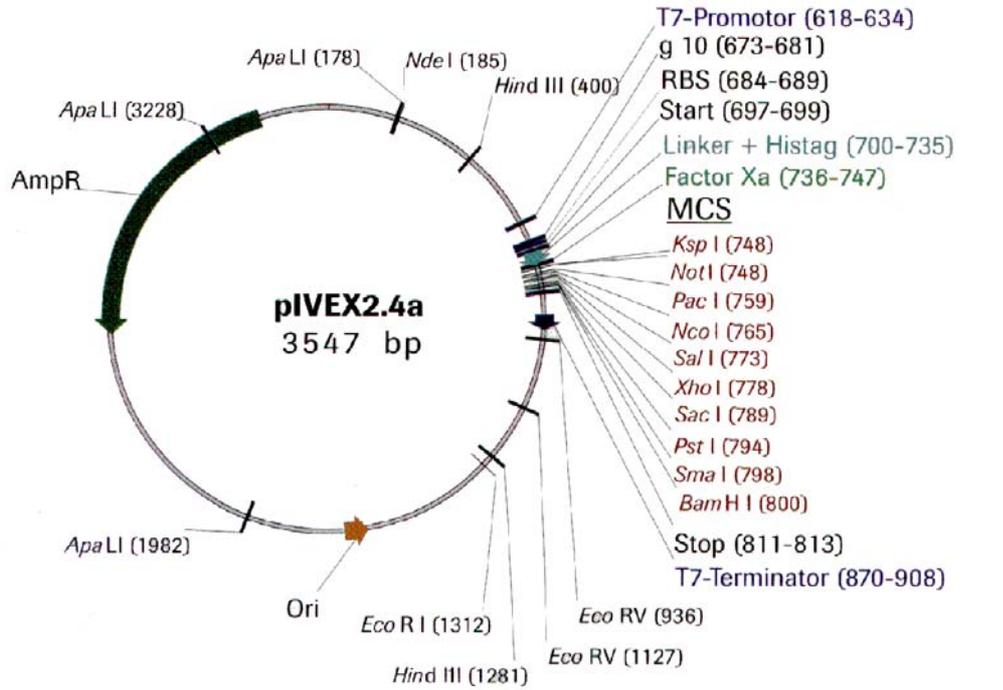


Abb.: 2.1 pCRII Vektor

Der pCRII[®]-TOPO Vektor wurde für TA-Klonierungen verwendet (siehe Kapitel 3.14).

pIVEX 2.4a (Roche, Mannheim) siehe Abb.: 2.2



	T7-Promotor				
601	TCTCGATCCC AGAGCTAGGG	GCGAAATTAA CGCTTTAATT	TACGACTCAC ATGCTGAGTG	TATAGGGAGA ATATCCCTCT	CCACAACGGT GGTGTGCGCA
			g10 ε	RBS	
651	TTCCCTCTAG AAGGGAGATC	AAATAATTTT TTTATTAATA	GTTTAACTTT CAAATTGAAA	AAGAAGGAGA TTCTTCCTCT	TATACCATGT ATATGGTACA MetS
	Linker	Histag			KspINotI
701	CTGGTTCTCA GACCAAGAGT erGlySerHi	TCATCATCAT AGTAGTAGTA sHisHisHis	CATCATAGCA GTAGTATCGT HisHisSerS	GCGGCATCGA CGCCGTAGCT erGlyIleGl	AGGCCGCGGC TCCGGCGCCG uGlyArgGly
	PacI	NcoI	SalI XhoI	SacI PstI	SmaIBa
751	CGCTTAATTA GCGAATTAAT ArgLeuIleL	AAACCATGGC TTTGGTACCG ysThrMetAl	AGTCGACTCG TCAGCTGAGC aValAspSer	AGCGAGCTCT TCGCTCGAGA SerGluLeuC	GCAGCCCAGGG CGTCGGGCC ysSerProGl
	mHI				
801	ATCCGGCTGC TAGGCCGACG ySerGlyCys	TAACAAAGCC ATTGTTTCGG ***	CGAAAGGAAG GCTTTCCTTC	CTGAGTTGGC GACTCAACCG	TGCTGCCACC ACGACGGTGG

Abb.: 2.2 pIVEX2.4a Vektor

Der pIVEX2.4a Vektor wurde zur in vitro Transkription/Translation der cDNA von 26C/C9/2 eingesetzt (siehe Kapitel 3.32).

Uni-ZAP XR (Stratagene, La Jolla, USA) siehe Abb.: 2.3

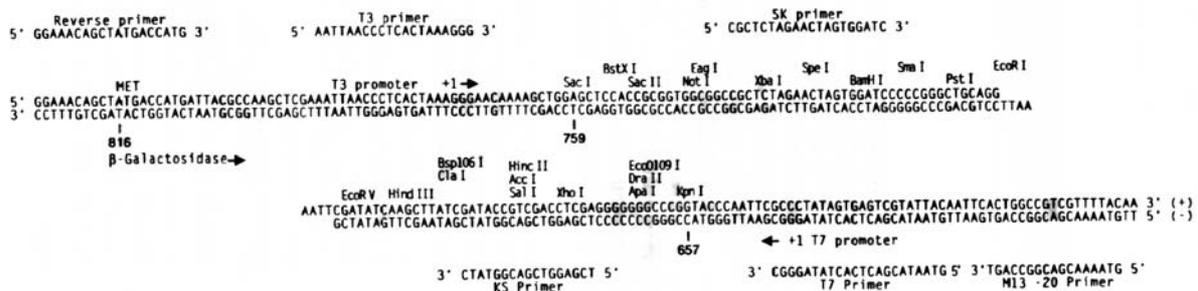
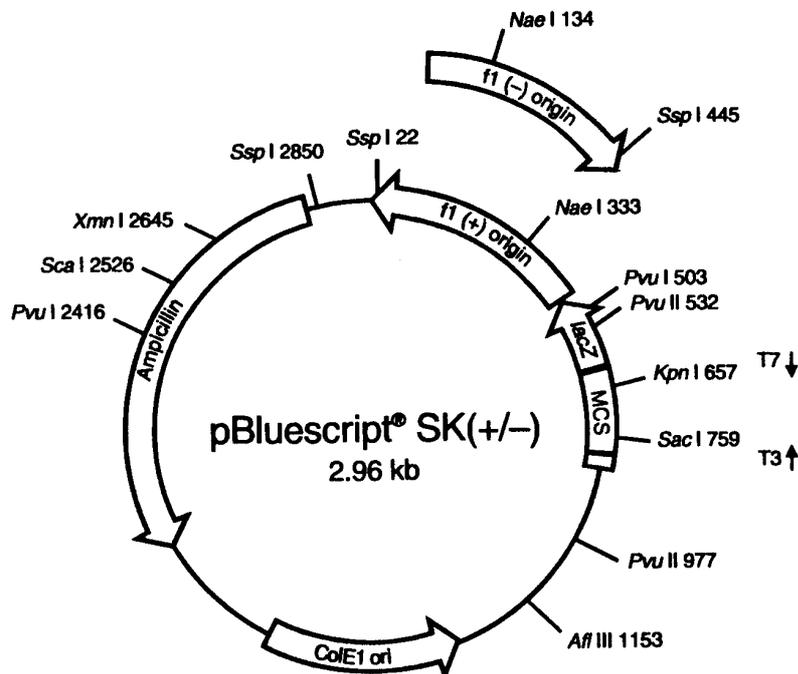


Abb.: 2.3 Uni-Zap XR Vektor

Mit Hilfe der in den Uni-Zap XR Vektor klonierten cDNA-Bibliothek erfolgte ein Phagen-Screening zur Verlängerung der cDNA-Sequenz von 26C/C9/2 (siehe Kapitel 3.25.2).

2.10 Zelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien wurden im wesentlichen von Olga Mezler und Jürgen Kretschmer durchgeführt. Dabei handelte es sich um HeLa-Zellen (epitheliales Cervixkarzinom; human) und Ovarialkarzinomzelllinien.

Die Ovarialkarzinomzelllinien Caov-3, ES-2, MDAH2774, NIH:OVCAR-3 und SK-OV-3 wurden bei der American Type Culture Collection (Rockville, USA) erworben. Die Zelllinien Caov-3, MDAH2774 und NIH:OVCAR-3 wurden ursprünglich aus ovariellen Adenokarzinomen gewonnen. Sie weisen eine epitheliale Morphologie auf und wachsen

adhärent. NIH:OVCAR-3 exprimiert einen Androgen-, Östrogen- und Progesteron-Rezeptor und besitzt Resistenzen gegen klinisch relevante Konzentrationen von Adriamycin, Melphalan und Cisplatin. Auch die Zelllinie SK-OV3, die aus Ascites gewonnen wurde, ist resistent gegen Cisplatin und Adriamycin. Zusätzlich zeigt sie eine Resistenz gegen das Diphtherie-Toxin. Die Zelllinien GG, HEST und MT wurden freundlicherweise von den klinischen Kooperationspartnern der Frauenklinik Heidelberg zur Verfügung gestellt. Sie wurden dort aus Ascites gewonnen und kultiviert.

2.11 Histologische Befunde von Patientengeweben

Patientin	Histologische Befunde von asservierten Patientengeweben
18	Patientin 18 war zum Zeitpunkt der Operation 33 Jahre alt. Ein histologischer Befund des Tumors liegt nicht vor.
21	In den Abstrichen des Tubenepithels lagen besonders viele Zellen vor. Bei dem Ovarialtumor handelte es sich um ein Zweitkarzinom, das nach einem histologisch gesicherten Borderline-Tumor auftrat, der etwa ein Jahr zuvor operiert wurde. Die Patientin war zum Zeitpunkt der zweiten Operation 25 Jahre alt.
22	Von dieser Patientin (73 Jahre alt) wurden Abstriche einer muzinösen Zyste und des Tubenepithels asserviert. Ebenso wurden ein solider Brenner-Tumor und gesundes Ovar für weitere Untersuchungen asserviert.
26	Bei Patientin 26 handelte es sich um eine 56 jährige Frau, deren histologischer Befund ergab, daß es sich bei ihrem Tumor um ein mittelgradig differenziertes, seröses, papilläres Adeno-Karzinom handelte, das beide Ovarien betraf und Netzmetastasen gebildet hatte. Darüber hinaus waren jedoch zum Zeitpunkt der Operation keine weiteren Organe vom Tumor befallen. Während der Operation wurden auch Proben von den Netzmetastasen für die <i>in situ</i> Hybridisierung entnommen.
30	Patientin 30 (77 Jahre alt) wurde vor mehr als 10 Jahren an einem Brustkarzinom operiert. Bei dem hier vorliegenden Tumorgewebe des Ovars handelte es sich jedoch eindeutig um keine Brustkrebsmetastasen, sondern um einen davon unabhängiges Ovarialkarzinom.
31	Bei Patientin 31 handelte es sich um eine 69 jährige Frau, bei der ein mittelgradig differenziertes Adeno-Karzinom entfernt und dessen Typ nicht festgelegt wurde. Eine Tumoreinstufung ergab die Zuordnung zu GII. Das TNM-Stadium wurde auf T1c festgelegt. Dieses entspricht dem FIGO-Stadium I und bedeutet, daß der Tumor auf ein oder beide Ovarien beschränkt ist, sich jedoch maligne Zellen im Aszites oder bei einer Peritonealspülung nachweisen lassen.
46	Das Karzinom von Patientin 46 war mittelgradig differenziert, das bereits zum Teil nekrotisch und mit Teilinfiltrationen des linken Ovars versetzt war. Eine Tumoreinstufung ergab die Zuordnung zu GII. Das TNM-Stadium wurde auf T3b (FIGO-Stadium III) festgelegt. Bei diesem Stadium hat der Tumor ein oder beide Ovarien befallen, zusätzlich können Peritonealmetastasen jenseits des Beckens histologisch nachgewiesen werden, deren Ausdehnung größer als 2 cm sind und/oder regionäre Lymphknotenmetastasen aufweisen.

2.12 Primer

Primer für den SMART™ PCR Synthese Kit:

CDS-Primer	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CT ₍₃₀₎ N ₋₁ N (N= A, C, G, T; N = A, G, C)
PCR Primer	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT

Primer für die subtraktive Hybridisierung:

Adapter Primer 1	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CTC GAG CGG CCG CCC GGG CAG GT
Adapter Primer 2R	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAG CGT GGT CGC GGC CGA GGT
PCR Primer 1	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C
nested PCR Primer 1	TCG AGC GGC CGC CCG GGC AGG T
nested PCR Primer 2R	AGC GTG GTC GCG GCC GAG GT

Primer für Differential Display und modifiziertes Differential Display:

Die Primer wurden, soweit nicht anders angegeben, bei SIGMA (Deisenhofen) oder Eurogentec (Köln) synthetisiert.

Die Arbitraryprimer (die Erläuterung des Begriffs ist in Kapitel 4.5.3 beschrieben) des modifizierten Differential Display besitzen die selben Sequenzen wie die unten genannten Primer, haben jedoch in 5'-Richtung die zusätzlichen Basen: CGT GAA TTC.

Die Ankerprimer G und C weisen im modifizierten DD zusätzlich die Basen: GAA TTC GCC in 5'-Richtung auf.

Ankerprimer G	TTT TTT TTT TTT VG
Ankerprimer C	TTT TTT TTT TTT VC
Arbitraryprimer 1	GTG CAA TGA G
Arbitraryprimer 2	CAA TGC GTC T
Arbitraryprimer 3	AGG ATA CGT G
Arbitraryprimer 4	TCC CTT TAG C
Arbitraryprimer 5	CGG ATA ACT G
Arbitraryprimer 6	AGG TTC TAG C
Arbitraryprimer 7	TCC GAC GTA T
Arbitraryprimer 8	GGA AGA CAA C
Arbitraryprimer 9	AGA AGC GAT G
Arbitraryprimer 10	CCA TTT ACG C
Arbitraryprimer 11	AAA TCG GAG C
Arbitraryprimer 12	GTC CAT AGC A
Arbitraryprimer 13	CTA CTA GGG T
Arbitraryprimer 14	CAT AGC CCT T
Arbitraryprimer 15	CTA CTA GGG T
Arbitraryprimer 16	AGT GAA TGC G
Arbitraryprimer 17	ACG ATT CCT G
Arbitraryprimer 18	TTT ACG GTG G
Arbitraryprimer 19	ATG GTG TAG C
Arbitraryprimer 20	AAT CAC ACC C

Primer für 26C/C9/2:

MATERIAL

26C/C9/2-lower1360	CCA AGC CCC ATG ACC AGC TGT GCT TC
26C/C9/2-upper124	GTA CTG GCT GCT CGG GCT ATT CAT AAC A
26C/C9/2/5'-RACE533	TAT GCT TCG GAT TCT GCG CCT CTA TGT T
26C/C9/2/5'-nested RACE145	GGG ATT CTG TCA TGC GGA AGA TGT TAT G
26C/C9/2p-endProt-u	ATG AAA TTG ACC TTT TTT CTT CTT TTC TTC C
26C/C9/2p-Prot-l	TGC TTC GGA TTC TGC GCC TCT ATG TTC

Sonstige Primer:

G3PDH-upper	GAC CAC AGT CCA TGC CAT CAC T
G3PDH-lower	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG
β -Aktin-upper	TCT ACA ATG AGC TGC GTG TG
β -Aktin-lower	CAT CTC TTG CTC GAA GTC C
Fibronectin-uppper	CGC ATA GCC CTT TGC TCT GGA GGA AG
Fibronectin-lower	AGA TAT TTC TAG GCA ATT ACT AGG ATC A
SemaphorinE-upper	CGT GAA TTC GAG TGA ATG CGG TCA GAA C
SemaphorinE-lower	GTG TTG TCC TCG GGT TAC CAG
CD53-upper	GCT GGG CAA TGT GTT TGT CAT CGT GGG
CD53-lower	GGC CAC TGG TCC AAT CAC TCG TGC CAT T
RACE Primer 1	CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC
RACE nested Adaptor Primer 2	ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC

3 Methoden

3.1 Gewebeentnahme

Die Entnahme von Tumorproben des Ovars und des normalen Epithels der Tube erfolgte während der Operationen bei den erkrankten Patientinnen durch die Kooperationspartner in den Universitätsfrauenkliniken Heidelberg und Tübingen. Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden die Gewebe unverzüglich in 350 µl RLT-Puffer (*ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung*), einen Guanidin-Isothiocyanat-haltigen Puffer, überführt. Die verbleibenden Gewebe wurden sofort in einem 4%igen Paraformaldehydpuffer für eine sich anschließende *in situ* Hybridisierung fixiert.

3.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA von Ovarialkarzinomzelllinien bzw. der Gewebe der an Krebs erkrankten Patientinnen wurde mittels RNeasy Mini-Kit (Qiagen, Hilden) isoliert.

Das sich in 350 µl RLT-Puffer (*ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung*) befindende Gewebe bzw. eine Million Zellen von Ovarialkarzinomzelllinien wurde bei -80°C über längere Zeiträume gelagert. Für die Aufbereitung der RNA wurden die Proben aufgetaut und anschließend unter leichtem Schütteln 30 min bei 37°C inkubiert. Um die vollständige Lyse des Gewebes zu gewährleisten, wurden die Proben zusätzlich mittels QIAshredder-Säulen (Qiagen, Hilden) homogenisiert. Dies geschah durch Zentrifugation bei 8000 x g innerhalb von 2 min. Dabei blieben die Zellfragmente auf der Säule, Proteine, RNA und DNA gelangten in das Eluat. Dieses wurde mit einem Volumanteil 70%igem Ethanol versetzt und anschließend auf eine RNeasy-Minispin-Säule aufgetragen. Nach Zentrifugation bei 8000 x g während 15 sec band die RNA an die Säule und konnte durch Waschen mit 700 µl RW1-Puffer (*ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung*) und 500 µl RPE-Puffer (*ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung*) aufgereinigt werden. Für die RNA-Elution wurden 2 x 30 µl RNase-freies DEPC-Wasser verwendet, das zur Erhöhung der RNA-Ausbeute 1 min auf die Säule einwirkte. Die Elution erfolgte bei 8000 x g während 1 min.

3.3 Konzentrationsbestimmung und Überprüfung der Qualität von RNA

3.3.1 UV-Photometrische Bestimmung der Konzentration von RNA und DNA

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung erfolgte durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dabei entsprach ein Wert von 1 etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA.

3.3.2 Spektrofluorometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Zugabe fluoreszierender Nukleinsäurefarbstoffe zu wässrigen Lösungen von Nukleinsäuren und anschließende Messung der Anregungs- und Emissionswellenlänge ermöglicht die Konzentrationsbestimmung mit geringeren Nukleinsäuremengen, als dies bei der direkten Messung, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, nötig sind. Dazu wurden die RiboGreen™ RNA bzw. PicoGreen™ds DNA Quantifizierung-Kits (Molecular Probes, Leiden, NL) verwendet.

Zunächst wurde nach Isolierung der RNA aus den Gewebeproben die DNA durch DNase I abgebaut (siehe Kapitel 3.4). Damit sollten Wechselwirkungen zwischen DNA und dem Farbstoff verhindert werden, da diese die Messung der RNA-Konzentration beeinträchtigen würden. Anschließend wurde aus einer 20fachen TE Stammlösung eine 1fach Lösung mit H₂O_{DEPC} hergestellt und damit die ribosomale RNA und die aus den Geweben isolierte RNA verdünnt. Für die erste (high-range) Standard-Kurve wurde die rRNA auf 4, 10, 20, 40, 100, 160 und 200 ng pro 200 µl, für die zweite (low-range) Standard-Kurve auf 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 8 und 10 ng pro 200 µl verdünnt. Da die Konzentrationsbestimmung mit Hilfe dieser Methode ab etwa 4 ng/ml belastbar ist, wurde die RNA aus den Gewebeproben 1:100 und 1:200 verdünnt, so daß man davon ausgehen konnte, in einem Konzentrationsbereich zu liegen, bei der eine Messung reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Zusätzlich mußte der Farbstoff vor Zugabe zu den RNA-Proben für den High-range Assay 1:200 und für den Low-range Assay 1:2000 verdünnt werden. Jeweils 100 µl der verdünnten RNA Proben wurden mit 100 µl des entsprechend verdünnten Farbstoffs versetzt, durchmischt und schließlich 5 min im Dunkeln inkubiert, bevor die spektrofluorometrische Messung vorgenommen wurde.

3.3.3 Überprüfung der Qualität von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Überprüfung der RNA erfolgte durch horizontale Gelelektrophorese („Qualitätskontrolle“). RNasen auf Gelkammern, -schlitten und -kämmen wurden durch 30 minütige Behandlung mit 0,05 M NaOH entfernt. In der mit H₂O_{DEPC} gereinigten Kammer wurde ein 1%iges Agarosegel gegossen. Die Lösung für das Gel und den Elektrophoresepuffer (1 x MOPS-Lösung) bestand aus 200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA und war auf pH 6,5 eingestellt. Dem Agarosegel wurden 2 µl EtBr (10mg/ml) zugesetzt. Pro Geltasche wurde 1 µg RNA mit 2 µl RNA-Probenpuffer (0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylen Cyanol FT, 40% (w/v) Saccharose) versetzt und aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte innerhalb von 30 min durch Anlegen einer Spannung von 100 Volt. Anschließend wurde das Gel auf einem UV-Flächenstrahler fotografiert.

3.4 Hydrolyse von DNA mittels DNase I

Die restliche DNA, die in einem 0,5 µg Gesamt-RNA Ansatz verblieb, wurde in einem Volumen von 50 µl mit 0,5 Units Desoxyribonuklease I (Gibco BRL, Eggenstein) in Anwesenheit des entsprechenden Puffers (20 mM Tris-HCl pH 8,4, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl) innerhalb von 15 min bei 25°C verdaut. Durch Zugabe von 1/10 Volumenanteil 25 mM EDTA wurde die DNase I bei einer Temperatur von 65°C innerhalb von 10 min denaturiert.

3.5 Reverse Transkription (RT) von mRNA- und cDNA- Amplifikation mit SMART™ PCR Synthese Kit

3.5.1 Reverse Transkription von mRNA

In einigen Fällen wurde die reverse Transkription mittels des SMART™ PCR (Switch Mechanism At the 5'-ends of RNA Template) cDNA Synthese Kit der Firma Clontech, Heidelberg, durchgeführt. Im Gegensatz zur reversen Transkription mit anschließender Differential Display-PCR erfolgte nach der RNA-Isolierung keine Hydrolyse der DNA durch DNase I.

Pro RT wurden 100 ng Gesamt-RNA verwendet. Zusätzlich enthielt der Ansatz 2 µM CDS-Primer sowie 2 µM SMARTII Oligonukleotid. Der Ansatz wurde mit H₂O_{DEPC} auf 5 µl aufgefüllt, gemischt, kurz bei 13000 x g zentrifugiert und anschließend bei 72°C für 2 min inkubiert. Danach wurden die Proben für 2 min auf Eis gestellt und folgende Reagenzien zugesetzt: 1 x Erststrang-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 6 mM MgCl₂), 4 mM DTT, 2 mM dNTP-Mix und 200 U Superscript II Reverse Transcriptase (Gibco BRL, Eggenstein). Die Proben wurden für 1 h bei 42°C inkubiert, danach wurden 40 µl H₂O zugesetzt. Vor der Lagerung der cDNAs bei -20°C erfolgte die Inaktivierung der reversen Transkriptase durch Hitze (7 min bei 70°C).

3.5.2 cDNA-Amplifikation

In die SMART-PCR wurden 0,2 ng der Ansätze der reversen Transkription, dies entsprach 10 µl cDNA, eingesetzt. Zusätzlich enthielten die 100 µl Ansätze 1 x KlenTaq PCR Puffer (40 mM Tricine-KOH pH 9,2, 15 mM KOAc, 3,5 mM Mg(OAc)₂, 3,75 µg BSA), 0,2 mM dNTP-Mix, 0,2 µM PCR Primer sowie 1 x Advantage KlenTaq Polymerase Mix (Clontech, Heidelberg). Die Proben wurden durchmischt und bei 13000 x g kurz zentrifugiert. Die PCRs erfolgten in einem PCR-Gerät PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Biozym, Hess. Oldendorf).

Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: Zunächst wurden die Proben bei 95°C während 1 min denaturiert, anschließend wurden 15 Zyklen durchlaufen. Diese enthielten einen Denaturierungsschritt bei 95°C für 15 sec, die Anlagerung der Primer bei 65°C für 30 sec und die Verlängerung der DNA bei 68°C für 6 min. Nach 15 Zyklen wurden von jedem Ansatz 15 µl entnommen und auf Eis aufbewahrt. Der jeweils verbliebene Inhalt durchlief drei weitere Zyklen unter den selben Bedingungen. Danach wurden erneut 15 µl pro Ansatz abgenommen. Dieses Verfahren wurde bis zu einer Gesamtzyklenzahl von 24 Zyklen wiederholt. Mit 5 µl der entnommenen Proben wurde die optimale Zellzyklenanzahl durch Gelelektrophorese festgestellt (siehe Kapitel 3.12). Die während der PCR herausgenommenen Proben wurden daraufhin zusätzlichen Zyklen ausgesetzt, bis diese der optimalen Zyklenanzahl entsprachen. Die DNA wurde mit dem PCR Purification Kit der Firma Qiagen, Hilden, aufgereinigt (siehe Kapitel 3.23) und für die anschließende DD-PCR auf eine Konzentration von 0,1 ng/µl eingestellt (siehe Kapitel 3.8.1). Für die Verwendung in einem subtraktiven Hybridisierungs-Experiment mußte die DNA mit RsaI verdaut (siehe Kapitel 3.27) und erneut mit Hilfe des PCR Purification Kits gereinigt werden.

3.6 Reverse Transkription der mRNA

3.6.1 Reverse Transkription für unmodifizierte Differential Display-PCR

Die reverse Transkription von 0,5 µg Gesamt-RNA erfolgte in einem 20 µl Ansatz. Dieser enthielt 6,25 µM Ankerprimer, 1 x RT-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 10 mM DTT (Sigma, Deisenhofen), 500 µM dNTP-Mix (Amersham, Cleveland), 20 U RNase-Inhibitor (Boehringer, Mannheim) und 100 U SuperSCRIPT II RNase H⁺ Reverse Transkriptase (Gibco BRL, Eggenstein). Vor Zugabe des Enzyms wurden alle Bestandteile auf 42°C erwärmt und nach Zugabe 1 h bei 42°C inkubiert. Danach wurde die reverse Transkriptase 15 min bei 70°C hitzeinaktiviert, die cDNA mit 30 µl H₂O verdünnt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.6.2 Reverse Transkription für modifizierte Differential Display-PCR oder (semi)quantitative PCR

Für die reverse Transkription von 0,5 µg Gesamt-RNA wurde ein Ansatz von 20 µl hergestellt. Darin enthalten waren 1 µM Ankerprimer, 1 x RT-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 10 mM DTT (Sigma, Deisenhofen), 500 µM dNTP-Mix (Amersham, Cleveland), 20 U RNase-Inhibitor (Boehringer, Mannheim) und 100 U SuperSCRIPT II RNase H⁺ Reverse Transkriptase (Gibco BRL, Eggenstein). Nach 1 h Inkubation bei 42°C wurde die reverse Transkriptase hitzeinaktiviert (15 min bei 70°C), die cDNA 1:1,5 mit Wasser verdünnt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.7 Subtraktive Hybridisierung

Die subtraktive Hybridisierung (siehe auch Abb.: 3.1) wurde mit Hilfe des CLONTECH PCR-SELECT™ cDNA Subtraktion Kits der Firma Clontech (Heidelberg) durchgeführt.

Hierfür wurde mRNA mit Hilfe des SMART PCR cDNA Synthese Kits revers transkribiert (siehe Kapitel 3.5.1) und amplifiziert (Kapitel 3.5.2). Die cDNA wurde säulenchromatographisch aufgereinigt, mit RsaI Endonuklease verdaut und erneut aufgereinigt. Die so gewonnene cDNA wurde in Wasser aufgenommen, so daß die Endkonzentration 50 ng/µl betrug.

3.7.1 Adapter-Ligation, erste und zweite Hybridisierungsreaktion

Zu 100 ng „Tester“ cDNA wurden jeweils 1 µM Adapter 1 bzw. 1 µM Adapter 2R, 1 x Ligationspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT und 0,05 mg/ml BSA) und 400 U T4 DNA Ligase (Clontech, Heidelberg) zugegeben. Dieser Ansatz (insgesamt 10 µl) wurde bei 16°C und 15 h inkubiert. Die Ligase wurde anschließend durch Zugabe von 10 mM EDTA sowie 50 µg/ml Glycogen und Erhitzen auf 72°C während 5 min inaktiviert. Die Proben wurden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Für die erste Hybridisierungsreaktion wurden jeweils 450 ng der RsaI verdauten „Driver“ cDNA mit 1 x Hybridisierungspuffer (*ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung*) und 1,5 µl der Adapter 1 ligierten Tester (Hybridisierungsprobe 1) bzw. 1,5 µl der Adapter 2R ligierten Tester DNA (Hybridisierungsprobe 2), was einem etwa 33fachen Überschuß an „Driver“ entspricht, versetzt. Die Proben wurden mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und kurz zentrifugiert. Nach Erhitzen (90 sec) auf 98°C wurden die Proben 8 h bei 68°C inkubiert.

Für die zweite Hybridisierungsreaktion wurden 300 ng RsaI verdaute, aufgereinigte „Driver“ cDNA mit 1 x Hybridisierungspuffer und Wasser auf 4 µl aufgefüllt. 1 µl dieser Mischung wurde in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und bei 98°C für 1 1/2 min denaturiert. Während dessen wurde eine Mikropipette auf 15 µl

eingestellt und die Hybridisierungsprobe 2 vollständig aufgezogen. Danach wurde etwas Luft in die Spitze eingezogen und, getrennt durch das Luftkissen, der frisch denaturierte „Driver“ aufgezogen. Beide in der Spritze befindlichen Reaktionsansätze, „Driver“ und Hybridisierungsprobe 2, konnten so gleichzeitig mit Hybridisierungsprobe 1 vermischt werden. Die Reaktion wurde bei 68°C während 15 h inkubiert, mit 200 µl Verdünnungspuffer (20 mM HEPES-HCl pH 8,3, 50 mM NaCl, 0,2 mM EDTA pH 8) versetzt und bei 68°C für 7 min erwärmt. Der Reaktionsansatz konnte bei -20°C gelagert werden.

3.7.2 Erste und zweite Amplifikation der subtrahierten Proben

Die ausschließlich im Tester exprimierten Proben wurden in zwei PCRs amplifiziert. Eine schematische Übersicht der ersten und zweiten Amplifikation ist in Abb.: 3.1 dargestellt.

Die Hybridisierungsreaktionen liefern dabei unterschiedliche Produkte. Im Einzelnen handelte es sich um einzelsträngige Tester cDNA mit den jeweiligen Adaptoren 1 bzw. 2 (a), die doppelsträngigen Tester cDNAs mit einem (c) oder zwei gleichen Adaptoren an beiden 5'-Enden (b), die einzel- und doppelsträngige Driver DNA (d) sowie die doppelsträngigen Tester cDNAs mit unterschiedlichen Adaptoren (e).

Zunächst wurden die Enden der Adaptoren durch die Polymerase aufgefüllt („Auffüllreaktion“) und für die erste Amplifikation, bei der nur doppelsträngige cDNAs mit unterschiedlichen Adaptorsequenzen an beiden Enden exponentiell amplifiziert werden, vorbereitet. In einer zweiten PCR wurde der Hintergrund vermindert und die differentiell exprimierten Sequenzen angereichert. Eine Mischung aus 1 µl der verdünnten, subtrahierten cDNA, 1 x KlenTaq PCR Puffer (40 mM Tricine-KOH pH 9,2, 15 mM KOAc, 3,5 mM Mg(OAc)₂, 3,75 µg BSA), 0,2 mM dNTP-Mix, 0,4 µM PCR Primer 1 und 1 x Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech, Heidelberg) wurden bei 75°C für 5 min inkubiert und so die Adaptoren „aufgefüllt“. Die anschließende PCR bestand aus folgenden Zyklen: Denaturierung bei 94°C für 25 sec, darauffolgend 27 Zyklen mit einem Temperaturverlauf von 94°C für 10 sec, 66°C 30 sec und 72°C für 1,5 min. 3 µl des primären PCR-Produkts wurden mit 27 µl H₂O versetzt, wovon für die zweite PCR lediglich 1 µl eingesetzt wurde. Zusätzlich wurden 1 x KlenTaq PCR Puffer, 0,4 µM nested PCR Primer 1, 0,4 µM nested PCR Primer 2R, 0,2 mM dNTP-Mix und 1 x Advantage cDNA Polymerase Mix zugesetzt. Die Bestandteile wurden durchmischt, kurz zentrifugiert und folgender PCR unterzogen: 12 Zyklen bei 94°C für 10 sec, 30 sec bei 68°C und 1,5 min bei 72°C. Die Proben wurden -20°C gelagert.

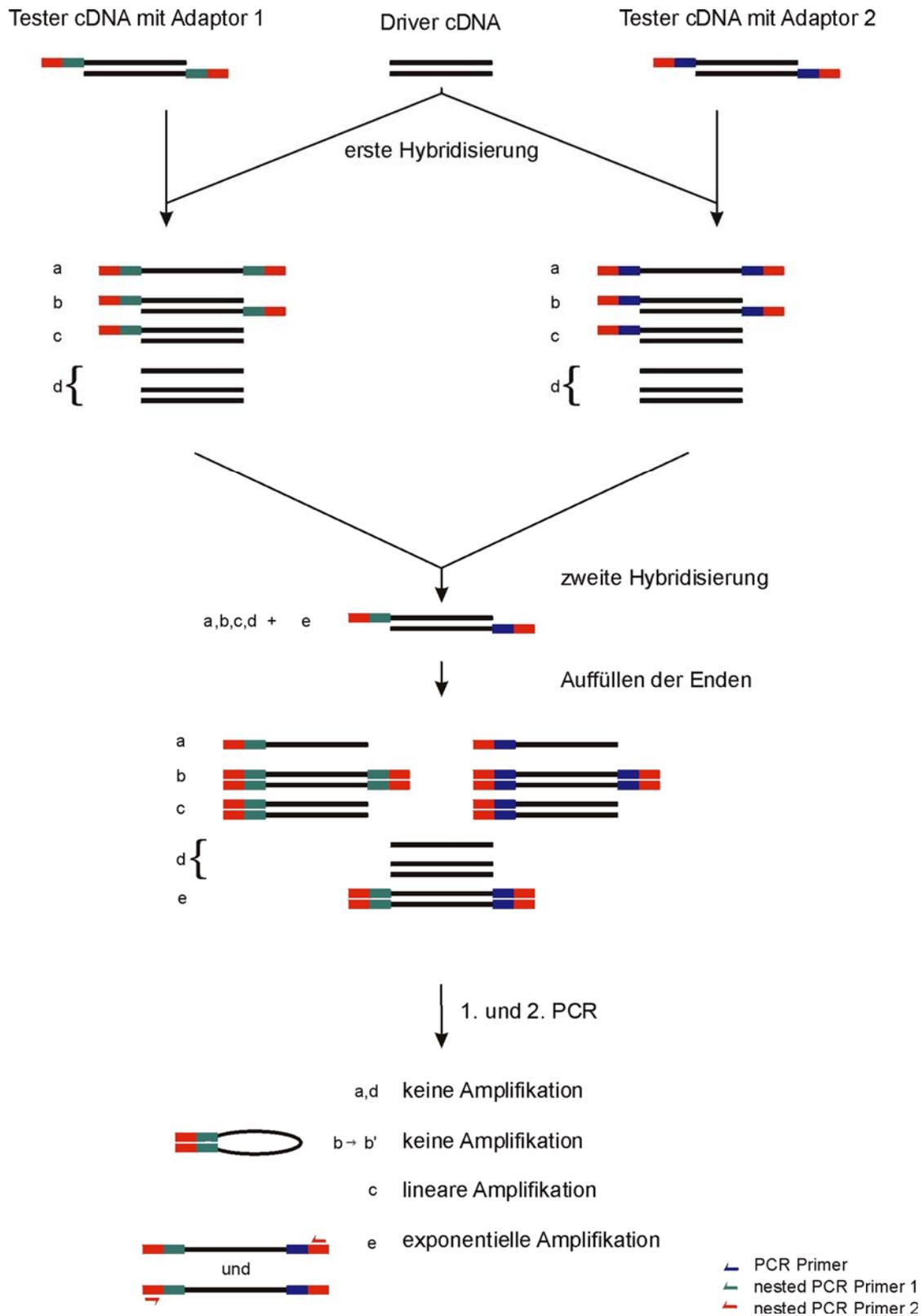


Abb.: 3.1 Schematische Übersicht der subtraktiven Hybridierungs-PCRs.

3.8 Differential Display-PCR

Die Durchführung der Differential Display Methode ist in der Abfolge der Arbeitsschritte in Abb.: 3.2 schematisch dargestellt. Die Isolierung von RNA aus Geweben und Zelllinien, die Hydrolyse von DNA und die reverse Transkription von mRNA ist auch für andere Methoden, beispielsweise für (semi)quantitative PCRs, relevant und wurde bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben. Sie sind hier für einen vollständigen Überblick nochmals mit aufgenommen.

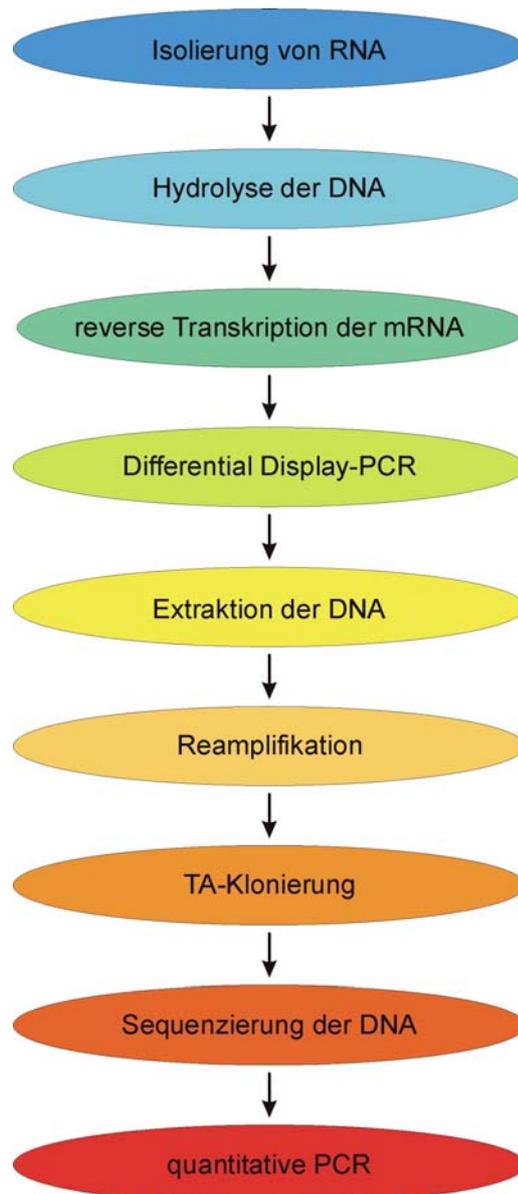


Abb.: 3.2 Schematische Darstellung der Differential Display Methode.

3.8.1 Differential Display-PCR vor Modifikation

Das Prinzip der reverse Transkription der mRNA und der Differential Display-PCR mit Anker- und Arbitraryprimern ist in Abb.: 3.3 dargestellt.

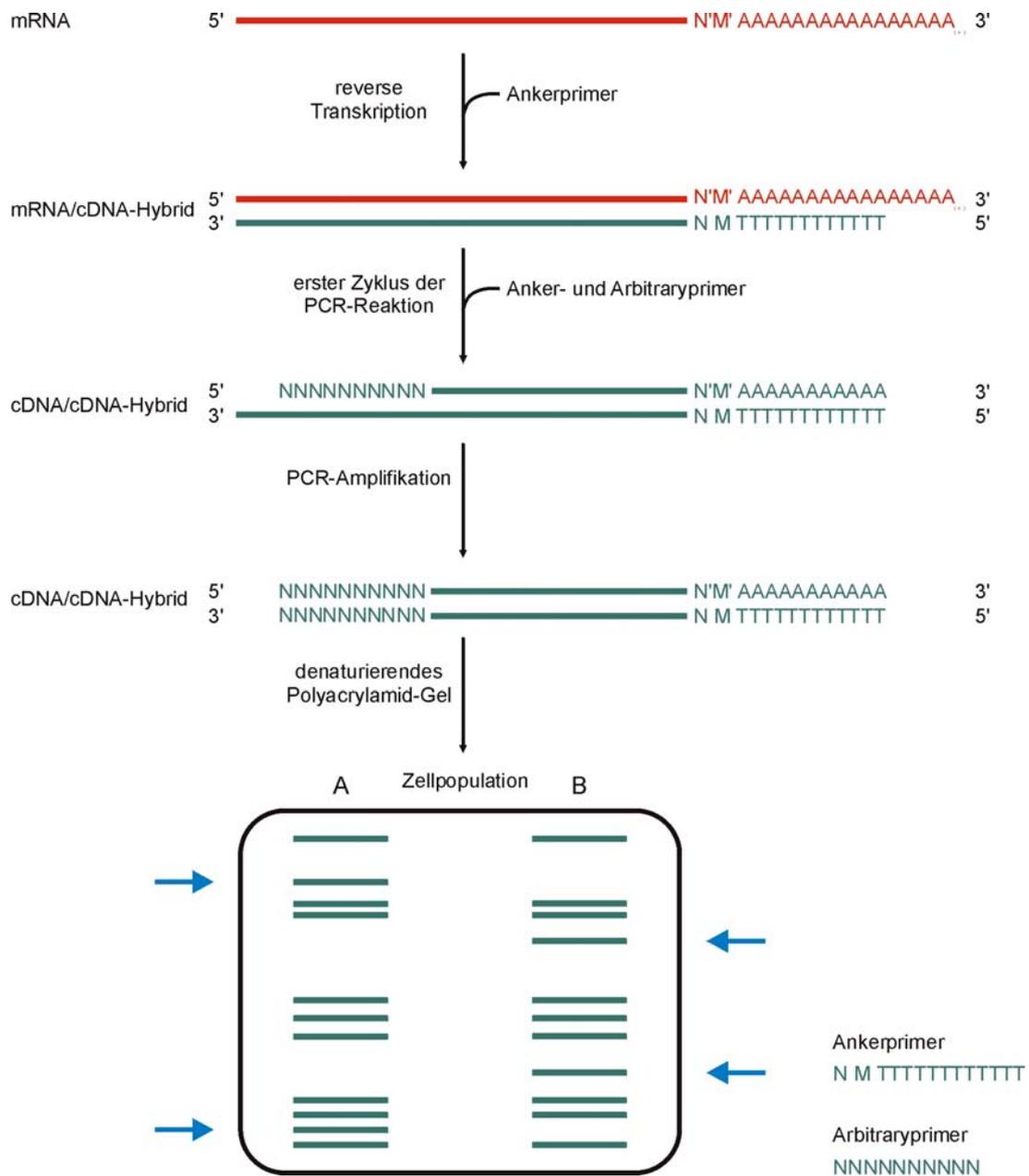


Abb.: 3.3 Schematische Darstellung der reversen Transkription, der Differential Display-PCR und der Auswahl signifikanter Banden.

Für die DD-PCR Ansätze wurden 0,2 ng cDNA und 2 µM Arbitraryprimer (siehe Kapitel 2.12) eingesetzt. Zusätzliche Bestandteile waren 1 x Goldstar DNA Polymerase Puffer (75 mM Tris-HCl, pH 9, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% (v/v) Tween20), 1,875 mM MgCl₂, (Eurogentec, Köln), 2 µM dNTP-Mix (Amersham, Cleveland, USA), 50 µM Ankerprimer, 1 µCi [α-³³P] dATP (Amersham, Cleveland, USA) sowie 0,002 U Goldstar DNA Polymerase (Eurogentec, Köln). Die DD-PCRs wurden im PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Biozym, Hess. Oldendorf) bei folgenden PCR-Bedingungen durchgeführt:

Eine erste Denaturierung erfolgte innerhalb von 5 min bei 96°C, danach wurde 40 mal der Temperaturverlauf 1 min bei 94°C, 2 min bei 42°C und 30 sec bei 70°C wiederholt. Abschließend erfolgte eine Elongation für 3 min bei 70°C, damit die Polymerase zusätzliche Adenine anfügt, die Voraussetzung für die TA-Klonierung sind. 10 µl der PCR-Produkte wurden unter Vakuum getrocknet und in 6 x DNA-Probenpuffer (0,3% (w/v) Bromphenolblau, 0,3% (w/v) Xylen Cyanol FT, 10 mM EDTA pH 7,5, 97,5% (v/v) Formamid_{deionisiert}) aufgenommen. Nach Denaturierung der Proben für 10 min bei 96°C wurden die PCR-Produkte in einem 6%igen denaturierenden PAGE-Gel aufgetrennt.

3.8.2 Differential Display-PCR nach Modifikation

Pro Differential Display-PCR Ansatz wurden 0,5 ng cDNA und 1 µM Arbitraryprimer eingesetzt. Weitere Bestandteile des Ansatzes waren 1 x Goldstar DNA Polymerase Puffer (75 mM Tris-HCl, pH 9, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% (v/v) Tween20), 1 mM MgCl₂ (Eurogentec, Köln), 5 µM dNTP-Mix (Amersham, Cleveland, USA), 1 µM Ankerprimer (Eurogentec, Köln), 1 µCi [α-³³P] dATP (Amersham, Cleveland, USA) sowie 0,05 U Goldstar DNA Polymerase (Eurogentec, Köln). Die DD-PCRs wurden in einem PCR-Gerät „PTC-200 Peltier Thermal Cycler“ (Biozym, Hess. Oldendorf) mit 2 unspezifischen und 35 spezifischen Zyklen durchgeführt. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: Zunächst erfolgte eine Denaturierung innerhalb von 5 min bei 94°C, danach wurde zweimal der Temperaturverlauf 1 min bei 94°C, 2 min bei 37°C und 5 min bei 72°C wiederholt. Damit waren die unspezifischen Zyklen durchlaufen. Die spezifischen 35 Zyklen begannen mit einem Denaturierungsschritt bei 94°C 1 min, anschließend hybridisierten die Primer 1 min bei 55°C, die Verlängerung geschah bei 72°C in 1 min. Abschließend erfolgte eine Elongation für 3 min bei 70°C, damit die Polymerase zusätzliche Adenine anfügt, die Voraussetzung für die TA-Klonierung sind. 10 µl der PCR-Produkte wurden unter Vakuum getrocknet und in 6 x DNA-Probenpuffer (0,3% (w/v) Bromphenolblau, 0,3% (w/v) Xylen Cyanol FT, 10 mM EDTA pH 7,5, 97,5% (v/v) Formamid_{deionisiert}) aufgenommen. In einem 6%igen denaturierenden PAGE-Gel wurden die PCR-Produkte aufgetrennt.

3.9 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Vor der Herstellung des PAGE-Gels wurden die Glasplatten (40 x 33 x 0,04 cm) mit Seife, Ethanol und Aceton gereinigt und mit Hilfe von Blueslick (Serva, Heidelberg) silanisiert. Die ausgesparte Platte wurde zusätzlich an dem Ende, an dem der Kamm eingeführt wurde, mit 62,5 µl Bindsilan-Lösung (80% (v/v) Bindsilan/EtOH-Lösung, (Pharmacia, Freiburg) 20% (v/v) Essigsäure) behandelt. Zwischen die, mit Spacern versehenen, abgedichteten Glasplatten wurde das Gemisch der Polymerisationskomponenten zur Herstellung eines 6%igen denaturierenden PAGE Gels (48 ml Sequagel XR extender range, 12 ml Sequagel complete (Biozym, Hess. Oldendorf) 450 µl 10% APS) gefüllt und die Gelkämme (0,4 mm x 10 mm x 2 mm) eingeführt. Bis zur vollständigen Polymerisation des Gemisches wurde das Gel horizontal gelagert. Danach wurden die Kämmen gezogen, für 30 min eine Leistung von 40 Watt angelegt und anschließend die denaturierten Proben aufgetragen. Während 2,5 h bei 60 W erfolgte die Auftrennung in 1 x TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3). Das Gel wurde auf ein 3 MM Gel-Blotting-Papier (Schleicher & Schüll, Dassel) transferiert und bei 80°C für 2 h getrocknet. Die Exposition eines Biomax™ MR Films (Kodak-Aldrich, Steinheim) erfolgte bei 25°C etwa 24 h lang.

3.10 Ausschneiden signifikanter Banden

Nach Entwicklung eines Biomax™ Films, der über 24 h auf einem PAGE-Gel exponiert war, konnten signifikante Banden ausgeschnitten werden. Bei diesen handelte es sich um Unterschiede zwischen der cDNA aus Normal- und Tumorgewebe einer Patientin bzw. unterschiedlichen Ovarialkarzinomzelllinien. Auf das PAGE waren pro Gewebetyp vier parallele DD-PCR-Ansätze, die mit cDNA aus zwei parallelen reversen Transkriptionen hergestellt wurden, aufgetragen. Dies bedeutet, daß pro Anker-/Arbitraryprimer Kombination insgesamt acht Spuren (jeweils vier von einem Gewebetyp) auf einem PAGE zu sehen waren. Bei Identifikation von Unterschieden in den Viererblöcken wurden die entsprechenden Banden auf dem Film markiert. Das getrocknete Gel und der Film wurden an den Markierungspunkten zur Deckung gebracht und fixiert. Mit einem sterilen Skalpell wurde die markierte Bande möglichst knapp ausgeschnitten, da der Harnstoff in den verwendeten Gellösungen die nachfolgende PCR stört. Nach Überführung der Banden in 100 µl steriles, deionisiertes Wasser konnte die cDNA durch 15 min Erhitzen bei 100°C aus dem Gel eluiert werden.

Ein Beispiel für die Nomenklatur der signifikanten Banden ist 26C/C9/2. Dabei kennzeichnet 26 die Nummer der Patientin, C steht für den Gewebetyp (normales Eileiterepithelium erhält ein N, Ovarialtumorgewebe ein C), C liefert die Information welcher Ankerprimer eingesetzt wurde (VG oder VC), die darauffolgende Zahl 9 steht für die Nummer des verwendeten Arbitraryprimers (1-20), die letzte Zahl 2 kennzeichnet schließlich die Zahl der

aufgefundenen Genexpressionsunterschiede bei einer Primerkombination (von oben gerechnet).

3.11 Reamplifikation von cDNA-Fragmenten

Die Reamplifikation erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die DD-PCRs und diente der Vermehrung der cDNAs der aus einem PAGE geschnittenen Banden.

Dabei wurden die selben Primer in den gleichen Konzentrationen, wie sie bereits in den jeweiligen DD-PCRs verwendet wurden, eingesetzt. Für die Reamplifikation war 1 µl der extrahierten DNA ausreichend. Weitere Bestandteile waren 1 x Goldstar DNA-Polymerase Puffer (75 mM Tris-HCl pH 9, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween20), 1,875 mM bzw. 1 mM MgCl₂ (Eurogentec, Köln), 2 µM bzw. 5 µM dNTP-Mix (Amersham, Cleveland, USA), Primer in der entsprechenden Form und Konzentration und 0,02 U bzw. 0,05 U Goldstar DNA Polymerase (Eurogentec, Köln). Die PCR-Zyklen der Reamplifikation und der DD-PCR waren identisch (siehe Kapitel 3.8.1 und 3.8.2), jedoch entfielen bei der modifizierten DD-PCR die unspezifischen Zyklen.

3.12 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese wurden in der Regel 0,8-2%ige Gele verwendet. Diese wurden mit dem Puffer hergestellt, in dem auch die Elektrophorese stattfand (1x TAE (2 M Tris-HCl pH 8, 2 M Eisessig, 0,05 M EDTA-NaOH pH 8)). Pro Geltasche wurde die DNA, meist 0,1-2 µg, mit 1/6 Volumenanteil DNA-Probenpuffer (6 x Probenpuffer (30% Saccharose, 60 mM EDTA-NaOH pH 8, 0,6% (w/v) SDS, 0,15% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und aufgetragen. Der Gellauf erfolgte während 1-2 h bei 25°C und einer angelegten Spannung von 30-100 Volt (0,07-2,5 V/cm²). Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel 15 min in eine Ethidiumbromid-Lösung gelegt (2 µg/ml EtBr), wobei das EtBr in der DNA interkalierte. Das Gel wurde auf einem UV-Flächenstrahler bei 254 nm photographiert.

3.13 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Rückgewinnung der DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen, Hilden.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente in einem Agarosegel wurde das zu isolierende DNA-Fragment mit Hilfe eines Skalpell auf einem UV-Flächenstrahler ausgeschnitten. Das Gelstück wurde gewogen und pro mg mit 3 Volumenteilen Puffer QG (ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung) versetzt. Mit Hilfe dieses Puffers wurde die Agarose während 10 min Inkubation bei 50°C aufgelöst. Anschließend wurden 100 µl Isopropanol pro 100 mg Gel zugegeben, gemischt und diese Lösung auf eine

„QIAquick“-Säule transferiert. Nach 1 minütiger Zentrifugation bei 10000 x g wurde der Durchfluß verworfen und die Säule mit 0,5 ml Puffer QG von Agaroseresten gereinigt. In einem Waschschrift mit 750 µl Puffer PE (*ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung*), die Zentrifugation erfolgte wie oben, wurden Salze entfernt. Zur Elution der DNA wurden 50 µl Puffer EB (*10 mM Tris-HCl pH 8,5*) auf die Säule gegeben und bei 10000 x g 1 min zentrifugiert.

3.14 TA-Klonierung

Für TA-Klonierungen wurde der pCR[®]II-TOPO Klonierungsvektor der Firma Invitrogen (Groningen) verwendet. Dieser Vektor ist bereits linearisiert und mit einem 3'-Thymidin-Überhang und einer kovalent gebundenen Topoisomerase versehen. Der Klonierungsansatz setzte sich aus etwa 20 ng (2 µl) PCR-Produkt, 3 µl sterilem Wasser und 1 µl pCR[®]II-TOPO Vektor (25 ng) zusammen. Nach 5 min Inkubation bei 25°C wurde der Ansatz auf Eis gestellt und diente der Transformation von chemisch kompetenten Zellen (siehe Kapitel 3.30).

3.15 Bakterienkulturen

Die verwendeten Bakterienstämme wurden als Suspensionskultur in LB-Medium (*1% (w/v) Bacto-Tryptone, 0,5% (w/v) Bacto-Yeast-Extract, 1% (w/v) NaCl, pH 7,5*) oder auf LB-Agarplatten (*LB-Medium inklusive 1,5% (w/v) Bacto-Agar*) kultiviert. Durch Zugabe von Antibiotika, z.B. Ampicillin (*100 µg/ml*) oder Tetracyclin (*50 µg/ml*), erfolgte die Selektion transformierter Bakterien.

3.16 Minipräparation von Plasmid-DNA mittels Säulenchromatographie

Bis zu etwa 20 µg Plasmid-DNA konnten mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits der Firma Qiagen, Hilden, gewonnen werden. Dazu wurden 3 ml LB-Medium inklusive des entsprechenden Antibiotikums mit einer E.coli Kolonie angeimpft und über 15 h bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden bei 2000 x g für 3 min zentrifugiert und der Bakterienniederschlag in 250 µl P1-Puffer (*50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8*) inklusive 100 µg/ml RNase A resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl P2-Puffer (*200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS*) und nach 6-maligem über Kopf drehen, wurden die Zellen alkalisch lysiert. Die Neutralisierung des Lysats erfolgte durch Zugabe von 350 µl N3-Puffer (*ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung*) und 6 maligem Invertieren des Reaktionsgefäßes. Danach wurde 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und auf die QIAprep Säule gegeben. Nach Zentrifugation wurde die Säule zunächst mit 0,5 ml Puffer PB (*ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung*) und anschließend mit 0,75 ml Puffer PE (*ohne Angaben des Herstellers zur*

Pufferzusammensetzung) gewaschen. Die DNA konnte schließlich mit 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 von der Säule eluiert werden.

3.17 Midipräparation von Plasmid-DNA mittels Säulenchromatographie

Durch die Verwendung des Plasmid Midi Kits der Firma Qiagen, Hilden, konnten pro Säule (tip 100) bis etwa 100 µg Plasmid-DNA isoliert werden.

Hierzu wurde zunächst eine E.coli-Bakterienvorkultur mit einem Volumen von 3 ml 8 h bei 37°C inkubiert. Die Vorkultur wurde 1 zu 1000 in 100 ml LB Medium inklusive des entsprechenden Antibiotikums verdünnt und für 15 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend konnten die Bakterien nach Zentrifugation bei 6000 x g während 15 min „geerntet“ werden. Das Bakteriensediment wurde in 4 ml P1-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, pH 8 und 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml P2-Puffer (200 mM NaOH, 1% SDS) und 5 min Inkubation bei 25°C wurden die Zellen lysiert. Danach erfolgte die Neutralisierung des Lysats mit 4 ml eisgekühltem P3-Puffer (3 M KOAc pH 5,5). Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde bei 4°C 30 min bei 20000 x g zentrifugiert, der Überstand abgezogen und auf die bereits mit 4 ml (*Äquilibriumspuffer*: 750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% Isopropanol, 0,15% Triton X-100) äquilibrierte Qiagen-tip 100 Säule gegeben. Die Säule wurde mit 2 x 10 ml Puffer QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% Isopropanol) gewaschen, die DNA mit 5 ml Puffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 15% Ethanol) von der Säule eluiert und schließlich durch Zugabe von 0,7 Volumenanteilen (3,5 ml) Isopropanol p.a. gefällt. Durch Zentrifugation (30 min, 4°C bei 15000 x g) sedimentierte die DNA. Nach Dekantieren des Überstands konnte das Sediment mit 2 ml 70% Ethanol p.a. gewaschen, zentrifugiert, luftgetrocknet und schließlich in 100 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) aufgenommen werden. Um die Ausbeute an DNA festzustellen wurde eine UV-spektrophotometrische Messung (siehe Kapitel 3.3.1) durchgeführt. Die Formel zur Berechnung der DNA-Menge lautet $OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 = \text{Ausbeute an DNA (ng/}\mu\text{l)}$.

3.18 Automatische Sequenzierung von DNA

Alle Sequenzierungen wurden von Andreas Hunziker in der Abteilung von Prof. Franke (DKFZ, Heidelberg) mit Hilfe einer automatischen Sequenziereinheit „Applied Biosystems automated Sequencer 373 A“ nach der „Dye Terminator Chemistry“ von Perkin Elmer durchgeführt. Pro Sequenzierungsreaktion wurden 400-1000 ng DNA verwendet.

3.19 Sequenzvergleich mit publizierten Daten

Sequenzvergleiche von eigenen mit publizierten Sequenzdaten wurden hauptsächlich mit HUSAR (Heidelberg Unix Sequences Analysis Resources (Release 4.0)) durchgeführt.

3.20 (Semi)quantitative RT-PCR-Analyse

Die (semi)quantitativen PCRs wurde mit etwa 0,5 ng der cDNA durchgeführt. Ein 50 µl Ansatz bestand aus 1 x PCR Reaktionspuffer (40 mM Tricine-KOH pH 9,2, 15 mM KOAc, 3,5 mM Mg(OAc)₂, 3,75 µg/ml BSA), 200 mM dNTP-Mix (Amersham, Cleveland), 1 x Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech, Heidelberg) sowie 10 pmol der beiden genspezifischen und gegebenenfalls der internen Standard Primer. Als interne Standards wurden beispielsweise die Haushaltsgene β-Actin oder G3PDH verwendet. Die PCRs wurden in dem PCR-Gerät PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Biozym, Hess. Oldendorf) nach einer ersten Denaturierung bei 96°C für 4 min innerhalb von etwa 21-30 Zyklen, entsprechend der exponentiellen Vervielfältigung, durchgeführt.

Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 55°C bis 60°C und 1 min bei 72°C. Als Kontrollen dienten Proben, die entweder nur die beiden genspezifischen Primer oder solche, die nur die internen Standard Primer enthielten. Nach den ersten 21-24 Zyklen und nach jeweils drei sich daran anschließenden Zyklen wurden 10 µl der PCR-Produkte entnommen. Daran schloß sich entweder die Auftrennung der Proben mit Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn) an oder die Auftrennung über ein 2% Agarosegel. Bei der Analyse mit dem Agilent Bioanalyzer wurde ein Chip, der bereits mit der Gelmatrix und einem entsprechenden Puffer versehen war, mit 1 µl Probe beladen. Die cDNA-Proben durchliefen die Gelmatrix und wurden wie in einem herkömmlichen Gel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Resultate (ein virtuelles Gel, die Konzentration und Größe der entsprechenden cDNA) wurden als Datei am Computer ausgegeben. Für die Auftrennung mit einem 2% Agarose/1 x TAE-Gel werden die Proben mit 2 µl 6 x DNA-Probenpuffer (30% Saccharose, 60 mM EDTA-NaOH pH 8, 0,6% (w/v) SDS, 0,15% (w/v) Bromphenolblau), versetzt und in 1 h bei einer angelegten Spannung von 100 Volt (2,5 V/cm²) aufgetrennt. Nach Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA (10 min im Färbebad mit 0.5 µg/ml EtBr) konnte das Gel mit Hilfe des Eagle Eye II photographiert werden.

3.21 Northern Blot-Analyse

3.21.1 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Radioaktiv markierte DNA kann als Hybridisierungssonde für komplementäre DNA- oder RNA-Stränge dienen. Sämtliche Bestandteile, d.h. Oligonukleotide, Klenow-Fragment und dNTPs, wurden aus dem „NonaPrimer Kit II“ der Firma Appligene/Oncor verwendet.

Etwa 25 bis 100 ng eines in 7 µl Wasser gelösten DNA-Fragments wurde bei 100°C innerhalb von 10 min denaturiert, auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. 4 µl des NonaPrimer

Mixes (*ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung*), je 1 µl der unmarkierten desoxyribonukleotid Triphosphate dATP (50 µM), dTTP (50 µM) und dGTP (50 µM) sowie 50 µCi α -³²P-dCTP (30000 Ci/mmol) wurden zugegeben. Die Elongation erfolgte sofort nach Zugabe von 1 µl Klenow Enzym (1U). Nach 1 h wurden die nicht eingebauten Nukleotide mit Hilfe des „PCR-Purification Kits“ (siehe Kapitel 3.23) abgetrennt.

3.21.2 mRNA-Isolierung aus Gesamt-RNA

Aus 200 µg Gesamt-RNA (Isolierung in Kapitel 3.2 beschrieben) konnten etwa 2,0 µg mRNA isoliert werden. Hierfür wurde der Oligotex-Kit der Firma Qiagen, Hilden, eingesetzt. Zunächst wurde die RNA auf ein Volumen von 500 µl mit H₂O_{DEPC} aufgefüllt, mit 500 µl Puffer OBB (*20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 M NaCl, 2 mM EDTA, 0,2% (w/v) SDS*) und 30 µl Oligotex Suspension (*10% (w/v) Oligotex Partikel, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) NaN₃*) versetzt und die Suspension durchmischt. Nach 3 minütiger Inkubation bei 70°C im Heizblock (Thermomixer 5436, Eppendorf), bei der die Sekundärstrukturen der RNA zerstört wurden, inkubierten die Proben 10 min bei etwa 25°C. Durch 2 minütige Zentrifugation bei 14000 x g konnte der Oligotex-mRNA-Komplex als Niederschlag erhalten werden, der in 400 µl OW2 Puffer (*10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA*) aufgenommen wurde. Die Suspension wurde in einen Säulenkorpus überführt und 1 min bei 14000 x g zentrifugiert. Nach Transfer der Säule in ein neues Reaktionsgefäß konnte mit auf 70°C erwärmtem Puffer OEB (*5mM Tris-HCl pH 7,5*) die mRNA von der Säule gewaschen werden. Um den maximalen Gehalt an mRNA zu erzielen, wurde mit 50 µl warmem OEB-Puffer nachgespült.

3.21.3 Herstellung eines Northern Blots

Für die Herstellung eines Northern Blots wurden etwa 200 µg Gesamt-RNA isoliert (Kapitel 3.2). Damit konnte die für den Blot gewünschte Menge von 2 µg mRNA gewonnen werden. Die Vorgehensweise bei der Isolierung von mRNA ist in Kapitel 3.21.2 beschrieben.

Die Proben wurden so vorbereitet, daß etwa 2 µg mRNA in 3,5 µl H₂O_{DEPC} (*0,1% (v/v) DEPC*) gelöst waren. Zusätzlich enthielten sie 1 x Laufpuffer (*50 mM MOPS-Puffer pH 7, 10 mM EDTA pH 8*), 6,5% (v/v) Formaldehyd, 25% (v/v) deionisiertes Formamid, 0,05 mg/ml Ethidiumbromid, 0,02% (w/v) Xylen Cyanol sowie 0,02% (w/v) Bromphenolblau. Die so vorbereitete mRNA wurde bei 70°C 10 min denaturiert und anschließend auf ein entsprechendes Gel aufgetragen. Dieses setzte sich aus 1,2% (w/v) Agarose, 2,2 M Formaldehyd, 50 mM MOPS-Puffer pH 7 (*200 mM MOPS, 50 mM NaOAc, 10 mM EDTA*) und 1 mM EDTA pH 8 zusammen. Der Laufpuffer bestand aus 50 mM MOPS-Puffer pH 7 und 1 mM EDTA pH 8; der Gellauf erfolgte bei einer angelegten Spannung von 100 Volt, bis das Bromphenolblau im letzten Drittel des Gels angelangt war. Anschließend konnte das Gel

im UV-Licht (300 nm) betrachtet werden. Waren die mRNA-Mengen der Proben vergleichbar, konnte die RNA auf die Nitrozellulose (Hybond⁺, Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) gebロットet werden. Hierzu wurde der Blot in folgender Weise aufgebaut:

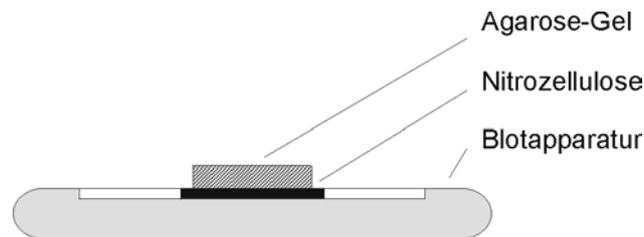


Abb.: 3.4 Blotaufbau.

An die Apparatur wurde Vakuum angelegt und DEPC-Wasser auf das Gel pipettiert. Dieses verblieb dort für 5 min. Anschließend wurde ein alkalischer Puffer (*50 mM NaOH, 10 mM NaCl*) verwendet. Es erfolgte ein 5 minütiger Waschschrift (*0,1 M Tris-HCl pH 7,4*), dann wurde *20 x SSC (3M NaCl, 300 mM Tri-Natriumcitrat-di-hydrat)* für etwa 1 h aufgetragen. Nach dem Blotten wurde das Gel entfernt, die Nylonmembran kurz in *20 x SSC* gewaschen und dann bei 120 mJ für 30 sec UV-vernetzt.

3.21.4 Northern-Hybridisierung

Die Hybridisierung eines RNA-Blots mit radioaktiv markierten RNA- oder DNA-Sonden wird als Northern-Hybridisierung bezeichnet.

Eingesetzt wurden die als „H“ und „H₂“ bezeichneten multiple Tissue Northern Blots der Firma Clontech, Heidelberg, bzw. selbsthergestellte RNA-Nitrozelluloseblots (siehe Kapitel 3.21.3) aus Ovarialkarzinomzelllinien.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Nitrozelluloseblots 1 h bei 62°C in Hybridisierungspuffer (*0,5 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7,5, 7% (w/v) SDS, 1 mM EDTA pH 7,5 und 100 µg/ml Lachs-Sperma-DNA*) (Church und Gilbert, 1984) inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe der bereits denaturierten, radioaktiv markierten DNA-Sonde ($1-2 \times 10^6$ cpm/ml). Inkubiert wurde ca. 15 h bei 62°C. Danach wurde die Hybridisierungslösung verworfen. Anschließend wurde zweimal mit Waschpuffer 1 (*2 x SSC (0,3 M NaCl, 30 mM Tri-Natriumcitrat-di-hydrat), 0,05% (w/v) SDS*) für 20 min bei 50°C und einmal mit Waschpuffer 2 (*0,1 x SSC, 0,1% (w/v) SDS*) für 20 min bei 50°C gewaschen. Nach dem Einschweißen der Blots in PVC-Folie und Auflegen eines Biomax MR Films (Kodak-Aldrich, Steinheim), erfolgte die Exposition für mehrere Tage bei -70°C.

3.22 Aufreinigung markierter Sonden

Mit Hilfe des Nucleotide Removal Kit der Firma Qiagen, Hilden, kann radioaktiv-, biotin- oder Digoxigenin-markierte DNA aufgereinigt werden.

Zu dem aufzureinigenden Reaktionsansatz wurden 10 Volumenanteile Puffer PN (*ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung*) zugesetzt und durchmischt. Das Gemisch wurde auf eine „QIAquick“-Säule appliziert und bei 2000 x g 1 min zentrifugiert. Der Durchfluß wurde mit dem Reaktionsgefäß entsorgt, die Säule in ein neues Gefäß transferiert. Durch Zugabe von 500 µl Puffer PE (*ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung*) und anschließender 1 minütiger Zentrifugation bei 2000 x g wurde die Säule gewaschen. Störende Ethanolrückstände wurden durch erneute Zentrifugation bei gleichen Bedingungen entfernt. Der Durchfluß wurde wieder mit dem Reaktionsgefäß entsorgt und die Säule in ein neues Gefäß transferiert. Zur Elution der DNA wurden 2 x 100 µl Puffer EB (*10 mM Tris-HCl pH 8,5*) eingesetzt.

3.23 Aufreinigung von PCR-Produkten

Von PCR-Produkten wurden mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits der Firma Qiagen, Hilden, Oligonukleotide <100 bp, Primer, Polymerasen und Salze abgetrennt.

Hierzu wurden 5 Volumenteile Puffer PB (*ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung*) der PCR-Reaktion zugesetzt und durchmischt. Dieses Gemisch wurde auf eine „QIAquick“-Säule appliziert und bei >10000 x g zentrifugiert. Durch Zugabe von 750 µl Puffer PE (*ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung*) auf die Säule und anschließende Zentrifugation bei 10000 x g wurde diese gewaschen. Zur Elution der DNA wurden 50-100 µl Puffer EB (*10 mM Tris-HCl pH 8,5*) eingesetzt.

3.24 RACE's

Mit Hilfe von RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) ist es möglich, cDNA-Fragmente in 5'- oder 3'-Richtung spezifisch zu verlängern. Die cDNA aus bereits vorgefertigten RACE-Bibliotheken (cDNA von Eierstöcken, Hoden, Gehirn, Föten und Brustgeweben) verfügt über Adaptoren am 5'- und 3'-Ende. Diese dienen der Anlagerung von PCR-Primern (AP 1 und AP2, siehe Kapitel 2.12). Als Gegenstrang-Primer werden genspezifische Primer ausgewählt. In jeweils zwei aufeinanderfolgende RACE-Reaktionen kann die Amplifikation der entsprechenden cDNA erfolgen. Ausgangsprodukt für die zweite, auch nested RACE-Reaktion genannt, ist die cDNA aus der ersten Reaktion (amplifiziert mit AP1- und genspezifischem Primer), was die Spezifität der Reaktion erheblich steigert. Die Primer der zweiten RACE-Reaktion müssen bezüglich des gewünschten RACE-Produkts eine weiter in Richtung 5'-orientierte Position einnehmen (AP2 und genspezifischer Primer). Pro 50 µl Reaktion wurden 2 µl cDNA (0,2 ng), 1 µl AP1-Primer (10 µM) sowie 1 µl des

genspezifischen Primers (20 μM) eingesetzt. Die nested RACE-Reaktion enthielt 5 μl des RACE-Produkts, 1 μl AP2-Primer (10 μM) und 1 μl des nested Primers (20 μM) zusammen. Folgendes Protokoll wurde für die RACE's verwendet:

Es wurde zunächst bei 96°C für 4 min denaturiert. Die nächsten Schritte wurden 30 mal wiederholt und begannen mit einem Denaturierungsschritt bei 96°C für 1 min, gefolgt von der Anlagerung für 30 sec bei der optimalen Annealingtemperatur und der Verlängerung der Primer bei 72°C während 6 min. Abschließend wurden von der Polymerase während 7 min bei 72°C Desoxyadenosine angehängt, die die TA-Klonierung ermöglichten. Die Bedingungen für das nested RACE waren mit denen des ersten RACE's identisch.

3.25 Phagen Screening

3.25.1 Präparation von Phagen DNA

Die Präparation der Phagen DNA bietet zwei Möglichkeiten:

- Bevor ein zeit- und materialaufwendiger Phagen Screen durchgeführt wird, kann mit Hilfe von PCR überprüft werden, ob ein Teil einer bestimmten DNA in der Phagen-Bibliothek vorhanden ist.
- Durch Verwendung von zwei genspezifischen Primern (Primer und nested Primer) und einem Primer aus der λ -Region kann wie bei RACE zusätzliche Sequenzinformation gewonnen werden.

Zunächst wurden XL1-Blue MRF⁻-Zellen mit etwa 1×10^6 Phagen infiziert, mit NZY-Agar versetzt, auf 20 Platten (150 mm) verteilt und 15 h bei 37°C inkubiert. Das Vorgehen ist in Kapitel 3.25.2 beschrieben. Anschließend wurde der Ansatz mit 6 ml SM Puffer (100 mM NaCl, 8,1 mM MgSO₄ x 7H₂O, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,01% (w/v) Gelatine) überschichtet. Nach 4 h Inkubation bei 25°C unter leichtem Schütteln wurde der Überstand gesammelt und mit 1 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde mit 20 mM EDTA pH 8, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A und 0,5% (w/v) SDS versetzt. Nach Inkubation bei 37°C während 30 min wurde 1 Volumenanteil Phenol zugegeben, durchmischt und für 15 min bei 4°C und 1000 x g zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde mit einem Volumenanteil Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, durchmischt und unter den selben Bedingungen wie oben zentrifugiert. Nach Abnehmen des wässrigen Überstandes wurde ein letztes Mal Chloroform zugegeben und erneut zentrifugiert. Die Fällung der Phagen-DNA geschah innerhalb von 15 h bei -20°C nach Zugabe von 1/10 Volumenanteil 3 M NaOAc pH 4,8 und 2,5 Volumenteilen EtOH. Zentrifugiert wurde 30 min bei 4°C mit 15000 x g. Der DNA-Niederschlag wurde in 1 ml TE aufgenommen und photometrisch die Konzentration bestimmt.

3.25.2 Durchführung eines Phagen-Screens

Es wurden mit der Uni-ZAP XR Ovar Bibliothek (Stratagene, La Jolla) und λ TripleEX Bibliothek (Clontech, Heidelberg) Screens durchgeführt. Hierfür wurden zunächst die Wirtszellen amplifiziert und verdünnt sowie die Titer der Helferphagen und Phagen bestimmt. Lediglich in der Uni-ZAP XR Ovar Bibliothek wurden positive Phagen detektiert.

Amplifikation der Wirtszellen

Die Amplifikation der Wirtszellen erfolgte durch Ausstreichen der bei -80°C eingefrorenen XL1-Blue MRF' und SOLR-Zellen auf antibiotikahaltigen Platten. Nach Inkubation bei 37°C in etwa 15 h waren einzelne Kolonien sichtbar, mit denen 50 ml LB Medium/10 mM MgSO_4 Kulturen angeimpft wurden. Die Kulturen wurden 15 h bei 30°C mit 220 rpm geschüttelt. Nach dem Schütteln wurden die Zellen bei 2000 rpm innerhalb von 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren in 10 mM MgSO_4 aufgenommen, bis die $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0,5 betrug.

Bestimmung des Phagen- und Helferphagen-Titers

Die Titer der Phagen und Helferphagen ließen sich durch Herstellen von Verdünnungsreihen und Infektion der Wirtszellen bestimmen. Die Phagen wurden mit SM-Puffer (*100 mM NaCl, 8,1 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,01% (w/v) Gelatine*) auf 10^{-4} - 10^{-7} pfu/ml verdünnt und 600 μl der sich in MgSO_4 befindenden XL1-Blue MRF'-Zellen infiziert. Nach 15 min Inkubation bei 37°C , in der sich die Phagen an die Bakterien anhefteten, wurden 7,5 ml NZY Top Agar zugegeben und die Platten (15 mm) mit diesem Gemisch überschichtet. Die Inkubation bei 37°C erfolgte für 15 h. Mit nachfolgender Formel konnte der Titer bestimmt werden:

Anzahl von Plaques x Verdünnungsfaktor/ausplattiertes Volumen [ml] x 1000 $\mu\text{l}/\text{ml}$ = Titer

Phagen-Screening

Für den Phagen-Screen wurden 50000 pfu pro 15 mm Platte, dies entspricht 1×10^6 pfu insgesamt, eingesetzt. XL1-Blue MRF'-Zellen wurden, wie oben beschrieben, infiziert, inkubiert und mit NZY-Agarose auf die Platten aufgebracht. Nach etwa 12-15 h Inkubation bei 37°C war der Bakterienrasen deutlich von den Phagen angegriffen. Um das Abziehen der Bakterien durch den Abklatsch der Nitrozellulose-Filter zu verhindern, wurden die Platten bei 4°C für 2 h gelagert. Die Filter wurden in trockenem Zustand für 2 min auf den Platten exponiert, je 10 min mit Denaturierungs- (*1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH*), Neutralisierung- (*1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 8,0*) und Waschpuffer (*0,2 M Tris-HCl pH 7,5, 2 x SSC*) durchtränkt. Anschließend konnte die Phagen DNA durch UV-Vernetzung (120 mJ für 30 sec, (UV-Vernetzer: Stratagene, La Jolla)) an die Membran gebunden werden.

Hybridisieren

Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C für 15 h in einem formamidhaltigen Puffer (50% (v/v) *Formamid_{deionisiert}*, 5 x SSC (0,75 M NaCl, 75 mM *Tri-Natriumcitrat-di-hydrat*, pH 7), 5 x *Denhardt's* (0,5 g *Ficoll Typ 400*; 0,5 g *Polyvinylpyrrolidon*, 0,5 g *BSA Fraktion V ad 500 ml*), 1% (w/v) SDS, 100 µg/ml *Hefe Gesamt-RNA*) mit einer, wie in Kapitel 3.21.1 beschrieben, radioaktiv markierten und aufgereinigten Probe.

Waschen

Zunächst wurde 3 x 15 min bei 25°C, anschließend 2 x 30 min bei 55°C mit einem Puffer, bestehend aus 0,1 x SSC und 0,1% (w/v) SDS, gewaschen.

Positive Phagen-Plaques wurden mittels eines Röntgenfilms (BiomaxTM MR Film (Kodak-Aldrich, Steinheim)) nachgewiesen, der während mehrerer Tage bei -70°C auf den Membranen exponiert wurde. Entsprechende Phagen wurden durch Ausstechen der Blöcke aus den Platten gewonnen. Zu diesem Zweck wurden die Blöcke in 500 µl SM Puffer überführt und 4 h bei 25°C inkubiert. In einer weiteren Screening-Runde wurden 40 µl einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt. Die weitere Vorgehensweise ist bereits oben beschrieben. Eine dritte und letzte Screening-Runde war im Ablauf eine Wiederholung der zweiten Runde.

Gewinnung von Einzelklonen

Es wurden 300 µl XL1-Blue MRF'-Zellen mit 5 µl Phagen in SM-Puffer aus der dritten Screening-Runde und 1 µl ExAssist Helfer Phage (>1 x 10⁶ pfu/µl) infiziert. Nach Inkubation bei 37°C für 15 min wurden 3 ml LB-Medium zu dem Gemisch zugegeben und für 3 h bei 37°C bei 250 rpm inkubiert. Die Proben wurden anschließend bei 70°C für 2 min erhitzt und zentrifugiert (150 x g, 10 min, RT). 10 µl des Phagen-Überstandes wurden zu 200 µl XL1-Blue MRF'-Zellen gegeben, 15 min bei 37 °C inkubiert und 100 µl davon auf LB-ampicillinhaltigen Platten ausgebracht. Am nächsten Tag konnten einzelne Kolonien gepickt und die Plasmide inklusive Insert isoliert werden.

3.26 Herstellung von peptidspezifischen polyklonalen Antikörpern

Zur Immunisierung wurden zwei unterschiedliche synthetische Peptide aus der Sequenz verwendet, die an Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH) gekoppelt waren. Die Auswahl der Peptide geschah unter zu Hilfenahme des Programms „Peptidestructure“ aus HUSAR (Heidelberg Unix Sequences Analysis Resources (Release 4.0)). Kriterien hierfür waren Immunogenität, Wahrscheinlichkeit der Beteiligung an der Proteinoberfläche und Sequenzposition des Peptides im Gesamtprotein. Im Einzelnen wurden folgende Peptide ausgewählt:

- 26C/C9/2-471-492: AC-TEFLDQNRGSRRTNPFGETEDEC-KLH
- 26C/C9/2-655-676: KLH-CNDQPDDDDGNPNEHRGAEESEA

Die Peptide wurden von Dr. Pipkorn (DKFZ, Heidelberg) synthetisiert. Die Kopplung an „Inject Maleinide Activated KLH“ erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden während 2 h bei 25°C 2 mg KLH an 2 mg Peptid gekoppelt. Durch Dialyse (in Dialyseschläuchen der Firma Spectra-Por) wurden störende Substanzen wie EDTA aus dem Kopplungspuffer entfernt. Die Immunisierungen der Kaninchen wurden von der Firma Eurogentech, Serain/Belgien, durchgeführt. Es wurden pro Immunisierung 200 µg KLH gekoppeltes Peptid eingesetzt. Immunisierungen fanden nach 1, 14, 28 und 42 Tagen statt.

3.27 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Bei einer Restriktionsendonuklease-Verdauung wurde DNA mit der entsprechenden Enzymmenge in dem dafür geeigneten Reaktionspuffer inkubiert. Meist erfolgte die Hydrolyse während 1-2 h bei 37°C (z.B. BamHI, EcoRI). Für einige Enzyme wurden Reaktionspuffer, Inkubationszeit und -temperatur, entsprechend kommerziell erhältlicher Tabellen, variiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/6 Volumenanteil 6 x DNA-Probenpuffer (0,2% (w/v) Bromphenolblau, 0,2% (w/v) Xylen Cyanol FF, 60% (v/v) Glycerol, 60 mM EDTA pH 8,0) beendet. Die Restriktionsenzyme wurden von den Firmen GIBCO BRL, Eggenstein, und MBI Fermentas, St. Leon Roth, bezogen

3.28 Ligation von DNA

Bei der Ligation wurden Ansätze zu 10 µl hergestellt, die 50-200 ng linearisierte Plasmid-DNA enthielten. Die DNA des Inserts sollte in einem 1- bis 3fachen molaren Überschuß zur Plasmid-DNA eingesetzt werden. Pro Ansatz wurden 1-2 Enzymeinheiten der T4 DNA-Ligase verwendet. Die Ligationsreaktion verlief während 1 h bei 25°C.

3.29 Herstellung kompetenter DH5α-Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter DH5α-Zellen wurden 25 ml LB-Medium (1% (w/v) *Bacto-Tryptone*, 0,5% (w/v) *Bacto-Yeast-Extract*, 1% (w/v) *NaCl* pH 7,0) mit 0,1 ml einer Vorkultur von *E.coli* angeimpft und etwa 15 h bei 37°C inkubiert. 0,5 ml dieser Kultur wurden verwendet, um 50 ml SOB-Medium/10 mM $MgCl_2$ (2% (w/v) *Bacto-Tryptone*, 0,5% (w/v) *Bacto-Yeast-Extract*, 10 mM *NaCl*, 2,5 mM *KCl*, 10 mM $MgCl_2$) anzupfen. Die Bakteriensuspension wurde bei 37°C geschüttelt, bis die OD_{600nm} bei 0,6 lag. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde bei 4°C für 12 min mit 1500 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 15 ml vorgekühltem Medium RF 1 (100 mM *RbCl*, 50 mM $MnCl_2$, 30 mM *Essigsäure*, 10 mM $CaCl_2$, 15% (w/v) *Glycerol* pH 5,8) resuspendiert und 15 min auf Eis gekühlt. Es wurde erneut für 12 min bei 4°C und 1500 x g zentrifugiert, bevor der Niederschlag in 4 ml RF 2 Medium (10 mM *MOPS-NaOH* pH 6,8, 10 mM *RbCl*, 75 mM

CaCl_2 , 15% (w/v) Glycerol) aufgenommen wurde. Die kompetenten Zellen wurden in 100 μl Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.30 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Zu chemisch kompetenten DH5 α -Zellen (Herstellung siehe Kapitel 3.29) wurden 1 μl 0,5 M β -Mercaptoethanol und etwa 2 μl Ligationsansatz zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz 60 sec bei 42°C erwärmt und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 100 μl LB-Medium wurden die Zellen 45 min bei 37°C kultiviert. In dieser Zeit konnten sie in antibiotikafreiem Medium die transferierte Antibiotika-Resistenz ausbilden. Um Transformanten zu selektionieren, wurde etwa die Hälfte der Bakteriensuspension auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37°C für 15 h bildeten nur diejenigen Bakterien, die Antibiotikaresistenz trugen, Kolonien auf der Agaroberfläche aus.

3.31 Einfrieren von Bakterienkulturen

Je 500 μl einer Bakterien-Suspensionskultur, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befand, wurden in ein autoklaviertes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zufügen des gleichen Volumenanteils an 50%igem autoklaviertem Glycerol erhielt man ein Gemisch, das für mindestens 1 h auf Eis belassen wurde. Danach konnten die Zellen bei -70°C eingefroren werden. Diese behalten über Jahre hinweg ihre Lebensfähigkeit.

3.32 in vitro Transkription/Translation

Eine in vitro Transkription/Translation wurde mit verschiedenen Systemen durchgeführt. Das kommerziell erhältliche TNT[®] gekoppelte Retikulozyten-Lysat System der Firma Promega, Madison/USA, bietet eine Alternative zur eukaryontischen in vitro Translation, liefert jedoch eine geringere Ausbeute. Das Translations-System RTS 500 der Firma Roche, Mannheim, basiert auf E.coli Lysat, weshalb Versuche, die in Zusammenhang mit posttranslationalen Modifikationen des Proteins in Verbindung stehen, nicht möglich sind; es liefert jedoch Proteinmengen von 100 bis zu 500 μg pro Ansatz.

Bei der Durchführung mit dem TNT[®] gekoppelten Retikulozyten-Lysat befand sich der offene Leseraster des Gens 26C/C9/2 in dem pCR[®]II-TOPO Klonierungsvektor der Firma Invitrogen (siehe Kapitel 4.7.8) bzw. in dem pIVEX2.4a Klonierungsvektor der Firma Roche. Für die nicht radioaktive Proteinsynthese wurden zu 1 μg DNA 25 μl Kaninchen-Retikulozyten-Lysat, 2 μl Reaktionspuffer (*ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung*), 1 μl SP6 Polymerase (*ohne Angaben der Einheiten*), 0,5 μl 1 mM Aminosäure-Mischung ohne Leucin (*ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung*), 0,5 μl 1 mM Aminosäure-Mischung ohne Methionin (*ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung*)

sowie 40 U RNase-Inhibitor zugesetzt. Nach 90 min Inkubation bei 30°C war die Translation abgeschlossen und die Ergebnisse konnten analysiert werden.

Für die radioaktive Markierung der synthetisierten Proteine mit ³⁵S-Methionin wurden zu 1 µg DNA 25 µl Kaninchen-Retikulozyten-Lysat, 2 µl Reaktionspuffer (*ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung*), 1 µl SP6 Polymerase (*ohne Angaben der Einheiten*), 1 µl 1 mM Aminosäure-Mischung ohne Methionin (*ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung*), 4 µl ³⁵S-Methionin sowie 40 U RNase-Inhibitor zugesetzt. Nach 90 min Inkubation bei 30°C wurden 3 µl der Probe mit 3 µl Probenpuffer versetzt, auf ein 10% SDS-PAGE aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Nach Überprüfung der Proteinsynthese durch eine Coomassie-Färbung wurde das SDS-PAGE 10 min in einem 1 M Natriumsalicylat-Bad inkubiert, das der Fixierung der Banden diente. Anschließend wurde ein Film für etwa 3 h auf dem Gel exponiert.

Für die *in vitro* Transkription/Translation mit dem Translations-System der Firma Roche befand sich der offene Leseraster des Gens 26C/C9/2 in dem pIVEX2.4a Vektor (Roche, Mannheim). Die lyophilisierten Puffer 1, 2, 3, 4 (*ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung*) wurden in dem Rekonstitutions-Puffer 5 (Puffer 1: 250 µl, Puffer 2: 800 µl, Puffer 3: 10,5 ml, Puffer 4: 600 µl) gelöst. Aus diesen Lösungen wurde das Nährmedium (500 µl Lösung 4, 10,5 ml Lösung 3) und das Reaktionsmedium (250 µl Lösung 1, 750 µl Lösung 2, 50 µl Lösung 4, sowie 10 µg DNA) zusammengesetzt. Das Reaktionskompartiment wurde entsprechend den Herstellerangaben befüllt und in das RTS 500 Instrument (Roche, Mannheim) eingesetzt. Nach 24 h konnte das Translationsprodukt analysiert werden.

3.33 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte auf SDS-Polyacrylamidgelen (*Thomas und Kornberg, 1975*), die entsprechend dem Molekulargewicht der Proteine hergestellt wurden. Für die Gelherstellung wurden Glasplatten (120 x 60 x 0,5 mm) mit Seife und Ethanol gereinigt. Nach dem Zusammenbau der Platten wurde die Trenngellösung (*Beispiel für ein 10%iges Gel: 10% (w/v) Acrylamid, 0,05% (w/v) Bisacrylamid, 750 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat, 0,03% (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin*) bis etwa 2 cm unterhalb des oberen Rands eingefüllt und mit 2-Butanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation konnte das 2-Butanol entfernt, die Kämme eingesetzt und die Sammelgellösung (*3,4% (w/v) Acrylamid, 0,09% (w/v) N,N'-Methylen-Bisacrylamid, 0,1% (w/v) SDS, 178 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,26% (w/v) Ammoniumpersulfat, 0,086% (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin*) eingefüllt werden. Die Proteinproben wurden in SDS-Probenpuffer (*10% (v/v) Glycerol, 10% (v/v) β-Mercaptoethanol, 5% (w/v) SDS, 0,3% (w/v) Bromphenolblau, 60 mM Tris-HCl pH 6,8*) aufgenommen und für 5 min auf 96°C erhitzt. Die

Gelelektrophorese wurde in Elektrophoresepuffer (0,05 M Tris pH ca. 8,3, 0,38 M Glycin, 0,1% (w/v) SDS) bei einer Stromstärke von zunächst 22 mA bzw. 32 mA nach Erreichen des Sammelgelenkes durchgeführt. Als Proteinstandard diente eine Mischung verschiedener Proteine mit bekanntem Molekulargewicht (SDS-7 oder SDS-6H, Sigma Deisenhofen). An die SDS-PAGE schloß sich entweder eine Coomassie-Färbung oder der Blot des Gels an.

3.34 Nachweis von Proteinen durch Coomassie-Färbung

Beim Anfärben mit Coomassie-Blau-Färbelösung (0,06% (w/v) Serva Blue R, 50% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Eisessig) wurden SDS-Gele in einer sauren alkoholischen Farbstofflösung inkubiert. Die Proteine wurden durch Denaturierung im Gel fixiert und bildeten einen Komplex mit dem Farbstoff. Überschüssiger Farbstoff wurde durch intensives Waschen mit einer sauren Lösung entfernt (5% (v/v) Ethanol, 7,5% (v/v) Eisessig).

3.35 Immunblot-Analyse

Proteintransfer

Die in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine wurden auf Nitrozellulosemembranen (Protran BA85) transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Hierzu wurden die Gele zwischen passend geschnittene 3 MM Gel Blotting Papiere und Nitrozellulose, die zuvor mit Transferpuffer (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM Glycin) befeuchtet wurden, gelegt. Der Blotaufbau geschah nach folgendem Schema:

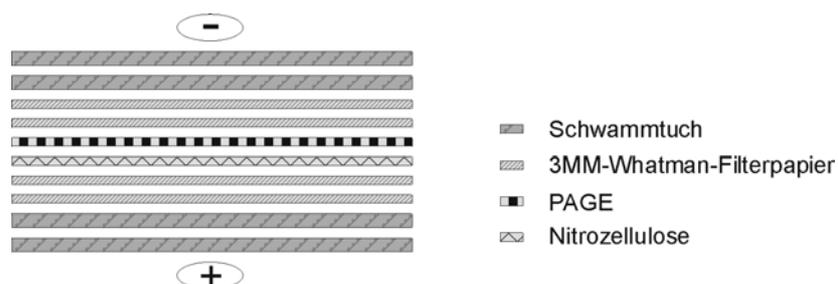


Abb.: 3.5 Aufbau eines Immunblots

Die Bestandteile des Immunblots sind in der Legende neben der Abbildung dargestellt.

Der Transfer geschah üblicherweise bei 300 mA und 4°C in einer Blot Apparatur innerhalb von 15 h.

Nachweis von Antigenen

Um den Transfer der Proteine zu überprüfen, erfolgte eine reversible PonceauS-Färbung (0,02% (w/v) PonceauS), bei der die Nitrozellulose in die Färbelösung getaucht und überschüssige Färbelösung durch Hin- und Herbewegen der Zellulose in vollentsalztem Wasser entfernt wurde. Freie Bindungsstellen der Nitrozellulose wurden nach vollständigem Entfärben durch Blockierlösung aus 5% Magermilchpulver (Skim Milk Powder, Fluka) in TBS (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,6) abgesättigt. Nach 30 min wurde die Blockierlösung entfernt und für eine weitere Stunde der verdünnte Erstantikörper in 0,4% Milchpulver/TBS/0,1% Tween 20 aufgetragen. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde 5 x 1 min in TBS/0,1% Tween 20 (TBST) gewaschen. Anschließend wurde ebenfalls für 1 h der in Blockierlösung verdünnte Zweitantikörper aufgetragen. Unspezifisch gebundene sekundäre Antikörper wurden wie beim Erstantikörper mit TBST-Waschpuffer entfernt. Der Nachweis des gebundenen sekundären Antikörpers erfolgte entweder mit dem ECL-System (Amersham) nach Protokoll des Herstellers oder durch Zugabe von alkalischer Phosphatase-Entwicklerlösung (0,33% (w/v) BCIP, 0,66% (w/v) NBT in 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂), bei der in einer Farbreaktion das Substrat durch den 2. Antikörper umgesetzt wird. Die Reaktion wurde durch Entfernen der Entwicklerlösungen und Waschen mit vollentsalztem Wasser gestoppt.

3.36 Digoxigenin-Markierung von RNA für *in situ* Hybridisierung

3.36.1 Markierung der RNA

Mit Hilfe von SP6 und T7-Polymerasen konnte klonierte DNA durch *in vitro* Transkription in DIG-markierte RNA umgeschrieben werden. Diese sollte als Sonde in einer *in situ* Hybridisierung verwendet werden.

Zunächst wurde das Insert mittels TA-Klonierung in den pCRII-TOPO Vektor der Firma Invitrogen, Groningen/NL, kloniert. Dieser Vektor besitzt sowohl einen Sp6 als auch T7 Promotor. Durch Restriktionsendonukleaseverdau von jeweils 5 µg Insert/Vektor mit den Restriktionsenzymen BamHI oder aber EcoRV in den entsprechenden Puffern (1 x React 3: 5 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM MgCl₂, 10 mM NaCl bzw. 1 x React 2: 5 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM MgCl₂, 5 mM NaCl) wurde der Vektor innerhalb 1 h bei 37°C hinter dem Insert geschnitten. Die linearisierte DNA wurde mit dem PCR Nucleotide Removal Kit der Firma Qiagen, Hilden, (siehe Kapitel 3.23) aufgereinigt und mit Hilfe des DIG RNA Labeling Kits der Firma Roche, Mannheim, nach Vorschrift mit Digoxigenin markiert.

Pro Reaktionsansatz befanden sich neben 1 µg aufgereinigtem Template, 1 x Labeling Mix (ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung) 1 x Transkriptionspuffer (ohne Angaben des Herstellers zur Pufferzusammensetzung), RNase-Inhibitor (20U) und 40 U Sp6

bzw. T7 Polymerase. Die Reaktion inkubierte 2 h bei 37°C. Anschließend wurde durch Zugabe von 20 U RNase-freier DNaseI die DNA innerhalb von 15 min bei 37°C fragmentiert. Durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA pH 8 wurde die DNaseI Reaktion abgestoppt. Da die markierten Proben kleiner als 600 bp waren, muß laut Aussage von erfahrenen Kollegen keine RNA-Hydrolyse durchgeführt werden. Die Proben wurden bezüglich ihres Labelings mittels Dot-Blot überprüft (siehe Kapitel 3.36.2) und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.36.2 Überprüfung der Digoxigenin-Markierung mittels Dot Blot

Eine Hybond N⁺-Membran (Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig) wurde auf die erforderliche Größe zurechtgeschnitten, 5 min in Puffer 1 (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl in H₂O_{DEPC}) geschwenkt und für kurze Zeit getrocknet. Die bereits von 1 ng/µl bis 10 pg/µl verdünnten DIG-markierten Proben und ein RNA-Standard (im DIG RNA Labeling Kit enthalten) wurden auf die Membran pipettiert und bei 120 mJ für 30 sec UV-quervernetzt (UV-Crosslinker: Stratagene, La Jolla). Die Membran inkubierte 1 min in Puffer 1 und 30 min in Blockingreagenz (1% (w/v) BSA, 0,1% (v/v) Tween 20 in Puffer 1), bevor die Lösung verworfen und durch Puffer 1 inklusive 1,5 U Anti-Digoxigenen-AP (Fab Fragment (Boehringer, Mannheim)) ersetzt wurde. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte während 30 min bei 25°C auf einem Schüttler. Überschüssiger Antikörper wurde durch 3 maliges Waschen je 5 min mit Puffer 1 entfernt. Danach wurde die Membran für 2 min in einen weiteren Puffer (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ in H₂O_{DEPC}) gelegt. Der Nachweis der Digoxigenin-markierten Nukleinsäure geschah durch Zugabe eines NBT- (45 µl NBT-Lösung: 75 mg/ml Nitro-blau-Tetrazoliumchlorid in 70% (v/v) Dimethylformamid) BCIP-Lösungsgemisches (35 µl: 50 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat in 100% Dimethylformamid). Nach Ablauf der Farbreaktion wurde die Membran mit vollentsalztem Wasser gewaschen, um die Reaktion abzustoppen.

4 Ergebnisse

In den vergangenen Jahren wurden bereits vielversprechende therapeutische Fortschritte im Hinblick auf die Behandlung des Ovarialkarzinoms gemacht. Dennoch besitzt dieser Tumortyp zur Zeit noch die größte Mortalitätsrate unter den gynäkologischen Tumoren. Um eine frühe Diagnostik und spezifischere Therapiemaßnahmen zu ermöglichen, wären spezifische Marker-Proteine für einzelne Tumortypen und –stadien hilfreich. Auch der Verlust von Tumorsuppressoren könnte nachgewiesen werden. Dazu müssen die Ovarialkarzinome auf molekularer Ebene untersucht werden. Dies kann z.B. durch den Vergleich der Expressionsprofile verschiedener Tumoren mit ihren korrespondierenden gesunden Geweben geschehen.

Das Ziel dieser Arbeit war die systematische Analyse der Genexpressionsmuster von epithelialen Ovarialkarzinomen. Dafür standen wie bereits in der Einleitung unter Kapitel 1.1.4 beschrieben mehrere Methoden, wie beispielsweise die subtraktive Hybridisierung und das Differential Display, zur Diskussion. Beide Methoden wurden zunächst getestet und nach Auswahl einer Methode, des Differential Displays, der Versuch unternommen, unterschiedlich exprimierte Gene auf cDNA-Ebene zu identifizieren und zu verifizieren. Einige der interessantesten differentiell exprimierten Fragmente wurden in weiterführenden Experimenten genauer charakterisiert.

4.1 Materialasservation, histologische Aufarbeitung und Qualitätskontrolle

An der Universitätsfrauenklinik Heidelberg und Tübingen werden neben Operationen wegen benigner proliferierender Veränderungen der Ovarien und Borderline-Tumoren auch zahlreiche Operationen aufgrund des Verdachts auf Ovarialkarzinome durchgeführt. Dort sind sowohl die notwendigen apparativen als auch die logistischen Voraussetzungen vorhanden, um die Asservation vitaler Tumorgewebeproben durchzuführen. Freundlicherweise wurden diese Gewebeproben von Herrn Dr. U. Hahn (Heidelberg), Herrn Dr. R. Kurek (Tübingen), Herrn Dr. A. Marmé (Heidelberg), Herrn Prof. Dr. G. Bastert (Heidelberg) und Herrn Prof. Dr. D. Wallwiener (Tübingen) unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Voraussetzung für die systematische Analyse der Genexpressionsmuster in epithelialen Ovarialkarzinomen ist eine hohe Qualität der verwendeten Gewebe. Dies bedeutet einerseits, daß die bei der Operation entnommenen Gewebeproben sofort in einen entsprechenden Puffer überführt werden müssen, um endogene RNase-Aktivität zu verhindern; andererseits dürfen die Gewebeproben nicht durch Fremdgewebe verunreinigt sein, da diese Verunreinigungen beim Vergleich von Geweben zu nichtepithelspezifischen Unterschieden führen würden (*Martin und Pardee, 1999*).

Bei der Gewebeentnahme werden analog zum Papanicolaou-Test mit einer Metall- oder Plastiköse Abstriche vom Infundibulum des Oviducts und dem Tumorgewebe des Ovars hergestellt und unverzüglich in einen Guanidin-Isothiocyanat haltigen Puffer überführt. Der Grund für die Asservation des Infundibulums anstelle des gesunden Ovar epithels ist, die Unzugänglichkeit des Ovar epithels (siehe Kapitel 5.1.1). Das verbleibende Tumorgewebe sowie Teile des Eileiters und des tumorfreien Ovars werden sofort in einem 4%igen Paraformaldehydpuffer fixiert und für eine sich eventuell anschließende *in situ* Hybridisierung aufbewahrt.

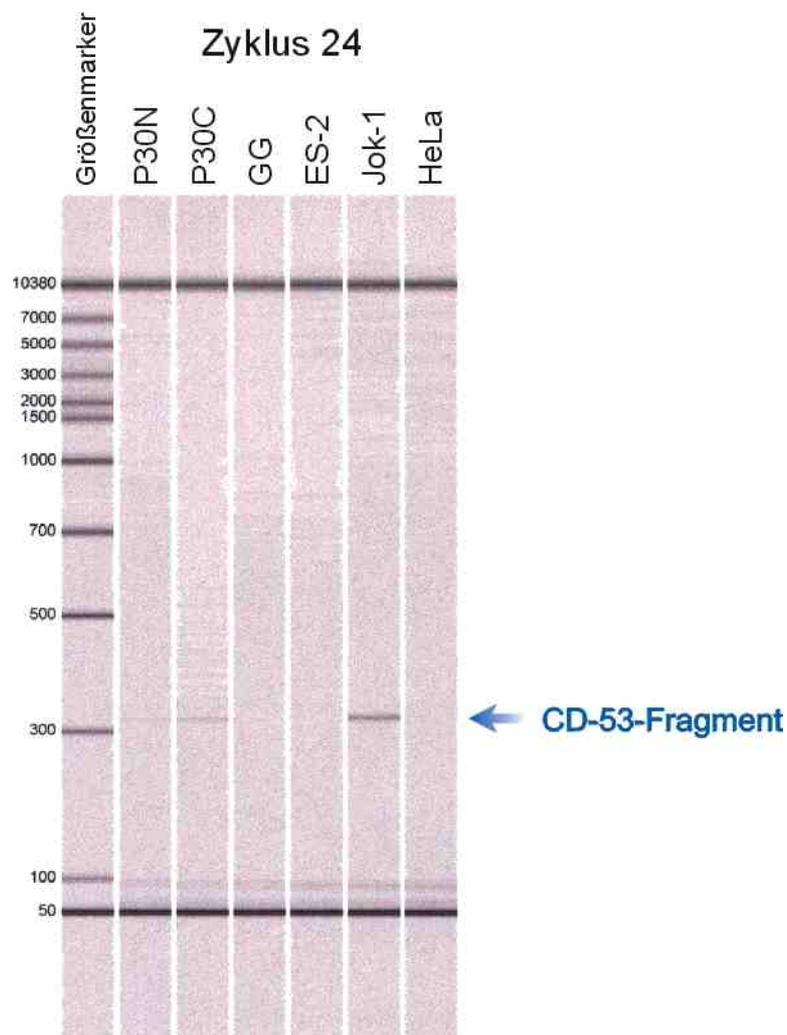
In der morphologischen Abteilung der Frauenklinik Heidelberg erfolgte die histologische Aufarbeitung von OP-Präparaten durch einen Pathologen. Die Bewertung nach morphologischen Kriterien zeigte, daß dabei in der Regel mehr als 98% der Zellen im Ausstrich Tumorzellen waren. So war es möglich, Verunreinigungen unter morphologischen Gesichtspunkten abzuschätzen. Neben der in der Frauenklinik Heidelberg etablierten Methode wurde von mir nach einer zusätzlichen Möglichkeit gesucht, die Verunreinigungen auf molekularer Ebene zu verfolgen. Dazu wurde in den Literaturdatenbanken nach bestimmten, gewebetypspezifischen Markern recherchiert, die in einer quantitativen PCR Verwendung finden können. Damit sollte weitgehend sichergestellt werden, daß nur Gewebe ohne starke Verunreinigungen durch Blut und Basalmembranbestandteile untersucht werden. Die Auswahl der entsprechenden Marker gestaltete sich jedoch schwierig, da das Ovar epithel außer epithelialen auch mesenchymale Charakteristika zeigt, die eine Unterscheidung zur Basalmembran erschwert.

Aufgrund der Versorgung der Gewebe mit Blut, in das Tumorgewebe eingedrungene Makrophagen und Lymphozyten und des Anhaftens der Epithelien an der darunterliegenden Basalschicht sind häufig auch Blut und Bestandteile der Basalmembran in den Abstrichen auszumachen. Dies gilt insbesondere für das Tubenepithel, bei dem die Anhaftung um einiges stärker ist als beim Tumorgewebe. Aus diesem Grund sollte ein Marker für Verunreinigungen durch Blut verwendet werden. Dieser Marker ist CD53.

CD53 befindet sich im Gegensatz zu anderen Proteinen der Tetraspanin Superfamilie fast ausschließlich auf Zelloberflächen von lymphatischen und myeloiden Zellen (*Maecker et al., 1997; Okochi et al., 1999*), die in großer Anzahl im Blut vorhanden sind (*Janeway und Travers, 1995; Alberts et al., 1995*).

Falls in den Abstrichen durch PCR große Mengen an CD53 nachgewiesen werden können, sollte auf die Verwendung des entsprechenden Gewebes verzichtet werden. Als Positivkontrolle für CD53 diente die B-Lymphomzelllinie Jok-1, die CD53 in größerem Umfang exprimiert. HeLa-Zellen und die Ovarialkarzinomzelllinien GG und ES-2 tragen wenig CD53 und dienten als Negativkontrollen.

Abb.: 4.1 zeigt das Ergebnis einer solchen Test-PCR mit cDNA von Patientin 30. Die cDNA wurde zur Bestätigung von differentiell exprimierten Genen in quantitativen PCRs eingesetzt (siehe Kapitel 4.5.6). Auf dem virtuellen Gel konnten keine Signale in den Spuren der PCR-Produkte von HeLa, GG und ES-2 nachgewiesen werden. Ein äußerst schwaches Signal trat bei dem Tubenepithel (P30N), ein stärkeres bei dem Tumorgewebe (P30C) auf. Das stärkste Signal war bei der Positivkontrolle zu verzeichnen (Jok-1). Dieses Ergebnis deutet auf leichte Verunreinigungen, insbesondere des Tumorgewebes, hin.



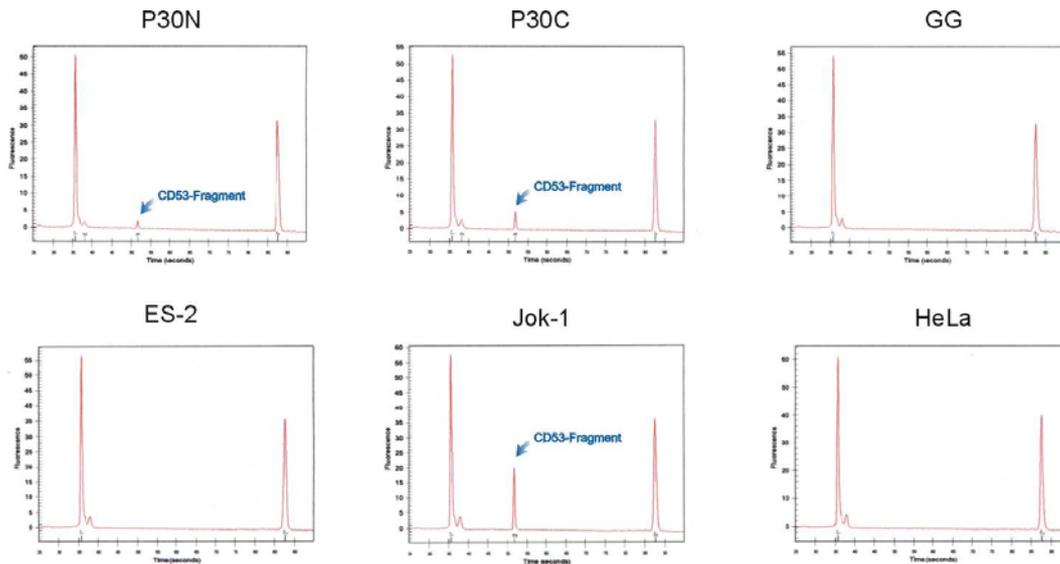


Abb.: 4.1 PCR als Kontrolle auf Verunreinigungen der Gewebe durch Blut.

Exemplarisch wird hier das Ergebnis der Kontroll-PCR mit cDNA von Patientin 30, die auch zur Bestätigung von differenziell exprimierten Genen in quantitativen PCRs eingesetzt wurde (siehe Kapitel 4.5.6), dargestellt. Da CD53 fast ausschließlich auf lymphatischen und myeloiden Zellen präsentiert wird, konnte durch die Vermehrung eines CD53-Fragments mittels PCR das Maß der Verunreinigung der Gewebe durch Blut abgeschätzt werden. Auf dem virtuellen Gel wurden die PCR-Produkte der Zelllinien HeLa, GG und ES-2 aufgetragen. Sie fungierten als Negativ-Kontrollen und wiesen wie erwartet keine Bande auf entsprechender Höhe auf. In dem Tubenepithel von Patientin 30 (P30N) und dem Tumorgewebe des Ovars derselben Patientin (P30C) waren sehr schwache Banden zu erkennen, was besonders im Tumorgewebe auf Verunreinigungen hindeutete. Als Positiv-Kontrolle fungierte cDNA der B-Lymphomzelllinie Jok-1, bei der das stärkste Signal auftrat.

Für die Untersuchungen der verwendeten Gewebe auf Verunreinigungen mit Bestandteilen der Basalmembran konnte bislang kein hinreichender Marker identifiziert werden. Hauptgrund dafür ist in den mesenchymalen Charakteristika des Ovariepithels (*Auersperg et al., 1999*) zu sehen. Ein sonst häufig verwendeter Marker für fibroblastische Zellen, wie beispielsweise das Vimentin, kann nicht eingesetzt werden um Verunreinigungen im Tumorgewebe des Ovars nachzuweisen, da er sowohl im normalen Oberflächenepithel des Ovars als auch im Tumorgewebe des Ovars vorkommt (*Kupryjanczyk und Karpinska, 1998; van Niekerk et al., 1997; Czernobilsky et al., 1985*).

Auch als Kontrolle für das Tubenepithel, bei dem der Test auf Basalschichtbestandteile besonders wichtig wäre, ist Vimentin als Marker umstritten, da es in Tubengeweben nachgewiesen werden konnte (*Woolnough et al., 2000*).

Durch diese Überlegungen wurde deutlich, daß bereits bei der Präparation des zu verwendenden Gewebes durch möglichst genaue Auswahl der Zellen eine Verunreinigung minimiert werden muß. Der einfachste Weg, um definierte Einzelzellen oder ganze Zellverbände auszuwählen, ist die Mikrodissektion. Dafür wurde zu Ende meiner Arbeit ein laser-gestützter Mikrodisektor angeschafft, welcher durch rein physikalische Methoden

extrem saubere Proben liefert. Dabei wird ein Gewebeschnitt, der auf einen Objektträger aufgebracht wurde, mit einer speziellen Folie abgedeckt. Die Folie zeichnet sich dadurch aus, daß sie bei Erwärmung durch den Laser an den darunterliegenden Zellen haftet. Der Laser ermöglicht durch die präzise Positionierung eine punktgenaue lokale Erwärmung der Folie. Durch die definierte Energiezufuhr wird die thermische Belastung des Gewebes niedriger gehalten. Sind die Zellen durch den Laserbeschuß an die Folie fixiert, kann diese abgezogen werden. Nur dort, wo der Laserstrahl zuvor auf die Folie getroffen ist, haftet die Zellschicht des Gewebeschnitts auf der Folie und wird aus dem Zellverband gelöst. Durch Spülen der Folie mit einem entsprechenden Puffer lassen sich die Zellen wieder ablösen und stehen für weitere Experimente zur Verfügung.

4.2 Vergleich der verwendeten Gewebe bezüglich ihrer embryonalen Entwicklung

Neben der Notwendigkeit, die Reinheit der Proben zu gewährleisten, besteht die größte Schwierigkeit darin, die korrespondierenden Gewebe, das heißt Ovarialkarzinomgewebe und gesundes Ovariepithel einer Patientin, zu erhalten.

Die gewünschten „gesunden“ Gewebe können nicht bereitgestellt werden, da bei den Patientinnen entweder der potentielle Wunsch nach Kindern besteht oder aber die Ovarien bereits stark vernarbt sind.

Wird das Ovarialkarzinom beispielsweise in einem sehr frühen Stadium festgestellt, kommt nur eine eingeschränkt radikale Operation in Betracht, bei der das gesunde Ovar nicht entnommen wird. Dies trifft besonders dann zu, wenn es sich um junge Frauen handelt, bei denen ein Kinderwunsch vorhanden ist.

Erfolgt die Operation in einem späteren Stadium, werden neben dem Uterus beide Ovarien und Tuben sowie alle weiteren befallenen Nachbarorgane wie Darm oder Blase entfernt.

Da es sich jedoch bei den von diesem Tumortyp betroffenen Patientinnen in der Regel um Frauen im fortgeschrittenen Alter handelt, bei denen das Epithel des gesunden Eierstocks durch kontinuierliche Ovulationen stark geschädigt ist, so daß keine Abstriche hergestellt werden können, ist auch in diesem Fall kein verwertbares gesundes Gewebe erhältlich.

Um dennoch das Genexpressionsmuster dieses Karzinomtyps untersuchen zu können, wurde ein Kompromiß eingegangen, bei dem Gewebe gleicher embryonaler Abstammung miteinander verglichen werden. Hierzu wurde in Absprache der klinischen Kooperationspartner bereits vor Beginn meiner Arbeit das Epithel der Tube als Referenz zum Ovarialkarzinomgewebe hinzugezogen.

Nach eingehender Literaturrecherche konnte ich jedoch feststellen, daß die embryologische Entwicklung von Ovar und Ovidukt teilweise voneinander abweicht (siehe Kapitel 5.1).

Für unsere Arbeit bedeutet dies, daß nur der oberste Teil des Oviducts, der vom Coelomepithel abstammt, mit dem Ovar verglichen werden kann. Der untere Teil, der ein Verschmelzungsprodukt von Müllerschem- mit Wolffschem Gang ist, also auch Züge des Mesonephros trägt, darf nicht mit dem Oberflächenepithel des Ovars verglichen werden. Nachdem diese Tatsache und die Konsequenz für unsere Arbeit aufgezeigt waren, wurde nur der oberste Teil des Eileiters, der ausschließlich vom Coelomepithel abstammt, von unseren klinischen Kooperationspartnern der Universitäts-Frauenkliniken Heidelberg und Tübingen asserviert.

4.3 Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Erfassung der Expressionsmuster von Geweben

Für die Erfassung der Genexpressionsmuster bei der Karzinogenese des Ovars ist neben der Wahl der Vergleichsgewebe auch die Methode für die Feststellung einer Veränderung im Expressionsmuster von entscheidender Bedeutung. Als Methoden stehen dazu die subtraktive Hybridisierung und das Differential Display zur Verfügung.

Die subtraktive Hybridisierung zweier Zell- oder Gewebepopulationen ist auf unterschiedliche Weise möglich. Man unterscheidet zwischen physikalischen Trenntechniken, wie beispielsweise durch Biotin/Streptavidin, und positiver PCR-Selektion. Die positive PCR-Selektion liefert etwas verlässlichere Ergebnisse (*Lisitsyn et al., 1993*) und erlaubt das Arbeiten mit geringen Mengen an Ausgangsmaterial (*Sagerström et al., 1997*). Aus diesen Gründen fiel meine Entscheidung zugunsten der Arbeit mit der positiven PCR-Selektion als der subtraktiven Hybridisierungsmethode der Wahl, die im folgenden vereinfacht als subtraktive Hybridisierung bezeichnet wird, und der Arbeit mit dem Differential Display.

Zu Beginn ist die Vorgehensweise bei beiden Methoden zunächst identisch. Aus zwei unterschiedlichen Gewebe- oder Zellpopulationen, hier als Tester und Driver bezeichnet, wird die Gesamt-RNA isoliert. Danach erfolgt die reverse Transkription der mRNAs, wobei die daraus resultierenden cDNAs in einer anschließenden PCR amplifiziert werden. Ab diesem Schritt unterscheiden sich beide Methoden.

Bei der subtraktiven Hybridisierung (siehe Kapitel 3.7) werden die cDNAs beider Zellpopulationen denaturiert. Die einzelsträngigen DNAs von Tester und Driver werden vereinigt, wobei die Driver cDNA im Überschuß vorliegt, so daß die Sequenzen, die beiden Populationen gemein sind, miteinander hybridisieren können. Die einzelsträngigen Tester DNAs, die in der Driver-Population kein Gegenstück finden, werden amplifiziert und kloniert. Beim Differential Display hingegen erfolgt nach der Amplifikation durch eine PCR die Auftrennung der markierten cDNA-Populationen in einem denaturierenden Sequenzgel.

Signifikante Banden beider Populationen werden aus dem Gel ausgeschnitten und die darin enthaltene DNA vermehrt und kloniert.

Da beide Methoden deutliche Vor- und Nachteile besitzen, aber die Methode des Differential Displays bereits im Arbeitskreis etabliert war, beschäftigte ich mich zunächst mit der subtraktiven Hybridisierung.

4.4 Durchführung der subtraktiven Hybridisierung mit Ovarialkarzinomzelllinien

Aufgrund der Limitierung geeigneter, zur Verfügung stehender Gewebeproben wurden in Vorversuchen zwei Ovarialkarzinomzelllinien (ES-2 und GG) eingesetzt, die mittels des PCR-SELECT cDNA Subtraction Kits der Firma Clontech verglichen werden sollten. Dabei wurden die Zelllinien in gleicher Weise aufbereitet, wie es später mit den Patientenproben geschehen sollte.

Die Durchführung der Subtraktion ist in Kapitel 3.7 beschrieben. Für eine Subtraktion werden ca. 0,5-2 µg cDNA benötigt. Aus diesem Grund mußte vor der eigentlichen Subtraktion, wie es später bei den Patientenproben erforderlich geworden wäre, die RNA anhand des SMART PCR cDNA Synthesis Kits der Firma Clontech (siehe Kapitel 3.5) amplifiziert werden. Dabei zeigte sich, daß die Herstellerangaben bezüglich der zu verwendenden RNA-Mengen nach oben korrigiert werden mußten. Statt der angegebenen 0,5 µg mußten etwa 0,6-0,8 µg Gesamt-RNA pro Zelllinie für die SMART PCR eingesetzt werden, da aus 500 ng Gesamt-RNA nicht 1-3 µg, sondern lediglich etwa 850-1000 ng doppelsträngige cDNA gebildet wurde.

Pro Zelllinie wurden für die Subtraktion in einer Richtung jeweils acht Ansätze mit 100 ng RNA eingesetzt. In der „Erststrang Synthese“ wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben und anschließend in der „long Distance“ PCR amplifiziert. Das Ergebnis ist in Abb.: 4.2 zu sehen. Bei den stellvertretend für alle Ansätze, exemplarisch abgebildeten PCR-Produkten war eine Zunahme der Intensität bei Erhöhung der Zyklenanzahl zu verzeichnen, wobei etwa bei 20 Zyklen das Optimum für die Subtraktion erreicht war. Weiterhin waren die Intensitäten der Signale bei gleicher Zyklenanzahl in den Proben ES-2 und GG gleich. Dies bedeutete eine vergleichbare Effizienz der PCR der beiden Ansätze, die das Ergebnis aller Ansätze widerspiegelte.

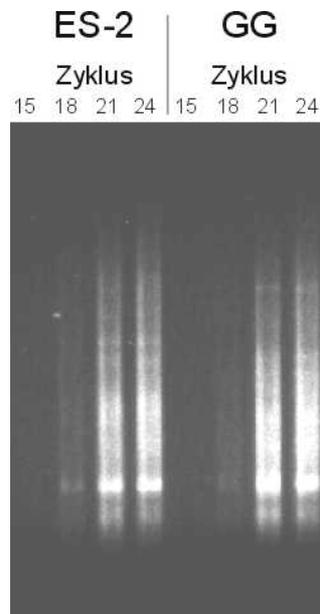


Abb.: 4.2 Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten, die in der subtraktiven Hybridisierung eingesetzt wurden.

Die mRNAs der Ovarialkarzinomzelllinien ES-2 und GG waren mit Hilfe des SMART PCR cDNA Synthesis Kits revers transkribiert und ihre cDNAs in einer PCR vermehrt worden. Die PCR verlief über 15, 18, 21 und 24 Zyklen, damit eine für die subtraktive Hybridisierung optimale Amplifikation bestimmt werden konnte. Das Optimum war bei etwa 20 Zyklen erreicht. Die Intensitäten der Signale waren in allen Proben gleich, was für die vergleichbare Effizienz der PCR in den Ansätzen sprach.

Aufgrund des Optimums bei 20 Zyklen wurden die restlichen Proben der gleichen Zyklenanzahl unterworfen und nach der PCR die cDNA der Zelllinien miteinander vereinigt. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit Hilfe von CHROMA-SPIN™-1000 Säulen, von denen drei Stück pro Zelllinie eingesetzt wurden. Anschließend wurden die Proben erneut vereinigt und für die Ligation mit den entsprechenden Adaptoren mit RsaI hydrolysiert. Das Ergebnis des Restriktionsansatzes wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft und ist in Abb.: 4.3 dargestellt. Beim Vergleich der über die Säulen gereinigten, nicht fragmentierten DNA mit der fragmentierten DNA war eine deutliche Verschiebung der DNA-Größe nach unten zu beobachten.

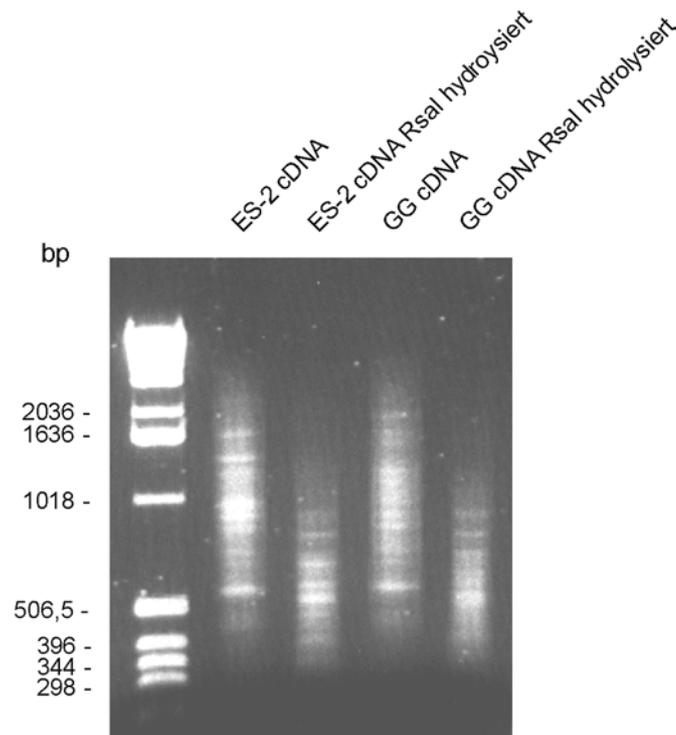


Abb.: 4.3 Überprüfung der Restriktionsendonuklease-Hydrolyse mit RsaI.

Bei den unfragmentierten Proben (ES-2 cDNA und GG cDNA) befand sich die DNA hauptsächlich in einem Bereich von etwa 500-1500 bp, in den mit RsaI fragmentierten Ansätzen überwiegend in einem Bereich von 400-1000 bp.

Mittels des QIAquick PCR Purification Kits der Firma Qiagen wurde die RsaI hydrolysierte DNA gereinigt (Kapitel 3.23).

Anschließend konnten die entsprechenden Adaptoren 1 und 2 mit der Tester DNA (hier Zelllinie GG) ligiert werden. An dieser Stelle erfolgte keine Ligation der Adaptoren mit Zelllinie ES, da lediglich in einer Richtung subtrahiert wurde.

Die Überprüfung der Ligationseffizienz erfolgte, nach Inaktivierung der Ligase, durch PCR. Beide Tester-Populationen wurden in jeweils zwei PCR-Ansätzen eingesetzt. In einem Ansatz wurden Primer, die mit Sequenzen eines Haushaltsgens, der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (G3PDH), hybridisierten, zugesetzt. Man erwartete in diesem Fall ein Signal bei etwa 0,5 kb. In dem anderen Ansatz amplifizierten Primer ein Fragment, welches von dem G3PDH 3'-Primer und dem PCR Primer 1, der zu dem 5'-Ende der Adaptoren komplementär ist, erkannt wurde. Dort sollte ein Signal auf Höhe von 0,75 kb sichtbar werden, dessen Intensität ähnlich dem des Haushaltsgens sein sollte, falls die Ligationseffizienz etwa 25% betrug. In Abb.: 4.4 ist das Ergebnis der PCR zu sehen.

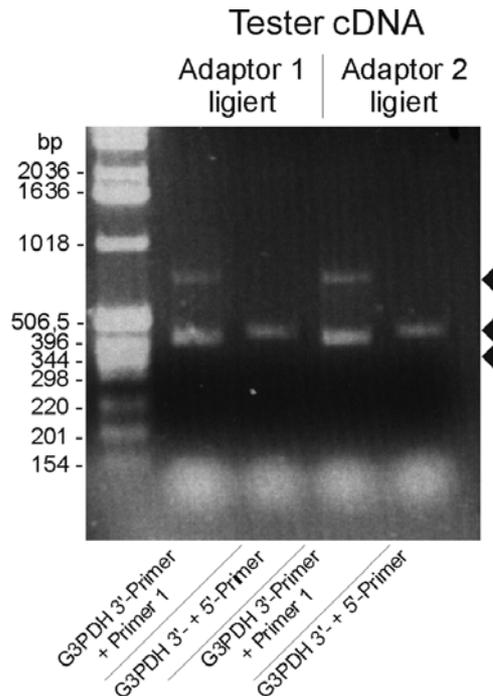


Abb.: 4.4 Überprüfung der Ligationseffizienz durch PCR.

PCR-Produkte, die bei Verwendung des 3'- und 5'-G3PDH-Primers entstanden, zeigten eine Bande bei etwa 0,5 kb. Durch den Vergleich der Intensität dieser Bande mit der Bande bei etwa 0,75 kb in den Ansätzen mit dem G3PDH 3'-Primer und dem Primer 1 bzw. 2 konnte die Ligationseffizienz abgeschätzt werden. Das Auftreten einer zusätzlichen Bande bei etwa 430 bp blieb ungeklärt.

Erwartungsgemäß war bei der PCR mit den beiden G3PDH-Primern eine Bande auf der entsprechenden Höhe zu erkennen. Völlig überraschend erschien jedoch zu dem bei 0,75 kb erwarteten Signal ein zusätzliches bei etwa 430 bp. Auch nach Anfrage bei der Herstellerfirma ließ sich nicht klären, weshalb dieses weitere Fragment amplifiziert wurde. Laut Firmenauskunft trat dieses Phänomen häufiger auf, die Ursache dafür wurde aber bis dato nicht untersucht. Eine eigene Datenbankanalyse mit Husar erbrachte keine Klärung des Sachverhalts.

Aufgrund der vergleichbaren Intensitäten des Haushaltsgen- und des 750 bp-Fragments erfolgten erste und zweite Hybridisierung von Tester und Driver cDNA. Zuvor wurde eine geringe Menge aus beiden Ligationsansätzen entnommen und vermischt. Diese Mischung diente im späteren Verlauf als unsubtrahierte Tester-Kontrolle. Die Methode ist in Kapitel 3.7 detailliert beschrieben, eine schematische Übersicht der subtraktiven Hybridisierungs-PCRs ist in Abb.: 3.1 dargestellt.

In der, sich an die zweite Hybridisierung anschließenden, ersten PCR wurden die Enden der doppelsträngigen cDNAs durch die Polymerase aufgefüllt und die doppelsträngigen Tester cDNAs amplifiziert. Dabei handelte es sich hauptsächlich um Tester cDNA mit zwei

verschiedenen Adaptoren, d.h. die in Zelllinie ES und GG unterschiedlich exprimierten cDNAs. Die zweite, nested, PCR diente der Anreicherung der differentiell exprimierten Sequenzen und der Verminderung des Hintergrundes.

Die Ergebnisse von erster und zweiter PCR wurden durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Abb.: 4.5 zeigt das Ergebnis der zweiten PCR.

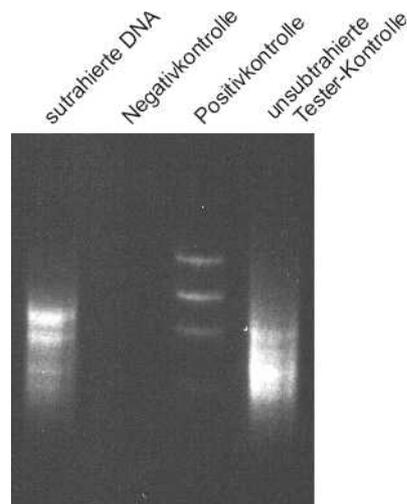


Abb.: 4.5 Elektrophoretische Trennung der Produkte von erster und zweiter PCR.

Deutliche Unterschiede waren zwischen den PCR-Produkten der subtrahierten bzw. unsubtrahierten Tester-Kontrolle zu sehen. Dies sprach für eine erfolgreiche Subtraktion. Die Negativkontrolle zeigte kein Signal, in der Positivkontrolle waren mehrere Banden zu sehen. Sie diente lediglich zur Überprüfung der PCR-Bestandteile.

Die deutlich erkennbaren Unterschiede zwischen der subtrahierten Zelllinien DNA und der unsubtrahierten Tester-Kontrolle (cDNA von GG ligiert mit beiden Adaptoren) wiesen auf erfolgreiche Subtraktionen und PCRs hin. Eine zusätzliche Probe, die alle PCR-Komponenten mit Ausnahme von DNA enthielt, fungierte als Negativkontrolle und zeigte kein Signal. Als PCR-Positivkontrolle diente die gelieferte subtrahierte cDNA. Im Vergleich zeigten subtrahierte DNA und Positivkontrolle Signale im höhermolekularen Bereich, was für die Qualität der Ausgangs-RNAs sprach. Ebenso war der Gehalt der experimentell gewonnenen subtrahierten DNA vergleichbar mit der Kontrolle.

Die Anreicherung von unterschiedlich exprimierten Genen nach Subtraktion kann durch PCR analysiert werden. Dabei geht man von der Annahme aus, daß nach erfolgreicher Subtraktion alle DNAs, die in beiden Zelllinien in vergleichbaren Mengen vorkommen, reduziert werden. Im Gegensatz dazu sollen Tester DNAs, die keine komplementären Sequenzen im Driver besitzen, exponentiell vermehrt werden und deshalb in größeren Mengen vorliegen. Werden nun sowohl subtrahierte als auch unsubtrahierte DNA in einer PCR eingesetzt, bei der Primer für eine Matrize verwendet werden, die ursprünglich in

beiden Zelllinien in gleicher Menge vorliegen, erwartet man bei der subtrahierten DNA sehr viel später ein Signal als bei der unsubtrahierten.

Die Abschätzung der Effizienz der Subtraktion erfolgte in diesem Versuch anhand des Haushaltsgens Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase. Aufgrund mangelnder Informationen, welche Gene in beiden Zelllinien unterschiedlich exprimiert sind, wurden keine Analysen diesbezüglich durchgeführt. Das Ergebnis der PCR ist in Abb.: 4.6 gezeigt.

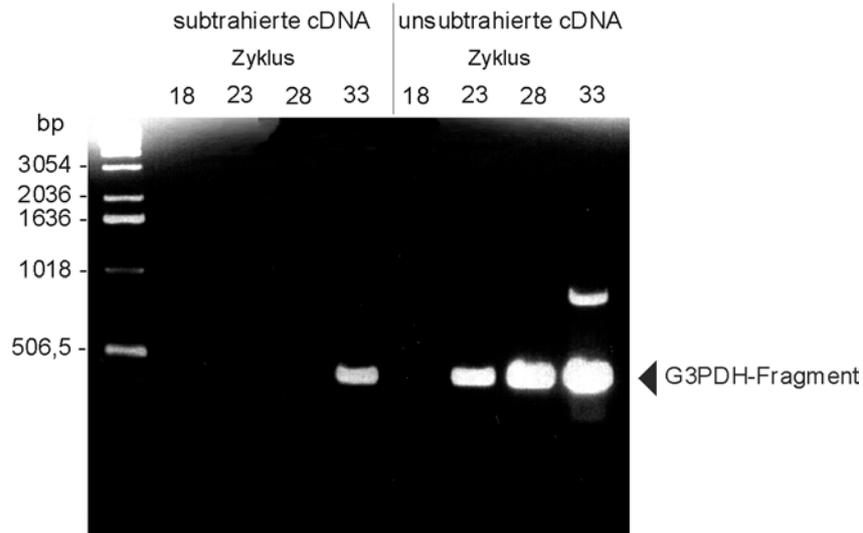


Abb.: 4.6 Abschätzung der Subtraktionseffizienz.

Die cDNAs von subtrahierten und unsubtrahierten Proben waren mit den 5'- und 3'-G3PDH-Primern in einer PCR eingesetzt worden. Die PCR verlief über 18, 23, 28 und 33 Zyklen. Bei der subtrahierten cDNA war ein Signal bei 33 Zyklen zu erkennen, in der unsubtrahierten cDNA dagegen bereits bei 23 Zyklen. Geht man von der Annahme aus, daß nach erfolgreicher Subtraktion alle DNAs, die in beiden Zelllinien in vergleichbaren Mengen vorkommen, reduziert werden, ist dies ein Beweis für die erfolgreiche Subtraktion. Bei 33 Zyklen erschien in der unsubtrahierten Probe eine zusätzliche unspezifische Bande.

Bei der Agarose-Gelelektrophorese waren in den unsubtrahierten Proben mit geringerer Anzahl an Zyklen Banden entsprechender Größe zu verzeichnen, was für die erfolgreiche Durchführung der Subtraktion sprach.

Trotz dieses Erfolges zeigten sich Probleme und Kritikpunkte bereits während der Arbeit mit dieser Methode. Zunächst bestand das Hauptproblem darin, die exakte Ausgangsmenge an Gesamt-RNA zu bestimmen.

Wird die Menge der einzusetzenden RNA vor Beginn der Subtraktion unzureichend bestimmt, kann dies zu falschen Ergebnissen führen. So verhindert die zweifach höhere Expression eines Haushaltsgens dessen effiziente Subtraktion. Im Fall der Ovarialkarzinomzelllinien war die verlässliche Mengenbestimmung kein größeres Problem, da ausreichende Mengen an RNA zur Verfügung standen. Sie konnte ohne weiteres UV-photometrisch und durch Abschätzen nach Auftragen auf ein Agarosegel bestimmt werden.

Bei den Patientenproben war die Anwendung dieser Verfahren nicht möglich. Die isolierten RNA-Mengen waren insbesondere beim Tubenepithel so gering (häufig etwa 1-2 µg), daß nach Bestimmung mit den herkömmlichen Methoden nichts mehr für die eigentliche Subtraktion verblieben wäre.

Nach eingehender Suche fand ich eine Möglichkeit, die Konzentration mit geringen RNA-Mengen zu bestimmen. Dabei war es ausreichend, wenn der RNA ein Fluoreszenzfarbstoff zugesetzt und spektrofluorometrisch vermessen wurde. Die Vorgehensweise ist unter Kapitel 3.3.2 beschrieben. Die Detektionsgrenze lag dabei bei ca. 4 ng/ml und somit deutlich unter der bei den oben genannten Verfahren. Damit war es möglich, auch mit geringsten Mengen an RNA verlässliche Mengenbestimmungen durchzuführen.

Der größte Kritikpunkt, der letztendlich die Entscheidung zugunsten der Methode des Differential Displays lieferte, liegt in der Notwendigkeit, die cDNA vor Subtraktion zusätzlich zu amplifizieren. Zwar kann die cDNA in ausreichenden Mengen vermehrt und so die subtraktive Hybridisierung prinzipiell durchgeführt werden, doch relativiert die Selektivität der Methode diese Vorgehensweise. Aspekte dazu werden in Kapitel 5.2 diskutiert.

Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf der Arbeit diese Methode nicht weiter verwendet.

4.5 Analyse der Genexpression mittels Differential Display

Da aufgrund bedeutender Nachteile die Methode der subtraktiven Hybridisierung nicht angewandt wurde, war die bereits im Arbeitskreis etablierte Methode des Differential Displays die Methode der Wahl. Die Vorgehensweise des Differential Displays ist in Abb.: 3.2 schematisch dargestellt.

Beim Differential Display erfolgt als erstes die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellsaten. Die genaue Vorgehensweise der RNA-Isolierung ist in Kapitel 3.2 beschrieben.

4.5.1 Isolierung der RNA aus Geweben

Während meiner Arbeit wurde RNA aus Geweben von Patientin 21, 22 und 26 isoliert. Die Mengen an Gesamt-RNA bei Patientin 21 und 22 betragen weniger als 0,4 µg, weshalb mit diesen Proben kein Differential Display durchgeführt werden konnte.

Aus den Geweben von Patientin 26 konnten größere Mengen an RNA gewonnen werden. Im Tumorgewebe des Ovars waren dies 19 µg, im Epithel der Tube etwa 4,5 µg. Die Bestimmung der RNA-Konzentrationen erfolgte mit Hilfe der Spektrofluorometrie (siehe dazu Kapitel 3.3.2).

Um die Integrität der RNA zu überprüfen, wurde 1 µg der aus dem Tumorgewebe extrahierten RNA auf einem Agarosegel aufgetrennt. Das Ergebnis der elektrophoretischen Trennung zeigt Abb.: 4.7.

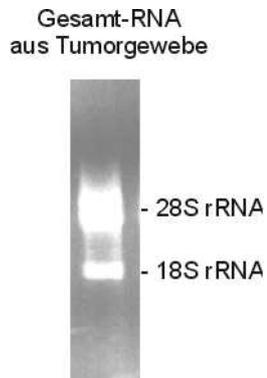


Abb.: 4.7 Überprüfung der Integrität der RNA aus dem Tumorgewebe.

1µg der aus dem Tumorgewebe isolierten RNA wurde elektrophoretisch getrennt. Auf Höhe von etwa 5 kb befand sich die 28S rRNA, auf Höhe von 1,9 kb die 18S rRNA. Es waren keine Anzeichen einer Degradation wahrnehmbar.

Neben der erwarteten 28S und der 18S rRNA, die auf Höhe von 5,0 kb und 1,9 kb liefen, waren keine Spuren von Degradation zu erkennen. Der Abbau hochmolekularer RNA wäre durch eine Verschiebung der RNA in den unteren Gelbereich gekennzeichnet, der als diffuse Bande wahrgenommen wird.

4.5.2 Hydrolyse der DNA und reverse Transkription der mRNA von Patientin 26

Nach Isolierung der RNA wurde die in den Proben enthaltene DNA durch DNase I abgebaut. Damit wurde die Bildung falsch positiver Fragmente, die aufgrund von DNA-Rückständen während einer Differential Display-PCR (DD-PCR) entstehen, verhindert. Pro Gewebetyp wurden 4 µg RNA eingesetzt.

Anschließend erfolgte die reverse Transkription der mRNA in jeweils vier parallelen Ansätzen mit den Ankerprimern VC und VG (siehe Kapitel 3.6.1). Dies half, zufällige Abweichungen in der reversen Transkription zu erkennen und Fehlerquellen bei der DD-PCR auszuschließen. Die Sequenz der Ankerprimer (Kapitel 2.12) besteht hauptsächlich aus zwölf Desoxythymidinphosphaten, die sich an den für die mRNA der Eukaryonten charakteristischen Poly-Adenylierungsschwanz anlagern und der reversen Transkriptase als Primer zur Verfügung stehen. Anschließend konnte die cDNA verlängert werden.

4.5.3 Differential Display-PCR mit cDNA von Patientin 26

Ziel der DD-PCR ist es, mit den Anker-/Arbitraryprimerkombinationen möglichst alle exprimierten mRNAs der Ovarzellen und somit auch alle unterschiedlich exprimierten mRNAs des Tumors zu erfassen. Bei den Arbitraryprimern handelt es sich um synthetische Oligonukleotide mit einer Länge von 10 bp und einem Gehalt von etwa 50% GC, was in etwa

der Zusammensetzung der humanen DNA entspricht. Die Basen-Abfolge der Arbitraryprimer wurde unter Wahrung der oben aufgeführten Voraussetzungen von der Firma Genosys, Ismaning, statistisch ausgewählt („willkürliche Primer“). Damit alle unterschiedlich exprimierten mRNAs erfaßt werden können, sollten theoretisch etwa 50-60 verschiedene Arbitrary-/Ankerprimerkombinationen ausreichen. In der Praxis zeigte sich jedoch, daß diese Primer bei weitem nicht das gesamte Spektrum abdecken (*Ledakis et al., 1998*) und die Diskussion, wie viele Arbitraryprimer tatsächlich für die Untersuchung der gesamten Information der Ovarzellen benötigt werden, bisher rein theoretischer Natur war. Bislang konnten in keinem Fall ausreichende Mengen an RNA isoliert werden, um annähernd die theoretische Anzahl der Primer zum Einsatz zu bringen.

Bei den Proben von Patientin 26 erfolgte die Differential Display-PCR mit beiden Ankerprimern und jeweils 20 Arbitraryprimern in 4 parallelen Ansätzen. Das heißt, insgesamt wurden 40 Primerkombinationen verwendet. Für jede Probe wurden vier parallele Ansätze durchgeführt, um zufällige Veränderungen und Kontaminationen von der Analyse auszuschließen.

Das Expressionsmuster wurde autoradiographisch bestimmt. Hierzu wurde die Hälfte der PCR-Produkte auf ein 6%iges denaturierendes Polyacrylamidgel (PAGE) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kapitel 3.9). Nach Exposition eines Röntgenfilms für etwa 24 h konnten Veränderungen im Genexpressionsmuster beobachtet werden.

Signifikante Banden wurden aus den Gelen ausgeschnitten und die cDNA eluiert (Kapitel 3.10). Zwei Beispiele sind in Abb.: 4.8 zu sehen. Bei beiden Fragmenten schlossen sich weitere Experimente an, die in späteren Kapiteln beschrieben werden. Insgesamt wurden etwa 35 Banden ausgeschnitten und weiterverfolgt.

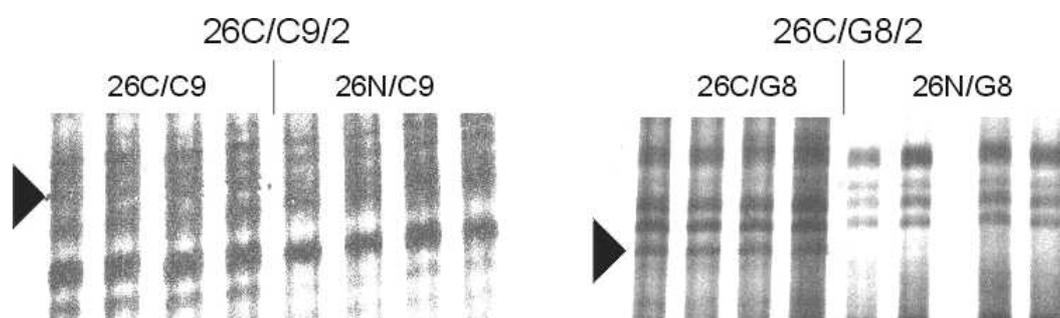


Abb.: 4.8 Ausschnitte von PAGEs mit signifikanten Unterschieden.

Aus jeweils zwei von vier Spuren wurden die markierten Banden ausgeschnitten. Es handelte sich um die Fragmente von 26C/C9/2 und 26C/G8/2. Die Nomenklatur, die bereits in Kapitel 3.10 erwähnt ist, erklärt sich für die hier abgebildeten Unterschiede mit: Nummer der Patientin (Patientin 26), Gewebetyp (in beiden befanden sich die Banden nur im Tumorgewebe des Ovars), Ankerprimer (VC bzw. VG), Arbitraryprimer (9 bzw. 8), Bandennummer von oben gesehen (in beiden Fällen die zweite).

4.5.4 Reamplifikation unterschiedlich exprimierter Fragmente

Es konnten zahlreiche cDNA-Fragmente durch PCR vermehrt werden. Das Ergebnis einer Reamplifikation ist anhand der bereits oben genannten Beispiele in Abb.: 4.9 zu sehen.

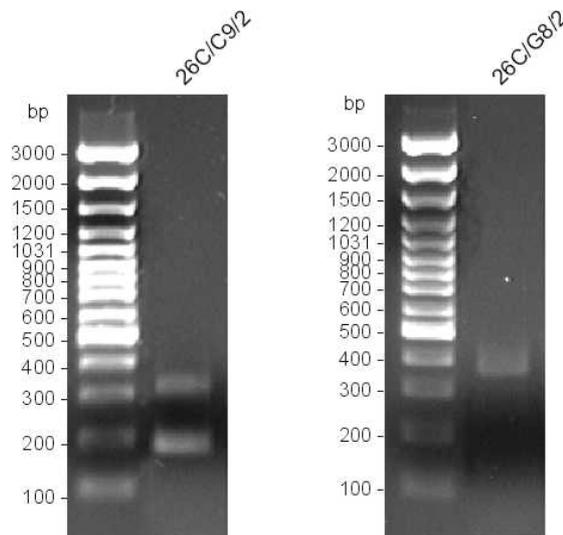


Abb.: 4.9 Reamplifikationsprodukte der Fragmente 26C/C9/2 und 26C/G8/2.

Bei der Reamplifikation der DNA aus den eluierten Banden konnten beim 26C/C9/2-Fragment zwei verschiedene DNAs nachgewiesen werden, wobei die Bande bei ca. 320 bp mit der erwarteten Größe aus der DD-PCR übereinstimmte. Die zweite Bande von etwa 180 bp war unspezifisch. Auf Höhe von etwa 380 bp befand sich bei der entsprechenden Reamplifikation eine Bande, die dem Fragment 26C/G8/2 aus der DD-PCR entsprach.

Bei den Fragmenten, bei denen eine Reamplifikation nicht gelang, waren häufig zu hohe Harnstoff-Konzentrationen oder geringe cDNA-Mengen der Grund. Die Menge des Harnstoffs ist von der Größe der ausgeschnittenen Banden abhängig. Deshalb sollte darauf geachtet werden, daß von der Umgebung der Bande so wenig wie möglich in den Ansatz gelangt, was nicht immer möglich war. Die zweite Annahme, nach der zuwenig cDNA eluiert wurde, konnte durch erneutes Ausschneiden der verbliebenen Banden überprüft werden, brachte aber nicht immer den gewünschten Erfolg.

Trotz dieser Einschränkungen konnten bei etwa 30 ausgeschnittenen Banden die cDNAs durch PCR vermehrt werden.

4.5.5 Klonierung von cDNA-Fragmenten

Die Voraussetzung für die Klonierung in den pCRII Topo TA Vektor wurde durch die in der PCR verwendeten Taq-DNA-Polymerase geschaffen. Diese verursacht 3'-Adenosin-Überhänge, die zur Klonierung in einen Vektor mit 3'-Thymidin-Überhang genutzt werden können. Obwohl die Voraussetzung durch die Reamplifikations-PCR geschaffen waren, konnten einige interessant erscheinende cDNAs nicht kloniert werden. Dies war teilweise mit

dem Auftreten mehrerer Banden in einem PCR-Ansatz zu erklären. Dabei ließen sich einige der als Mehrfachbanden auftretenden Proben aufgrund ihrer schwachen Intensität auf dem Agarosegel nicht als Einzelbande ausschneiden. Bei anderen Mehrfachbanden war das Ausschneiden aus dem Gel möglich, die Mengen nach Aufreinigung waren jedoch zu gering, um für eine Klonierung erfolgreich eingesetzt zu werden.

Von den etwa 30 reamplifizierten DNA-Fragmenten wurden 25 erfolgreich in den pCRII Vektor kloniert und in Bakterien vermehrt.

Pro cDNA-Fragment wurden fünf bis zehn Bakterienklone vereinzelt und deren Plasmid-DNA isoliert. Insgesamt waren es etwa 300 Plasmid-Minipräparationen. Die Durchführung ist in Kapitel 3.16 nachzulesen. Nach Restriktionsanalyse mit der Endonuklease EcoRI, die eine Sequenz in der Umgebung der Klonierungsstelle erkennt und schneidet, wurden Fragmente mit gleicher Größe wie auf dem DD-PAGE erwartet. Einige Klone, die diese Merkmale zeigten, wurden an Andreas Hunziker (Abteilung Prof. Franke) zur Sequenzierung weitergeleitet. Exemplarisch für die EcoRI geschnittenen Plasmid-Minipräparationen sind hier Klone des Fragments 26C/G8/2 in Abb.: 4.10 dargestellt.

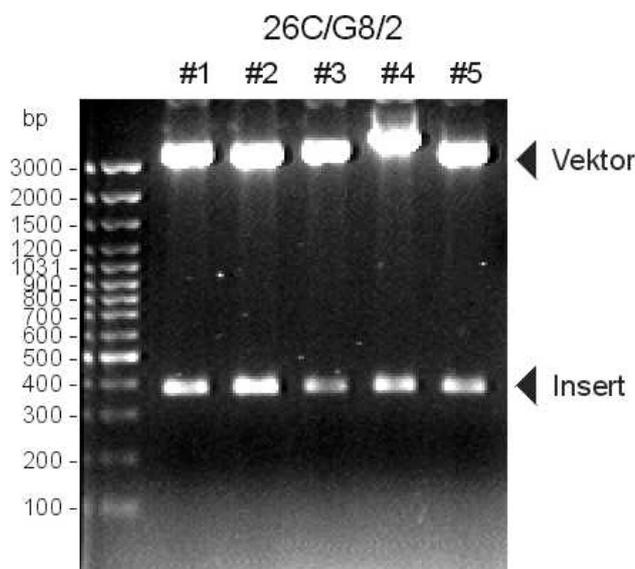


Abb.: 4.10 Restriktionsverdauung des rekombinanten pCRII Topo TA Vektors mit EcoRI.

In den Spuren der Klone 1-5 (#1-5) wurden die rekombinanten pCRII Topo TA Vektoren, auf die zuvor die Restriktionsendonuklease EcoRI einwirkte, aufgetragen. Alle Inserts entsprachen mit etwa 380 bp der Größe des ursprünglichen DD-PCR Fragments von 26C/G8/2.

Wie sich zu diesem Zeitpunkt herausstellte, enthielten nur sehr wenige Banden einheitliche cDNA-Fragmente. Diese Beobachtung wurde auch von anderen Forschergruppen beschrieben (*Smith et al., 1997*). Da die geringen mRNA-Mengen die sofortige Überprüfung der Unterschiede durch Northern Blot Hybridisierung mit RNA derselben Patientin nicht ermöglichten, sollte ursprünglich nur mit den Ergebnissen von einheitlichen Banden weitergearbeitet werden. Dies hätte die zu untersuchenden Fragmente zu stark eingeschränkt und wäre darüber hinaus keine Garantie dafür gewesen, daß diese DNA an der Entstehung der Unterschiede im Sequenzgel beteiligt war. Deshalb wurden alle 120 unterschiedlichen Sequenzen in den Datenbanken mit Hilfe des BLASTN-Algorithmus des HUSAR (Heidelberg Unix Sequenz Analysis Resources) untersucht.

4.5.6 Datenbankanalyse der differentiell exprimierten Fragmente und Zusammenfassung der wichtigsten Unterschiede aus Geweben von Patientin 26

Nach Datenbankanalyse konnten die Sequenzen in vier Klassen eingeteilt werden:

Bei der ersten Klasse handelte es sich um Sequenzen, die in einer cDNA enthalten waren, die für ein bereits bekanntes Protein codierten. Dazu gehörten beispielsweise das K-ras, ein c-myc bindendes Protein oder eine kleine GTPase, zu der bislang keine weiteren Publikationen vorliegen (siehe Tab.: 4.1 Fragment 26C/C1/1 und 26C/C9/1). In einer zweiten Klasse konnten Sequenzen, die homolog zu Expressed Sequence Tags (ESTs) waren, das Protein aber noch unbekannt war, zusammengefaßt werden. Zu diesen zählte die überwiegende Zahl aller Sequenzen (beispielsweise 26C/C9/2 oder 26C/G10/1 in Tab.: 4.1). Alle, bei denen noch keine Sequenzen in den Datenbanken vorlagen oder es nur schwach homologe Strukturen zu anderen Spezies gab, wurden in einer dritten Klasse zusammengefaßt. Neben Sequenzen, die diesen drei vorstehenden Gruppen zugeteilt wurden, gab es zahlreiche Sequenzen, die Homologien zu ribosomalen oder mitochondrialen Proteinen aufwiesen. Diese Sequenzen wurden der vierten Klasse zugeordnet und nicht weiter verfolgt.

Eine Zusammenstellung der wichtigsten Ergebnisse des Differential Displays mit Geweben von Patientin 26 liefert Tab.: 4.1

Fragment-bezeichnung	Anzahl der sequenzierten Klone	Primerkombination	Homologien mit Proteinen/ESTs
26C/C1/1	insgesamt 8: Klon 2+4+8 bzw. Klon 6+10 identisch	Anker C mit Arbitrary 1	Klon 2+4+8: humane mRNA für ein c-myc bindendes Protein Klon 6+10: humane K-ras Onkogen-mRNA
26C/C9/1	insgesamt 7: Klon 3+5 bzw. 8+9 identisch	Anker C mit Arbitrary 9	Klon 3+5: mRNA mit Homologien zu einer bislang unpublizierten kleinen GTPase Klon 8+9: BAC-Klone Klon 16: humane Kinectin mRNA
26C/C9/2	insgesamt 4: alle identisch Die Unterschiede wurden zusätzlich in Geweben von Patientin 18 gefunden	Anker C mit Arbitrary 1	Klon 1+4+22+24: zahlreiche ESTs
26C/G8/2	insgesamt 9: davon 6 identisch Die Unterschiede wurden zusätzlich in Geweben von Patientin 31 gefunden	Arbitrary 8 mit Arbitrary 8	Klon 1+2: genomische Sequenz Klon 3: ESTs mit schwacher Homologie zum maternalen Effekt Protein STAUFEN
26C/G10/1	insgesamt 5: Klon 1+3+7+8 identisch Die Sequenz von Klon 1+3+7+8 wurde zusätzlich in Geweben von Patientin 31 gefunden	Anker G mit Arbitrary 10	Klon 1+3+7+8: zahlreiche ESTs
26N/G16/1	insgesamt 3, alle identisch	Anker G mit Arbitrary 16	Klon 1+3+4: ESTs mit schwacher Homologie zu hRabin3

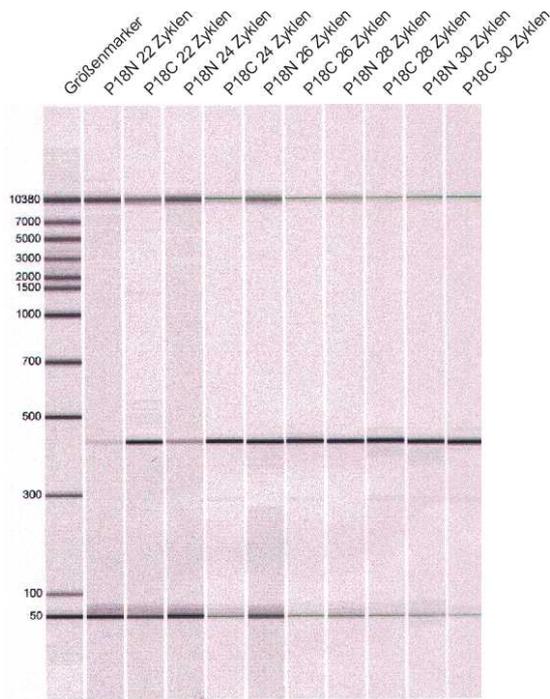
Tab.: 4.1 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse des Differential Displays mit Geweben von Patientin 26.

4.5.7 Etablierung der Methode der semiquantitativen bzw. quantitativen PCR zur Überprüfung der Unterschiede

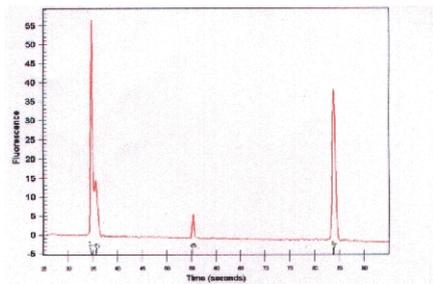
Da die cDNA-Fragmente einer Bande in den überwiegenden Fällen sehr heterogen waren und eine Überprüfung der Unterschiede durch die Northern Blot Hybridisierung mit RNA derselben Patientin, wie oben erwähnt, nicht möglich war, mußte eine andere Möglichkeit eingesetzt werden, um die richtige cDNA zu ermitteln. Die Methode der Wahl fiel auf die semiquantitative PCR, die von mir in Zusammenarbeit mit Dr. Hans-Peter Zimmermann in unserer Arbeitsgruppe etabliert wurde (siehe Kapitel 3.20).

In einer semiquantitativen bzw. quantitativen PCR werden von beiden Gewebetypen äquivalente Mengen an cDNA verwendet. Für die Reaktion werden die beiden genspezifischen Primer eingesetzt, die für die Vermehrung der gesuchten cDNA benötigt werden. Die Intensitäten der Banden des Tumor- und Normalgewebes können anschließend entweder in einem Agarosegel miteinander verglichen und abgeschätzt oder mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers der Firma Agilent Technologies (Waldbronn) quantifiziert werden. Im allgemeinen werden bestimmte Haushaltsgene wie β -Actin oder G3PDH zur Normalisierung der Proben herangezogen, d.h. die Menge der eingesetzten cDNA richtet sich nach den Intensitäten der Signale nach PCR. Sind die Signale in beiden Ansätzen vergleichbar, kann in der Regel davon ausgegangen werden, daß die Mengen der eingesetzten Matrizen gleich sind. Im unserem speziellen Fall war eine Normalisierung der cDNA-Mengen aus Tumor- und Normalgewebe nicht möglich, da bislang kein Gen gefunden wurde, bei dem mit Sicherheit die Mengen der exprimierten Haushaltsgene gleich sind. Insofern war zunächst die Bestimmung der äquivalenten Mengen an cDNA problematisch. In einigen anderen Fällen wird über die Gesamt-RNA normalisiert, wobei die Signalintensitäten verschiedener Gewebe auf einem Agarosegel miteinander verglichen werden. Da in unserem Fall die RNA-Mengen extrem niedrig waren, kam auch diese Möglichkeit nicht in Betracht. Prinzipiell lag jedoch das Ergebnis eines solchen Vergleichs auf cDNA-Ebene durch die DD-Gele vor. Daraus konnte geschlossen werden, daß keine Normalisierung über Haushaltsgene erforderlich war, wenn die Proben im gleichen Verhältnis wie bei der DD-PCR eingesetzt wurden.

Drei der interessantesten Proben wurden durch PCR mit cDNA mehrerer Patientinnen und Ovarialkarzinomzelllinien auf differentielle Expression hin untersucht und mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer quantitativ ausgewertet. Ein Beispiel für die Auswertung ist in Abb.: 4.11 zu sehen. Dabei handelt es sich um das Fragment 26C/C9/2, das ursprünglich in Patientin 26 und 18 im Tumorgewebe mit dem Ankerprimer C und dem Arbitraryprimer 9 amplifiziert wurde.

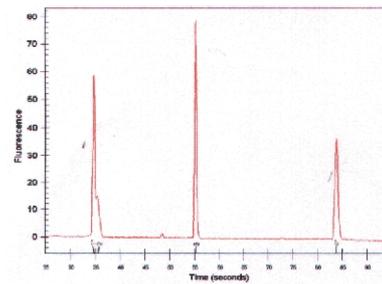


P18N 22 Zyklen



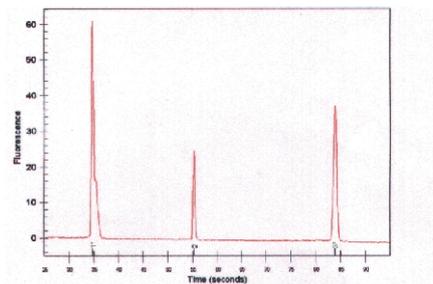
Peak	Mig. Time(sec)	Area	Size(BP)	Conc.(ng/ul)	Molarity(nmol/l)
1 - Lower	34.75	27.22	50	8.3	261.51
2	55.25	10.28	436	1.5	5.30
3	55.25	2.63	436	0.36	1.27
4 - Upper	83.65	26.95	10390	4.2	0.61

P18C 22 Zyklen



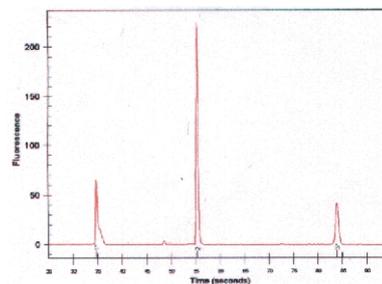
Peak	Mig. Time(sec)	Area	Size(BP)	Conc.(ng/ul)	Molarity(nmol/l)
1 - Lower	34.75	28.03	50	8.3	261.51
2	55.25	6.88	436	3.4	83.22
3	55.25	33.56	436	5.0	17.26
4 - Upper	83.65	27.15	10390	4.2	0.61

P18N 24 Zyklen



Peak	Mig. Time(sec)	Area	Size(BP)	Conc.(ng/ul)	Molarity(nmol/l)
1 - Lower	34.75	30.50	50	8.3	261.51
2	55.25	10.28	436	1.5	5.30
3 - Upper	83.65	27.06	10390	4.2	0.61

P18C 24 Zyklen



Peak	Mig. Time(sec)	Area	Size(BP)	Conc.(ng/ul)	Molarity(nmol/l)
1 - Lower	34.75	30.33	50	8.3	261.51
2	55.30	93.87	437	13.1	45.44
3 - Upper	83.65	28.71	10390	4.2	0.61

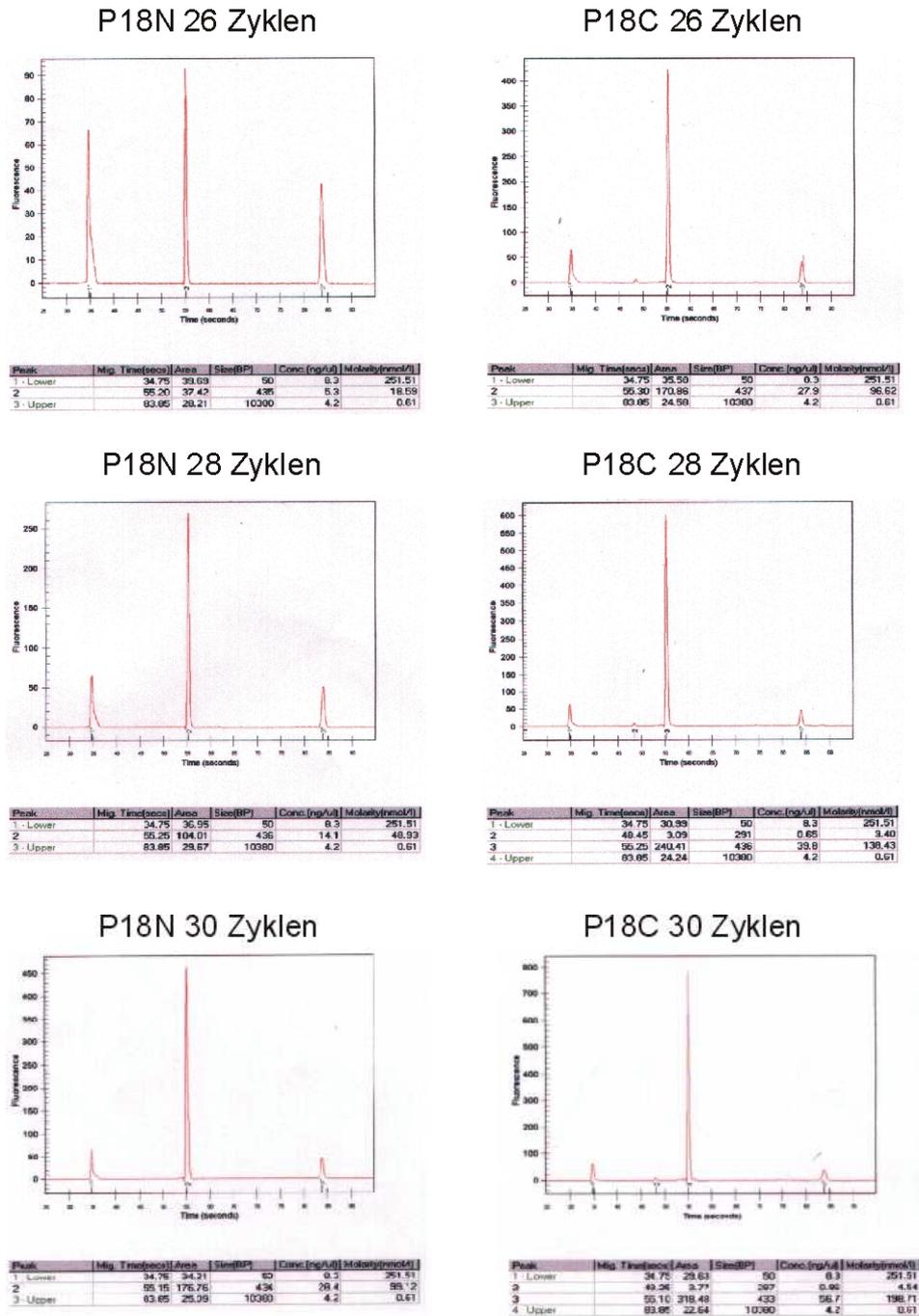


Abb.: 4.11 Quantitative PCR zur Verifizierung der differentiellen Expression von 26C/C9/2.

In der Mitte oben ist ein virtuelles Gel (siehe Kapitel 3.20) mit den PCR-Produkten des 26C/C9/2-Fragments dargestellt. Erwartungsgemäß wies die „Normalprobe“ von Patientin 18 (18N) in den vergleichbaren Zyklen zur „Tumorprobe“ (18C) ein deutlich schwächeres Signal auf. Die zur Quantifizierung herangezogenen Werte sind unter den „Peak-Abbildungen“ aufgeführt.

Neben einem virtuellen Gel lieferte das Gerät Daten zur Größe der Fragmente und zur Konzentration, die für die Berechnung von Expressionsunterschieden herangezogen werden können (siehe Tab.: 4.2).

Anzahl der Zyklen	Konzentration des vermehrten Fragments in der „Normalprobe“ von Patientin 18 (18N)	Konzentration des vermehrten Fragments in der „Tumorprobe“ von Patientin 18 (18C)	berechnetes Verhältnis von „Tumor“- zu „Normalprobe“
22	0,36 ng/µl	5,00 ng/µl	14
24	1,50 ng/µl	13,10 ng/µl	8,7
26	5,30 ng/µl	27,90 ng/µl	5,3
28	14,10 ng/µl	39,80 ng/µl	2,8
30	28,40 ng/µl	56,70 ng/µl	2,0

Tab.: 4.2 Berechnung der Expressionsunterschiede des Fragments 26C/C9/2 aus Geweben von Patientin 18.

Wie erwartet, nahm die Konzentration der cDNA mit steigender Zyklenzahl zu, wobei in der „Normalprobe“ eine exponentielle Zunahme bis zu etwa 5 ng/µl zu verzeichnen war. Anschließend wurde die Konzentration der Fragmente nur noch verdoppelt, was auf das allmähliche Erreichen der Plateau-Phase hindeutete. Diese Beobachtung konnte nicht durch die Daten der „Tumorprobe“ unterstützt werden, da bereits im 22. Zyklus 5 ng/µl erreicht waren. Bei dieser Zyklenanzahl konnten auch die größten Unterschiede zwischen beiden Proben ermittelt werden. Die Konzentration des Amplifikats war in der „Tumorprobe“ um etwa das 14fache erhöht und verifizierte damit die Ergebnisse der Differential Display PCR, die mit den Proben von Patientin 18 erzielt wurden (vergleiche Kapitel 4.5.6).

Die Ergebnisse der quantitativen PCRs mit den drei Fragmenten 26C/C9/2, 26C/G8/2 und 26C/G10/1 sind in Tab.: 4.3 zusammengestellt.

a)	Patientin 18 [T : N]	Patientin 24 [T : N]	Patientin 26 [T : N]	Patientin 30 [T : N]	Patientin 31 [T : N]	Patientin 46 [T : N]	Patientin 48 [T : N]
26C/C9/2	14	1,0	1,0	1,9	1,0	5,0	1,0
26C/G8/2			9,3		9,9		
26C/G10/1	10			2,5	3,3	1,0	1,0

b)	Expressionsspiegel der Fragmente in Ovarialkarzinomzelllinien								
	Zyklen	GG	ES-2	HEST	MDAH 2774	SK-OV-3	MT	NIH: OVCAR-3	Caov-3
26C/C9/2	31	1,6	1,8	1,4	4,0	3,5	4,6	7,0	4,8
26C/G8/2	31	1,5	1,0	5,9	0,8	6,6	5,5	3,5	1,5
26C/G10/1	28	2,3	2,0	2,2	2,4	3,7	2,5	7,5	5,5

Tab.: 4.3 Ergebnisse der quantitativen PCRs der Fragmente 26C/C9/2, 26C/G8/2 und 26C/G10/1.
 Die quantitativen PCRs dienen der Verifizierung der DD-PCR. a) Aufgelistet sind die Verhältnisse von Tumor- zu Normal-cDNA aus den Geweben von Patientin 18, 24, 26, 30, 31, 46 und 48. Leere Felder kennzeichnen nicht durchgeführte PCRs. Grund dafür war mangelnde cDNA aus Gewebeproben. b) Bei dem Fragment 26C/C9/2 ist der größte Unterschied (5fach) zwischen den Ovarialkarzinomzelllinien HEST und NIH:OVCAR-3 zu verzeichnen. Zwischen MDAH2774 und SK-OV-3 liegt ein etwa 8,3facher Unterschied in der Expression des Fragments 26C/G8/2 vor. Der Expressionsspiegel von 26C/G10/1 ist in den Zelllinien GG, ES-2, HEST, MDAH2774 und MT etwa gleich hoch. Dagegen ist die Expression in SK-OV-3 leicht erhöht, in Caov-3 ist sie doppelt und in NIH:OVCAE3 ist sie 3fach so hoch.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der DD-PCR konnte kein Expressionsunterschied bei dem Fragment 26C/C9/2 in Geweben von Patientin 26 festgestellt werden. Bei Patientin 18, bei der dieses Fragment ebenfalls im Vorfeld in einer DD-PCR auffällig geworden war, ließ sich der Unterschied anhand der quantitativen PCR bestätigen. Ebenso wiesen die Gewebeproben von Patientin 30 und 46 veränderte Expressionen bezüglich 26C/C9/2 auf, so daß ich im weiteren Verlauf Daten über dieses Fragment sammelte (siehe Kapitel 4.7). Das Interesse an diesem Fragment verstärkte sich nach Durchführung weiterer PCRs mit Ovarialkarzinomzelllinien, bei denen ebenfalls Unterschiede bezüglich 26C/C9/2 auftraten. Der deutlichste Unterschied bestand zwischen den Zelllinien HEST und NIH:OVCAR-3 (5fach). Hintergrund für die Untersuchungen der Expression der Zelllinien ist zum einen das Interesse an dem spezifischen, im Patientengewebe gefundenen Unterschied (wird die Matrize in allen Zelllinien exprimiert?), zum anderen ist es aber auch der Versuch, ermittelte Unterschiede mit einem bestimmten Tumortyp zu korrelieren. Dies würde es ermöglichen die Tumoren einer Kategorie zuzuordnen und damit evtl. die Medikamentation der Patienten zu optimieren. Um eine solche Typisierung vornehmen zu können, müssen die Hintergrunddaten der verwendeten Zelllinien zugänglich sein. Dazu zählen beispielsweise, welcher Art der Tumorbefall war, ob er stark oder schwach metastasierte, welche Organe betroffen waren und ähnliches. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu den bei ATCC erworbenen Zelllinien auch Zelllinien aus der Universitätsfrauenklinik Heidelberg, die dort aus Ascites von Patientinnen mit Ovarialkarzinom gewonnen und kultiviert wurden, untersucht. Bisher liegen unserer Arbeitsgruppe allerdings noch zu wenige Daten vor, um eine eventuelle Korrelation herzustellen.

Deutliche Unterschiede in der quantitativen PCR waren auch bei Fragment 26C/G8/2 zwischen dem normalen Tubenepithel und dem veränderten Ovargewebe bei Patientin 26 und 31 zu erkennen. Dieses Ergebnis bestätigte die in der DD-PCR gewonnenen Erkenntnisse, bei der in den Patientinnen 26 und 31 Unterschiede entdeckt wurden. Laut quantitativer PCR handelte es sich um Expressionsunterschiede in einem Bereich von einer Größenordnung (Faktor 10), weshalb wie bei 26C/C9/2 weiterführende Versuche gemacht wurden (siehe Kapitel 4.8). Auch bei 26C/G8/2 lagen deutliche Unterschiede zwischen den Zelllinien vor. Die Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 besaß eine ca. 9fach höhere Expression als die Zelllinie MDAH2774.

Bei Patientin 31, bei der wie in Patientin 26 ein Unterschied in 26C/G10/1 mit Hilfe einer DD-PCR ermittelt worden war, lagen noch ausreichende cDNA-Mengen vor, so daß die Überprüfung der Expression des Fragments 26C/G10/1 durch eine quantitative PCR erfolgen konnte. Diese ergab eine etwa 3fach höhere Expression in der „Tumorprobe“, als dies bei der Referenz der Fall war. Analog dieses Ergebnisses konnten in der cDNA von Patientin 18 und 30 Unterschiede ermittelt werden. Diese betragen im Vergleich mit den Referenzen das 10- bzw. das 2,5fache. Die Zelllinie NIH:OVCAR3 wies im Gegensatz zu der Mehrzahl der übrigen Zelllinien (GG, ES-2, HEST, MDAH2774 und MT) eine 3fach höhere Expression auf. Aufgrund der Tatsache, daß sich von 25 erfolgreich klonierten Fragmenten nur ein Teil als tatsächlich stärker differentiell exprimiert erwies, es sich also in den anderen Fällen um falsch positive Klone handelte, wurde von mir in Abstimmung mit Dr. Hans-Peter Zimmermann der Versuch unternommen, die Methode des bis dato angewandten Differential Display zu modifizieren. Ziel der Modifizierung war, die Anzahl der falsch positiven Klone zu vermindern. Zusätzlich sollte die Modifikation eine Verlängerung der cDNA-Fragmente und eine Verminderung der Anker-Anker geprägten Banden bewirken.

4.6 Modifikation der Differential Display-Methode

Über die Optimierungsversuche der Methode des Differential Displays existierten zu diesem Zeitpunkt zahlreiche Artikel, wovon einige ausgewählte Ansatzpunkte zur Verbesserung der Methode als Anregung übernommen wurden. Dazu gehörten beispielsweise die Überprüfung der Vollständigkeit der DNA-Hydrolyse (*Liang et al., 1994*) sowie die Veränderung der Bedingungen der reversen Transkription und der DD-PCR (*von der Kammer et al., 1999; Linskens et al. 1998; Liang, 1998; Frost und Guggenheim 1999*).

Im Einzelnen wurden wichtige Teilschritte der Differential Display Methode auf ihre Zielsetzung, den theoretischen Ansatz der Arbeitsschritte und den bei der Etablierung der Methoden zugrundeliegenden Annahmen überprüft. Anschließend wurde das Vorgehen im Detail den speziellen Rahmenbedingungen angepaßt. In Summe ergab sich ein modifiziertes

Protokoll der Durchführung des Differential Displays, das in den Kapiteln 3.6.2 und 3.8.2 beschrieben ist. Durch dieses Vorgehen werden weniger falsch positive Klone gefunden, die cDNA-Fragmente verlängert und die Zahl der Anker-Anker geprimten Banden verringert.

Die Vollständigkeit der DNA-Hydrolyse ist eine wichtige Voraussetzung, da bei unzureichender Degradation der DNA falsch positive Fragmente während der PCR entstehen. Die Überprüfung der Hydrolyse erfolgte durch das Einsetzen der Gesamt-RNA nach DNA-Verdau in die DD-PCR, ohne diese vorher revers zu transkribieren. Da auf dem DD-Gel keine Banden zu beobachten waren (Daten hier nicht gezeigt), bestand kein Handlungsbedarf bezüglich einer Veränderung der Hydrolysebedingungen.

Die Modifikation der reversen Transkription betraf ausschließlich die Primer-Konzentration der Ankerprimer, von denen zuvor 6,25 μM eingesetzt und jetzt auf 2,5 μM reduziert wurden. Diese Verminderung sollte auch die Häufigkeit der Anker-Anker geprimten cDNAs in der sich anschließenden DD-PCR verringern.

In der DD-PCR wurden zahlreiche Komponenten verändert. Hierzu zählte die beliebig gewählte Verlängerung der Anker- und der Arbitraryprimer um die Sequenzen GAATTCGCC bzw. CGTGAATTC an ihrem 5'-Ende, was den Vorteil erhöhter Annealingtemperaturen (ursprünglich 42°C, nun 55°C) und damit größerer Spezifität bei der PCR begünstigen sollte. Zusätzlich zur Erhöhung der Temperatur wurden die Elongationszeiten der unspezifischen Zyklen von 1 min auf 5 min und der spezifischen Zyklen von 30 sec auf 1 min erhöht, um eine Verlängerung der PCR-Produkte zu bewirken.

Aus dem selben Grund, wie bei der reversen Transkription, wurden die Ankerprimer-Konzentrationen von 2,5 μM auf 1 μM reduziert, die Konzentrationen der Arbitraryprimer wurden im Gegensatz dazu verdoppelt (von 0,5 μM auf 1 μM). Die Steigerung der dNTP-Konzentration um das 2,5fache sollte die Limitierung der Reaktionen wegen der längeren Elongationszeiten durch die dNTPs ausschließen. Zusätzlich wurde die Anzahl der PCR-Zyklen von 40 unspezifischen auf insgesamt 37 Zyklen (2 unspezifische und 35 spezifische) reduziert. Dies sollte ebenfalls die Spezifität erhöhen.

Die Ausschnitte von zwei DD-Gelen vor und nach Modifikation sind in Abb.: 4.12 gezeigt. Hierbei handelt es sich um den Vergleich von „Tumor“- und „Normalproben“ der Patientin 26, die mit dem Ankerprimer G und dem Arbitraryprimer 13 amplifiziert wurden (vor Modifikation) und um den Vergleich der Ovarialkarzinomzelllinien GG und MT, der in der PCR mit dem gleichen Primer angestellt wurde (nach Modifikation).

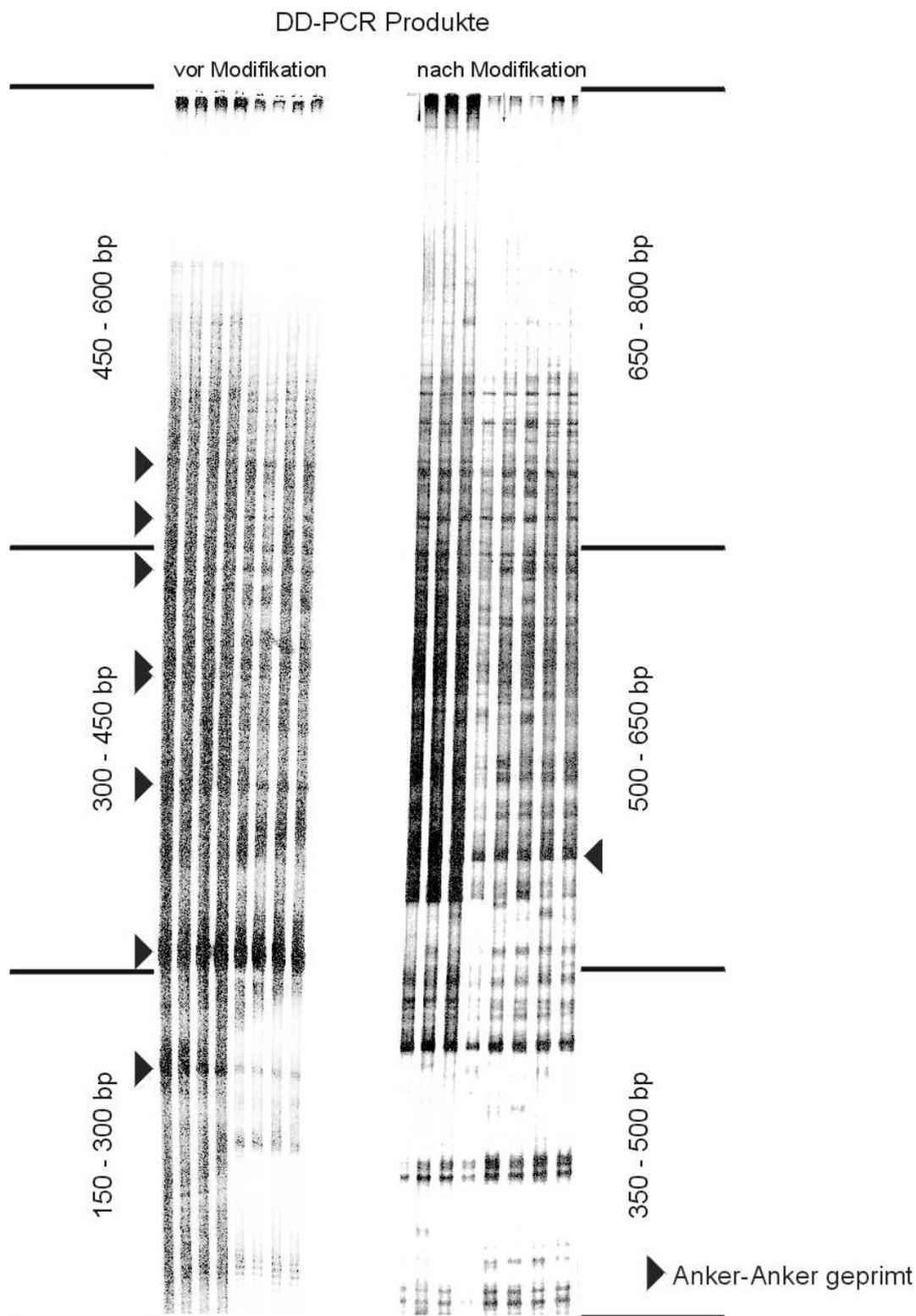


Abb.: 4.12 Vergleich der DD-PCR Produkte vor und nach Modifikation.

In dem ersten Block sind DD-PCR Produkte aus Geweben von Patientin 26 aufgetragen. Dabei handelte es sich in den Spuren 1-4 um cDNA aus „Tumor“- in den Spuren 5-8 aus „Normal“-Gewebe. Im zweiten Block wurden die DD-PCR Produkte der Zelllinie GG (Spur 1-4) und MT (Spur 5-8) aufgetragen. Anker-Anker geprinte Banden, die auf den vollständigen Gelen (hier sind nur Ausschnitte gezeigt) in allen Spuren mit verschiedenen Primerkombinationen zu sehen waren, sind mit Pfeilspitzen gekennzeichnet.

Dabei konnte auf den vollständigen Gelen als Ergebnis der durchgeführten Änderungen beobachtet werden (aus dem Ausschnitt nicht ersichtlich), daß die Anzahl der Anker/Anker geprimten Banden, die durchweg mit allen Anker-/Arbitraryprimerkombinationen auftraten, deutlich verringert werden konnten. Eine weitere Beobachtung war die Verlängerung der cDNA-Fragmente (RNA Größenmarker hier nicht abgebildet). Betrug die Größe der Fragmente im oberen Drittel der Gele mit der herkömmlichen Methode etwa 450-600 bp, so konnten nach Modifikation Fragmente mit einer Größe von 650-850 bp aus diesem Bereich ausgeschnitten werden. Dies wurde als bedeutender Fortschritt gewertet, da die differentiell exprimierten Fragmente häufig aus der 3'-UTR eines Gens stammen und die Verlängerung der Sequenz in 5'-Richtung nicht selten mit einem enormen Aufwand verbunden ist. Durch den Vergleich der beiden Ausschnitte der DD-Gele ließen sich bereits einige Veränderungen rein optisch erkennen. Darüber hinaus lag aber das Ziel der Modifikation in der Reduktion falsch positiver Klone. Um die Methode im Hinblick auf diesen Punkt zu untersuchen, wurden einige interessante Banden aus den Gelen ausgeschnitten, deren cDNA wurde eluiert, reamplifiziert und kloniert sowie zuletzt sequenziert. Mit Hilfe der semiquantitativen PCR und Northern blot Hybridisierung wurden die Expressionsunterschiede der modifizierten DD-PCR bei Zellkulturen verifiziert.

Die Experimente bestätigten, daß durch die vorgenommene Anpassung die gesteckten Ziele der modifizierten Differential Display Methode erreicht worden waren. Von insgesamt sieben Fragmenten, die in der modifizierten DD-PCR Unterschiede aufwiesen, ließen sich drei mit semiquantitativer PCR als differentiell exprimiert bestätigen. Bei den Fragmenten handelte es sich um Fibronectin, Semaphorin E/3C und ein drittes Fragment (GG/G18/1), über dessen Funktion noch nichts bekannt war und das im folgenden hier nicht weiter betrachtet wird. Die semiquantitativen PCRs mit Primern für Fibronectin und Semaphorin E/3C sind in den Abb.: 4.13 und Abb.: 4.14 dargestellt.

Bei beiden PCRs konnten deutliche Unterschiede im Hinblick auf die Signalintensitäten der Amplifikate eines Zyklus beobachtet werden. Dabei war in den höchsten Zyklen die jeweils höhere Expression in Zelllinie GG am besten zu beobachten.

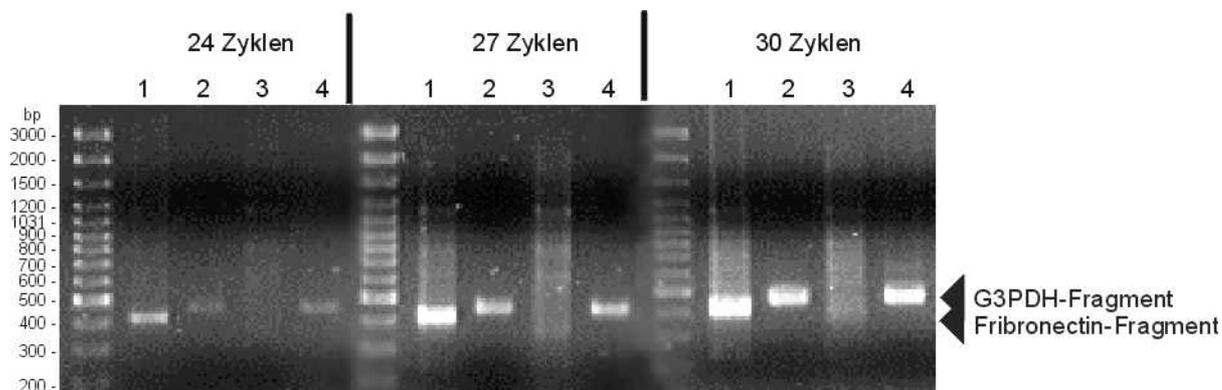


Abb.: 4.13 Überprüfung der differentiellen Expression des Fibronectin-Fragments durch eine semiquantitative PCR.

Von den Ovarialkarzinomzelllinien GG (Spuren 1 und 2) und MT (Spuren 3 und 4) wurde cDNA als Matrize für eine PCR mit den spezifischen Primern zur Amplifikation eines Fragments von Fibronectin (Spur 1 und 3) bzw. von G3PDH (Spur 2 und 4) eingesetzt. G3PDH diente bei den Ovarialkarzinomzelllinien, zusätzlich zur gelelektrophoretischen RNA-Mengen Bestimmung, der Normalisierung der eingesetzten Matrize. Das Fibronectin-Fragment lief knapp unterhalb des G3PDH-Fragments und wurde deshalb in einem gesonderten Ansatz verwendet.

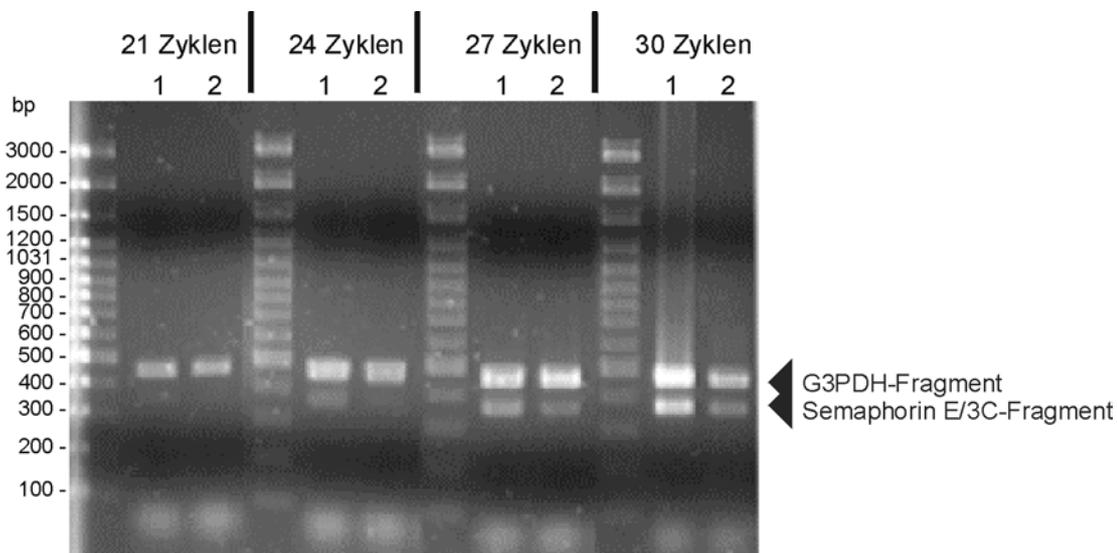


Abb.: 4.14 Überprüfung der differentiellen Expression des Semaphorin E/3C-Fragments durch eine semiquantitative PCR.

Von den Ovarialkarzinomzelllinien GG (Spurt 1) und MT (Spuren 2) wurde cDNA verwendet, die als Matrize für eine PCR mit den spezifischen Primern zur Amplifikation eines Fragments von Semaphorin E/3C und G3PDH eingesetzt wurde. G3PDH diente bei den Ovarialkarzinomzelllinien, zusätzlich zur gelelektrophoretischen RNA-Mengen-Bestimmung, der Normalisierung der eingesetzten Matrize. Das Semaphorin E/3C-Fragment läuft unterhalb des G3PDH-Fragments.

Die Expressionsunterschiede von Fibronectin und Semaphorin E/3C in den Zelllinien MT und GG konnten auch mit Northern blot Hybridisierung bestätigt werden. Dazu waren jedoch einige Vorarbeiten erforderlich. Zunächst wurde aus zahlreichen Ovarialkarzinomzelllinien RNA isoliert, die mRNA aufgereinigt und diese auf Nitrozellulosemembranen geblottet (siehe Kapitel 3.21.3). Die Normalisierung der mRNA erfolgte über den Vergleich der Signalintensitäten der mit Ethidiumbromid „angefärbten“ mRNA. Die Hybridisierungssonden von Fibronectin und Semaphorin E/3C wurden hergestellt, wie in Kapitel 3.21.1 beschrieben. Die Ergebnisse dieser Northern Blot Hybridisierungen und zusätzlicher semiquantitativer PCRs mit Ovarialkarzinomzelllinien sind in Abb.: 4.15 und Abb.: 4.16 zu sehen.

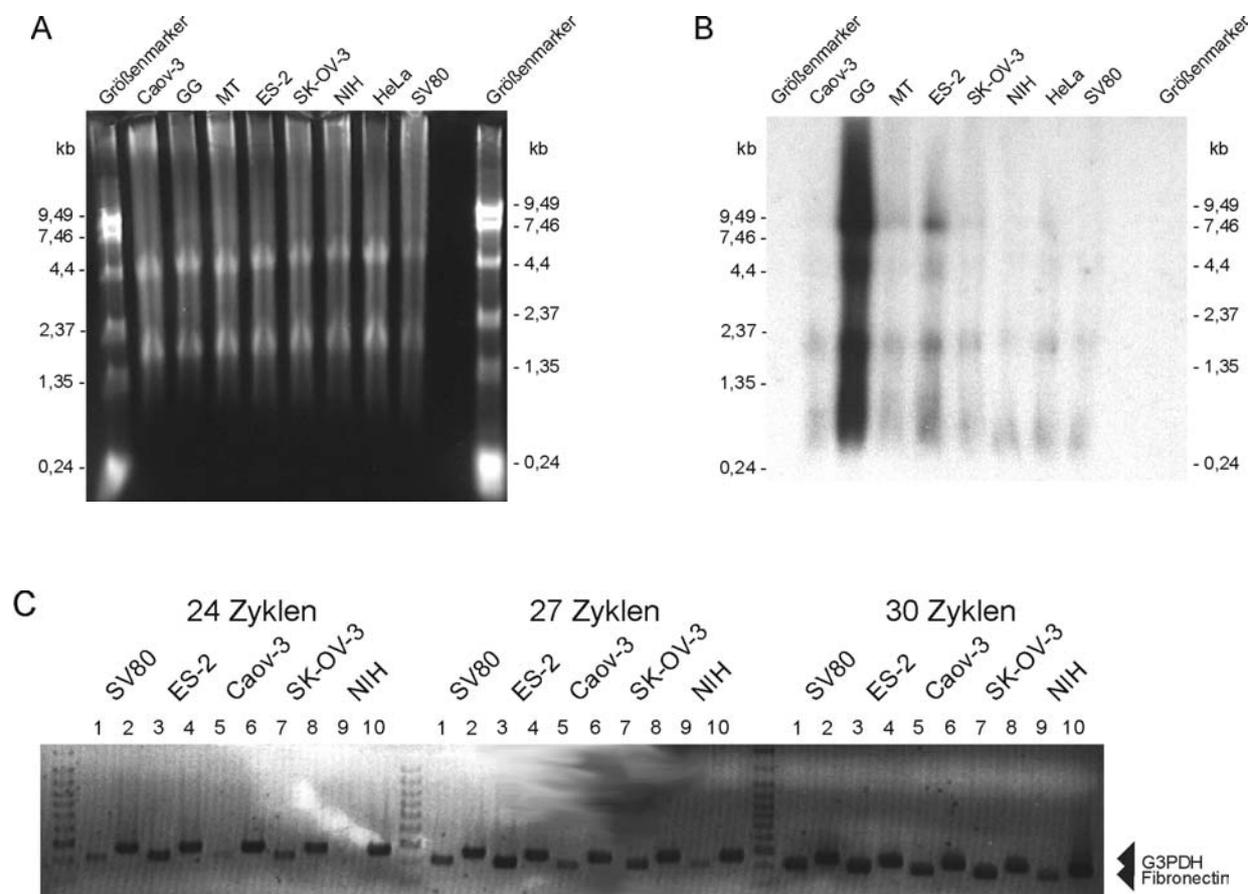


Abb.: 4.15 Verifizierung der Expressionsunterschiede von Fibronectin durch Northern Blot-Analyse mit ^{32}P -markierter Fibronectin-Sonde und sqPCR.

Jeweils 2 μg mRNA aus den aufgeführten Zelllinien befanden sich auf dem Northern Blot. Die gleichmäßige Beladung der Spuren mit mRNA ist der Darstellung (A) zu entnehmen, bei der die Nitrozellulose nach Transfer der RNA zu sehen ist. (B) Der Northern Blot wurde mit einer ^{32}P -markierten Fibronectin-Sonde inkubiert, anschließend wurde eine Autoradiographie durchgeführt (24 h Exposition). In der Darstellung sind in allen Zelllinien mehrere Transkripte nachweisbar. Dabei sind die Transkripte in Zelllinie GG deutlich stärker exprimiert als in den anderen Zelllinien. Die zusätzlichen Banden, zu der bei 8 kb erwarteten, lassen sich evtl. auf Spleißvarianten zurückführen. Eine semiquantitative PCR (C) mit den Zelllinien SV80, ES-2, Caov-3, SK-OV-3 und NIH:OVCAR-3 (NIH:OVCAR-3 als NIH abgekürzt) unterstreicht die Ergebnisse der Northern Blot-Analyse.

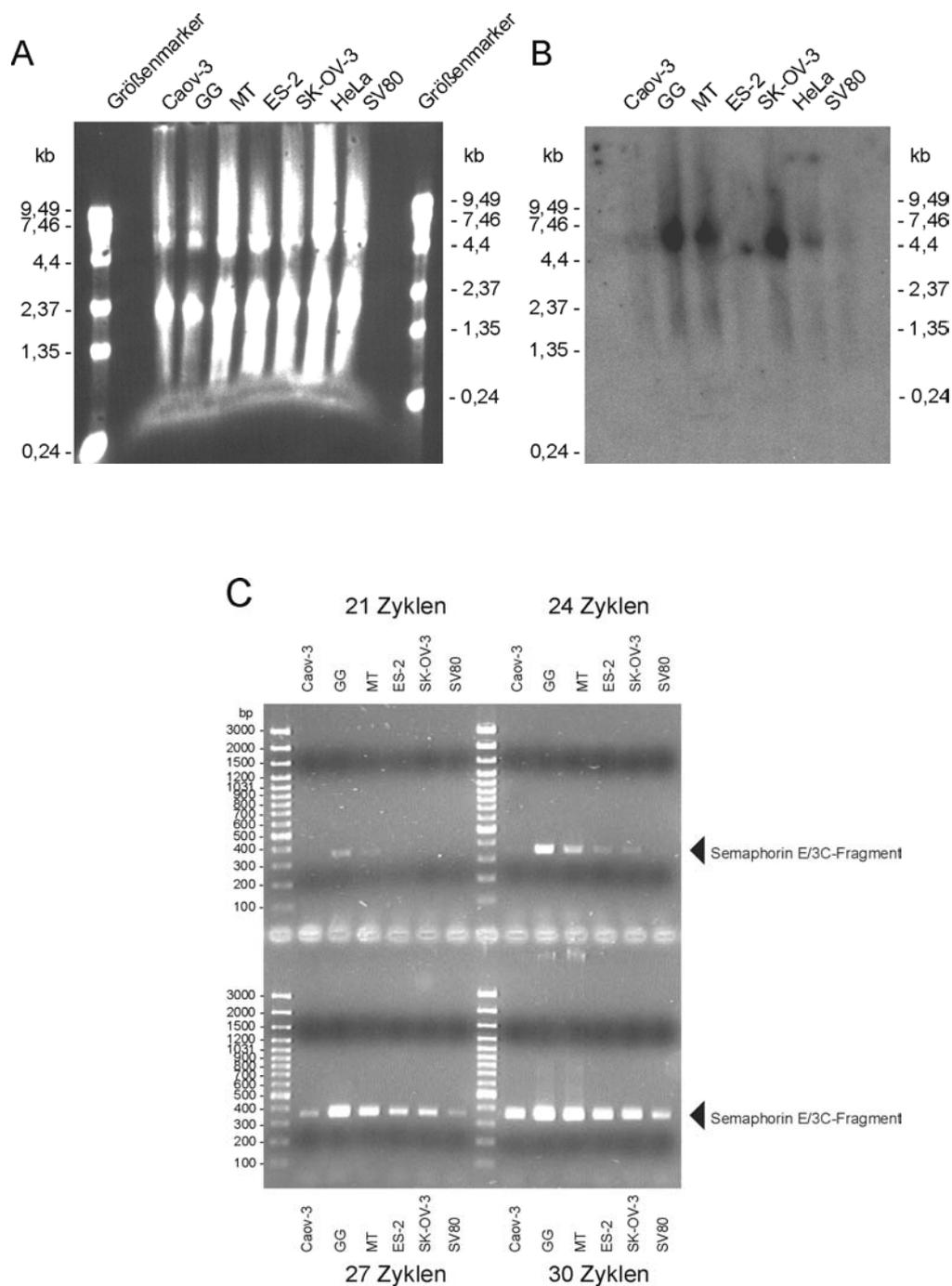


Abb.: 4.16 Verifizierung der Expressionsunterschiede von Semaphorin E/3C durch Northern Blot-Analyse mit ³²P-markierter Semaphorin E/3C-Sonde und sqPCR.

Auf den Northern Blot wurden pro Zelllinien jeweils 2 µg mRNA transferiert. Die gleichmäßige Beladung der Spuren mit mRNA ist in der Darstellung oben links zu sehen (A). Sie zeigt die Nitrozellulose nach Transfer der RNA. Der Northern Blot wurde mit einer ³²P-markierten Semaphorin E/3C-Sonde inkubiert, danach wurde ein Röntgenfilm bei -80°C für 24 h exponiert (B). In der Darstellung rechts oben ist in allen Zelllinien ein mehr oder minder deutliches Transkript bei etwa 5,5 kb nachweisbar. Dabei ist das Transkript in Zelllinie GG höher exprimiert als in Zelllinie MT. In diesen beiden Ovarialkarzinomzelllinien ist das Signal jedoch bedeutend stärker als in den anderen Zelllinien. (C) Eine semiquantitative PCR mit den Zelllinien Caov-3, GG, MT, ES-2, SK-OV-3 und SV80 unterstreicht die Ergebnisse der Northern Blot-Analyse.

Dabei wurden die Resultate von DD- und semiquantitativer PCR besonders durch die Hybridisierungsergebnisse des Fibronectin-Fragments unterstrichen. Die auf Höhe von etwa 8 kb erwartete Bande (Romberger, 1997) war in der Spur von Zelllinie GG bedeutend stärker exprimiert als in der von Zelllinie MT. Zusätzliche Banden im unteren Bereich werden evtl. auf Spleißvarianten zurückgeführt.

Werden die Signalintensitäten der weiteren Ovarialkarzinomzelllinien mit den Ergebnissen der korrespondierenden semiquantitativen PCR verglichen, so zeigt sich deutlich die Übereinstimmung zwischen Northern Blot-Analyse und semiquantitativer PCR.

Ein Vergleich der „konventionellen“ Differential Display-Methode mit der modifizierten Methode unterstreicht die Wirksamkeit der Veränderungen. Diese bestanden erstens in der Verminderung von Anker-Anker gepimten Banden, die sich in allen Primerkombinationen auf gleicher Höhe befinden. Zweitens wurden die Längen der cDNA-Fragmente durch die veränderten PCR-Bedingungen, insbesondere der Elongationszeit, erheblich vergrößert und drittens verminderte sich zumindest bei den Zelllinien (die modifizierte Methode wurde von mir nicht mehr an Patientengewebe angewandt) das Verhältnis von falsch positiven zu echten Unterschieden. Dies bedeutet, daß die modifizierte DD-PCR deutlich bessere Ergebnisse bei der Suche nach differentiell exprimierten Fragmenten bietet als die herkömmlich verwendete Differential Display Methode.

Nach Überprüfung der modifizierten Methode wurden die bereits in Kapitel 4.5.3 erwähnten Fragmente 26C/C9/2 und 26C/G8/2 weiter untersucht.

4.7 Charakterisierung von 26C/C9/2

Aufgrund der vielfachen Überexpression des Fragments 26C/C9/2 in Tumorgewebe der Ovarien der Patientinnen 18, 30 und 46 wurden weitere Experimente durchgeführt. Dazu zählten die Lokalisation des Transkripts in unterschiedlichen Geweben mittels Northern Blot-Analyse, die Ermittlung der genomischen Struktur, die Amplifikation und Expression des offenen Leserasters, die Herstellung peptidspezifischer Antikörper und die Schaffung der Voraussetzungen für die Überprüfung der Expression in den zu untersuchenden Geweben durch *in situ* Hybridisierung.

Da zu Beginn lediglich die kurze cDNA-Sequenz von 26C/C9/2 aus der DD-PCR vorlag (insgesamt 306 bp), bestand das Ziel darin, die Sequenz des offenen Leserasters zu verlängern. Eine schematische Übersicht über diese Versuche gibt Abb.: 4.21.

4.7.1 Verlängerung der Sequenz des 26C/C9/2-Transkripts durch Datenbankanalyse

Durch Datenbankanalyse konnte die cDNA zunächst in Richtung des 3'-Endes verlängert werden, so daß die bekannte Sequenz etwa 1500 bp umfaßte und ein Polyadenylierungssignal (AATAAA) sowie einen kurzen Teil des poly(A)-Schwanzes beinhaltete. Der Hauptteil dieser Sequenz wurde durch eine PCR überprüft. Dabei kamen cDNAs verschiedener Ovarialkarzinomzelllinien mit Primern, die einerseits aus der Sequenz des ursprünglichen DD-Klons stammten und andererseits aus der Sequenz, die durch Datenbankanalyse ermittelt werden konnte, zum Einsatz. Das Ergebnis dieser PCR ist in Abb.: 4.17 zu sehen. Die entsprechende Bande der Zelllinie ES-2 wurde ausgeschnitten, kloniert und sequenziert. Die Sequenz des PCR-Produkts entsprach den Erwartungen und stimmte mit der ermittelten Datenbanksequenz überein.

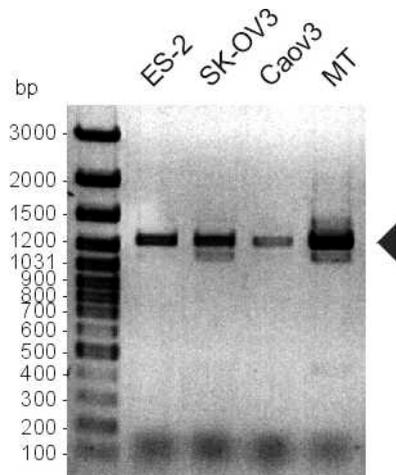


Abb.: 4.17 Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten, die der Überprüfung der hypothetischen Sequenz von 26C/C9/2 dienen.

Die cDNAs verschiedener Ovarialkarzinomzelllinien (ES-2, SK-OV3, Caov3 und MT) waren das Ausgangsmaterial für die PCR-Reaktionen, bei der die folgenden sequenzspezifischen PCR-Primer für die Reaktionen verwendet wurden: Primer 26C/C9/2-upper124 und 26C/C9/2-lower1360. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei war erwartungsgemäß in allen Spuren eine Bande bei 1260 bp zu beobachten, die hier durch einen Pfeil gekennzeichnet ist. Zusätzliche Banden in den Zelllinien SK-OV-3 und MT stammten vermutlich von alternativen Spleißvarianten.

Dieses klonierte PCR-Fragment diente als Ausgangspunkt für die folgenden Versuche:

In einer Northern Blot-Analyse wurde die Größe der messenger RNA und deren Expression in verschiedenen Geweben untersucht. Ebenso bot die zusätzliche Sequenz die Möglichkeit, das 26C/C9/2 Transkript durch RACE oder andere Methoden zu verlängern.

4.7.2 Northern Blot-Analyse

Für die Northern Blot-Analyse wurde das 1260 bp lange, klonierte PCR-Produkt, wie in Kapitel 3.21.1 beschrieben, mit α - ^{32}P -dCTP radioaktiv markiert und säulenchromatographisch aufgereinigt. In die Hybridisierungsreaktion wurden 11×10^7 cpm eingesetzt. Die Größe des Transkripts und seine Verteilung in verschiedenen humanen Geweben und Tumorzelllinien wurden mit Hilfe der kommerziell erhältlichen „H“ und „H₂“ multiple Tissue Northern Blots der Firma Clontech, Heidelberg, sowie eines selbsthergestellten RNA-Nitrozelluloseblots von Ovarialkarzinomzelllinien ermittelt. Das Ergebnis der Hybridisierungsreaktion zeigt Abb.: 4.18.

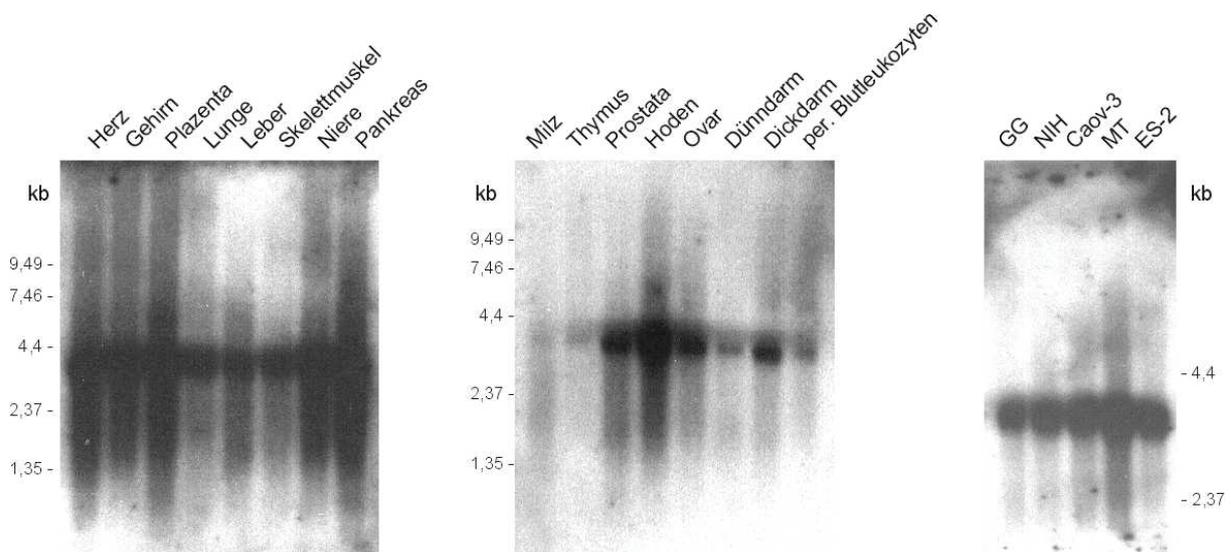


Abb.: 4.18 Hybridisierung von Northern Blots mit einer ^{32}P -markierten 26C/C9/2-Sonde.

Pro Gewebe und Ovarialkarzinomzelllinie befanden sich jeweils $2\mu\text{g}$ mRNA auf den Northern Blots. Die Northern Blots wurden mit einer α - ^{32}P -dCTP-markierten Sonde von 26C/C9/2 inkubiert, anschließend wurde eine Autoradiographie durchgeführt (48 h Exposition auf einem Röntgenfilm). In allen Geweben war ein etwa 3,2 kb großes Transkript nachweisbar. Auf dem Blot „H“ (links) waren die Signale aller Gewebe in etwa gleich stark, die Signale auf Blot „H₂“ (Mitte) in Milz, Thymus, Dünndarm und den peripheren Bluteleukozyten waren dagegen schwächer. Auch in allen verwendeten Ovarialkarzinomzelllinien konnte ein Signal bei 3,2 kb detektiert werden.

Die Northern Blot-Analyse zeigte, daß 26C/C9/2 in allen untersuchten Geweben und Ovarialkarzinomzelllinien transkribiert wird. Dabei handelte es sich um ein etwa 3,2 kb großes Transkript. Die mRNA-Menge in Milz, Thymus, Dünndarm und den peripheren Bluteleukozyten war im Gegensatz zu den meisten anderen Geweben vermindert. Auch im Ovar und dem Darm waren die mRNA-Mengen etwas geringer als in der überwiegenden Anzahl der Gewebe. Das Transkript von 26C/C9/2 konnte in allen verwendeten Ovarialkarzinomzelllinien nachgewiesen werden.

4.7.3 5'-RACE

Durch RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) und nested RACE (siehe Abb.: 4.19) mit cDNA der Marathon Ready Ovar Bibliothek und entsprechenden Primer konnte die Sequenz des Transkripts um weitere 1124 bp in 5'-Richtung verlängert werden. Das 5'-Ende des offenen Leserasters wurde jedoch durch dieses RACE nicht vervollständigt.

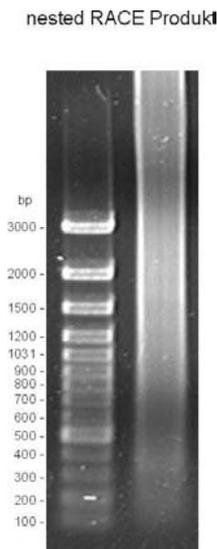


Abb.: 4.19 Gelelektrophoretische Auftrennung des nested RACE-Produkts von 26C/C9/2.

Das nested RACE-Produkt zeigt wider Erwarten keine distinkte Bande.

Die erneute Suche in den Datenbanken lieferte zusätzliche Informationen von etwa 580 bp in 5'-Richtung, wobei erst die contig-Sequenz ab Position 230 als belastbar galt, da sie durch mehrere ESTs untermauert wurde (AA451733, AI69486, AI275114; AK001521), die zudem noch mit den RACE-Klonen überlappten. Die vorderen 250 bp wurden lediglich aus den Sequenzen zweier Klone (AW408144 und AK001521) generiert.

Da auch die zusätzliche hypothetische Sequenz von 580 bp nicht ausreichend war, um das 5'-Ende des offenen Leserasters zu vervollständigen, wurden neue Primer innerhalb der hypothetischen Sequenz (an den Positionen 330-302 und 258-230) ausgewählt, mit denen weitere RACEs und nested RACEs mit Hilfe zahlreicher cDNA-Bibliotheken erfolgte. Die Ergebnisse der nested RACEs waren ausgesprochen kontrovers. Obwohl alle RACE-Produkte einen kompletten genspezifischen sowie einen vollständigen AP2-Primer besaßen, wichen die Sequenzen bereits kurz hinter dem nested Primer (in 5'-Richtung) von der hypothetischen Sequenz ab. In dem selben Maß waren auch die Sequenzen der einzelnen Klone untereinander verschieden. Wie sich herausstellte, befindet sich in dieser Region vermutlich eine Spleißstelle, bei der unterschiedlich prozessierte Templates in den cDNA-Bibliotheken vorliegen.

Mit dem Ziel, die Sequenz des offenen Leserasters von 26C/C9/2 zu vervollständigen, wurde der von mir im Arbeitskreis etablierte Phagen-Screen mit der Uni-ZapXR Ovar cDNA Bibliothek der Firma Stratagene, La Jolla, durchgeführt.

4.7.4 Phagen-Screening

Für den Phagen-Screen mit der Uni-ZAP XR Ovar Bibliothek (Stratagene, La Jolla) wurde das cDNA-Fragment, das bereits durch PCR überprüft und sequenziert war (siehe Abb.: 4.17), verwendet. Die Durchführung des Screens ist in Kapitel 3.25.2 ausführlich beschrieben.

Bei der ersten Screening-Runde konnten nach Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde und der Exposition der Filter auf einem Röntgenfilm drei Signale nachgewiesen werden (Daten hier nicht gezeigt). Die betreffenden Phagen wurden isoliert und in entsprechender Verdünnung für eine weitere Screening-Runde eingesetzt (Daten hier nicht gezeigt). Bereits nach der zweiten Screening-Runde zeichnete sich ab, daß einer der drei isolierten Phagen ein falsch positives Signal geliefert hatte. Die dritte Screening-Runde diente hauptsächlich der Vermehrung und der leichteren Isolierung der zwei verbliebenen Phagen. Ein Filter ist in Abb.: 4.20 zu sehen.

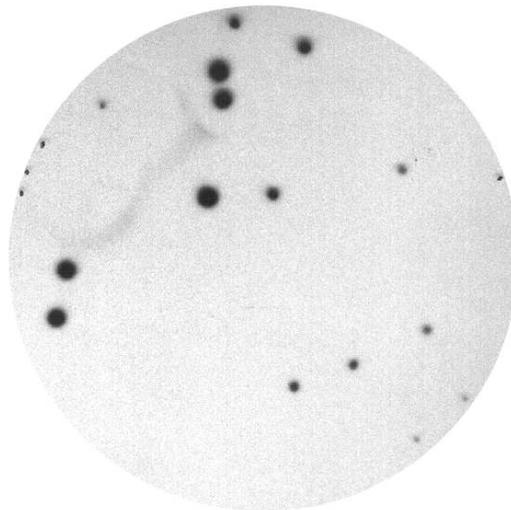


Abb.: 4.20 Nitrozellulose-Filter mit Hybridisierungssignalen nach der dritten Phagen-Screening-Runde.

Nach der Infektion von XL1-Blue MRF⁺ Wirtszellen mit einer λ -Phagen cDNA Ovarbibliothek (im Uni-ZAP XR Vektor) wurden Nitrozellulose-Filter im „Abklatschverfahren“ hergestellt und mit der radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Schwärzungen des Filters deuten auf Stellen hin, bei denen eine Hybridisierung stattfand.

Bei dem Phagen-Screen wurden letztendlich zwei positive Klone isoliert. Im Gegensatz zu den Erwartungen stellten die Sequenzen jedoch Bereiche dar, die bereits ausreichend durch RACEs abgedeckt waren. Einer der Klone besaß eine Länge von etwas über 1300 bp und stimmte mit der Region des bereits bekannten 3'-Endes überein. Der andere Klon war mit 790 bp kürzer und lag in der selben Region.

Da auch ein weiteres Screening der λ TriplEx Ovar Bibliothek mit einem cDNA-Fragment aus einem weiter 5'-Richtung gelegenen Bereich der Sequenz keine zusätzliche Sequenzinformation lieferte, sondern nur die durch RACE erhaltene bestätigte, wurde das Phagen-Screening eingestellt. Auch der Versuch, durch eine Hybridisierung mit zwei verschiedenen Blots (Ovar 370.1.101 und Testis 176.1.104) des „Resource Center of the German Human Genome Project“ (RZPD), auf die jeweils $2,7 \times 10^4$ verschiedene cDNAs transferiert waren, zusätzliche Sequenzinformation zu erhalten (Daten hier nicht gezeigt), blieben erfolglos.

4.7.5 Auswertung der RACE-Sequenzen

Wie bereits in Kapitel 4.7.3 dargelegt wurde, konnten die Sequenzen der RACEs zunächst nicht mit denen der Datenbanken in Einklang gebracht werden. Nach einer weiteren eingehenden Analyse der genomischen, ungeordneten Sequenz von RP1161E11 (AC016257) und einigen RACE-Klonen konnten jedoch Übereinstimmungen ermittelt werden. Bei den RACE-Klonen handelte es sich um drei Klone der Ovar- und um einen Klon der Testis-cDNA-Bibliothek. Mit Hilfe dieser Sequenzinformationen konnte ein 2999 bp langes Transkript erstellt werden, das einen offenen Leseraster von 1971 bp aufwies. Die Länge des Transkripts und die durch Northern Blot-Analyse ermittelten Längen waren übereinstimmend, wenn ein Poly-A Schwanz von etwa 200 bp miteingerechnet wurde.

Es wurde deutlich, daß das ursprüngliche 5'-Ende, das durch Datenbankanalyse mit Hilfe der Klone AW408144 und Ak001521 ermittelt wurde, sehr wahrscheinlich ein nichtprozessiertes Transkript darstellte. Dies würde auch die zahlreichen uneinheitlichen RACE-Produkte in dieser Region, die von mir analysiert wurden, erklären. Das Contig, das zur vollständigen Sequenz des Transkripts von 26C/C9/2 führte, ist in Abb.: 4.21, die daraus ermittelte Sequenz ist in Abb. 4.22 dargestellt.

481 | | | | | 540
GTCGGAAAAGAGGTGGCCGCGGCCCGGCGGAAGCAGCACCTCTCCTCCCTTCAGTACTAC
541 | | | | | 600
TGTGCCCTCAACGCGCTGCAGTACAGAAAGCAAATGGCCATGATGGAGCCCATGATAGGC
601 | | | | | 660
TTTGCCCATGGACAGATTAACCTTTTTTAAGAAGGGAGCAGAGATGTTTTCCAAACGTATG
661 | | | | | 720
GACAGCTTTTTATCCTCCGTTGCAGACATGGTTCAAAGCATTTCAGGTAGAACTGGAAGCC
721 | | | | | 780
GAGGCGGAAAAGATGCGGGTGTCCCAGCAAGAATTACTTTCTGTTGATGAATCTGTTTAC
781 | | | | | 840
ACTCCAGACTCTGATGTGGCCGCACCACAGATCAACAGGAACCTCATCCAGAAGGCTGGT
841 | | | | | 900
TACCTTAATCTTAGAAACAAAACAGGGCTGGTCACCACCACCTGGGAGAGGCTTTATTTC
901 | | | | | 960
TTCACCCAAGGCGGGAATCTCATGTGTCAGCCCAGGGGAGCCGTGGCTGGAGTTTGATC
961 | | | | | 1020
CAGGACCTGGACAACTGCTCAGTGATGGCCGTGGATTGCGAAGACCGGCGCTACTGCTTC
1021 | | | | | 1080
AGATCACCACGCCAATGGAAAATCGGGAATAATCCTCCAGGCTGAGAGCAGAAAAGGAAA
1081 | | | | | 1140
ATGAAGAGTGGATATGTGCAATAAACACATCTCCAGACAGATCTACCTGACCGACAACC
1141 | | | | | 1200
CTGAGGCAGTCGCGATCAAGTTGAATCAGACCGCTCTGCAAGCAGTGACTCCCATTACAA
1201 | | | | | 1260
GTTTTGAAAAAACAAGAAAGCTCATGCCCCAGCCAGAACCTGAAAAATTCAGAGATGG
1261 | | | | | 1320
AAAATGAAAATGACAAGATTGTTCCCAAAGCAACAGCCAGTCTACCTGAAGCAGAGGAGC
1321 | | | | | 1380
TGATCGCGCCTGGAACGCCGATTCAATTCGATATTGTGCTTCTGCTACAGAATTCCTTG
1381 | | | | | 1440
ATCAGAACAGAGGGAGCAGGCGTACCAACCCTTTTGGTGAAACTGAGGATGAATCATTTC
1441 | | | | | 1500
CAGAAGCAGAAGATTCTCTTTTGCAGCAGATGTTTATAGTTCGGTTTTTTGGGATCAATGG
1501 | | | | | 1560
CAGTTAAACAGACAGCACTACTGAAGTGATTTATGAAGCGATGAGACAAGTATTGGCTG
1561 | | | | | 1620
CTCGGGCTATTTCATAACATCTTCCGCATGACAGAATCCCATCTGATGGTCCACAGTCAAT
1621 | | | | | 1680
CTTTGAGGTTGATAGATCCACAGACTCAAGTATCAAGGGCCAATTTTGAACCTACCAGTG
1681 | | | | | 1740
TCACACAATTTGCTGCTCATCAAGAAAACAAGAGACTGGTTGGTTTTGTTCATCCGTGTTC
1741 | | | | | 1800
CTGAATCCACTGGAGAAGAATCTCTGAGTACATACATTTTTGAAAGCAACTCAGAAGGCG
1801 | | | | | 1860
AAAAGATATGTTATGCTATTAAAAAGAAATTATTGAGGTTTCAGAAGGATCCAGAAGCACT
1861 | | | | | 1920
GGCTCAATTAATGCTGTCCATACTAACCATAACCAATGATGGAAAATATGTACTGTAAACGA
1921 | | | | | 1980
TCAACCAGATGACGATGATGGAAAATCCAAATGAACATAGAGGCGCAGAATCCGAAGCATA
1981 | | | | | 2040
Actcacttgcgcctgtgggggaagagcaaacaggaaggagagctacctcctaagggtttt
2041 | | | | | 2100
aacgtctctgacatacaggcacactgacctgatttccgaaggctgacaatcgtttgaggga
2101 | | | | | 2160
atgtaatcttgatgccttgatactgagacttgggagggaaactaagaaatggttgacagc

```

2161      |          |          |          |          |          | 2220
gttcccacccatctacaatgttatTTTTAGGTGCTTGTGGTAAGTCTTTTTCTTAGATT
2221      |          |          |          |          |          | 2280
gCGCTAAAATTTCTTAGATTGTTcagcgcctcagaacaaaagTTTgaaaaatgcattgttc
2281      |          |          |          |          |          | 2340
atatgaatgtcatctctTTTTcagttccagtatcTTTTtaaaaaatggcaaaagcctag
2341      |          |          |          |          |          | 2400
atttacaatttgatgaacactaaatatttcttattaataatctatttttGtattttac
2401      |          |          |          |          |          | 2460
ttaatgagctttaagtgcctgtcgttctgaaaattgtgtatttataattcagcttatctc
2461      |          |          |          |          |          | 2520
aaattggacctaataagcatttcttTGTGCAGTTAGGTGACGAGCACTGCTTTGAGGCCCA
2521      |          |          |          |          |          | 2580
agcactagtagagatgcgcgatacaggtctagtttcGGTAACTGTTCCAGACATCAAGCA
2581      |          |          |          |          |          | 2640
ataaaaaaatgaataccacaaaagatgTTTgattttacagtgGAGCCTTactgaaccagc
2641      |          |          |          |          |          | 2700
attcagaagTTTaaggTcctcctaggtatgagTatttttagtagtgGATcactgtggaca
2701      |          |          |          |          |          | 2760
gggtgcagctctaccagttcctgttcttctgagccagaccctcttcagggaaagggacca
2761      |          |          |          |          |          | 2820
attaattttaaaactcacttgaagcacagctggTcatggggcTTGGTATAAAAGTTCCTAT
2821      |          |          |          |          |          | 2880
ttccaccctgatacttccaattcctggaaccccagcccactccccatccctcctcccta
2881      |          |          |          |          |          | 2940
tcaaactagTATAATgattttgaatcggtacagTgtgttTAACTGTAACTAAGTTCAACA
2941      |          |          |          |          |          | 3000
gactattattatcttTgtaataaattaacctagcAATAAAaattattctgttcttttaa
3001      | 3010
aaaaa

```

Abb. 4.22 Contig-Sequenz des Transkripts von 26C/C9/2.

Insgesamt umfaßt die ermittelte Sequenz 2999 bp. Die ursprüngliche Sequenz des 26C/C9/2 DD-PCR Produkts ist gelb unterlegt. Das Polyadenylierungssignal AATAAA ist rot, ein Teil des poly(A)-Schwanzes ist unterstrichen, der offene Leseraster ist durch Großbuchstaben gekennzeichnet. Für die Amplifikation des offenen Leserasters wurden die Primer 26C/C9/2p-endProt-u und 26C/C9/2p-Prot-l (hier fett gekennzeichnet) verwendet.

Die Amplifikation des offenen Leserasters erfolgte durch eine PCR-Reaktion. Dabei diente zunächst die cDNA der Ovar-Bibliothek als Matrize. Die verwendeten Primer lagen im Bereich des ermittelten 5'-Endes des offenen Leserasters, beginnend mit dem Start-ATG, und des 3'-Endes des offenen Leserasters. Das PCR-Produkt (hier nicht dargestellt) wurde anschließend in den pCRII Vektor (Invitrogen, Groningen/NL) kloniert und sequenziert und diente später in einem Retikulozyten-Lysat als Matrize einer in vitro-Tanskription und -Translation.

Die Überprüfung der mit Hilfe von RACE ermittelten Sequenz von 26C/C9/2 erfolgte mit den selben Primern, die bereits für die Klonierung verwendet wurden. Wie in Abb. 4.23 zu sehen ist, konnte die Expression der ermittelten Sequenz 26C/C9/2 in allen verwendeten Zelllinien nachgewiesen werden, weshalb das von mir bestimmte Transkript aller Wahrscheinlichkeit nach korrekt ist.

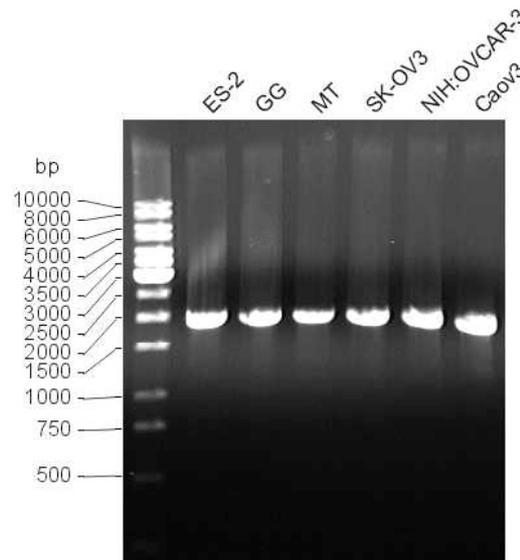


Abb. 4.23 Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von 26C/C9/2. Die PCR diente der Überprüfung der ermittelten Sequenz.

cDNAs verschiedener Ovarialkarzinomzelllinien (ES-2, GG, MT, SK-OV3, NIHOVCAR-3 und Caov3) wurden in PCR-Reaktionen eingesetzt. Hierbei wurden die folgenden sequenzspezifischen PCR-Primer für die Reaktionen verwendet Primer 26C/C9/2p-endProt-u und 26C/C9/2p-Prot-I. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei ist erwartungsgemäß in allen Spuren eine Bande bei etwa 1970 bp zu beobachten.

4.7.6 Struktur des 26C/C9/2-Gens

Durch Datenbankanalyse mit der cDNA-Sequenz von 26C/C9/2 gelang es, die gesamte Struktur des Gens anhand der sequenzierten BAC-Klone RP11-61E11 (AC016257) und RP11-781C15 (AC078874), die seit Februar bzw. April dieses Jahres in geordneter Form vorliegen, zu ermitteln (siehe Abb. 4.24). Mit Hilfe des „Electronic PCR“-Programms von NCBI konnte gezeigt werden, daß sich das Gen für 26C/C9/2 auf dem langen Arm des Chromosoms 12, genauer auf 12q23-24.1 befindet. Dabei kennzeichnen zwei „Sequence Tagged Sites“ (STSs) die Position im Chromosom. Es handelt sich um HS065YE9 (Z23320) und SHGC-130923 (G60233), die sich in Intron 8 bzw. 4 kb hinter dem terminalen Exon befinden. Das Gen besteht aus mindestens 20 Exons, wobei die Exons 2-19 Teil der beiden BAC-Klone sind, Exon 1 jedoch nur Teil von RP11-781C15 ist. Vor Ordnung der Sequenz

des Klons RP11-61E11 konnte Exon 1 auch diesem Klon zugeordnet werden (Position 36484-36572 bp). Die 5'- und 3'-Spleißstellen der Exon-Intron-Übergänge sind in Tab. 4.4 dargestellt.

Exon	Größe (bp)	Position in AC078874	cDNA Position	5'-Spleiß-Donor	Intron	Größe (kb)	3'-Spleiß-Akzeptor
1	147	26673 - 26819	1 - 147	CCAG G TATGC	1	11,4	CCAC A GAATG
2	60	38221 - 38280	148 - 207	ACAG G TAACT	2	0,6	TCTT A GAACT
3	72	38806 - 38877	208 - 279	TGAG G TAAAGA	3	5,8	TTTC A GCTTA
4	88	44631 - 44718	280 - 367	ACAG G TAAAG	4	3,0	TTTC A GAAGT
5	43	47749 - 47791	368 - 410	AAT G GTAGGC	5	0,1	TTAG A GCATG
6	57	47922 - 47978	411 - 467	GAAG G TAAAGA	6	0,8	AACC A GGTGA
7	147	48742 - 48888	468 - 614	ACAG G TAGGG	7	3,3	TTTC A GATTA
8	83	52164 - 52246	615 - 697	AAAG G TAAATG	8	4,1	CTTA A GCATT
9	159	56390 - 56548	698 - 856	GAAAG T GAGA	9	1,4	TCAC A GCAAA
10	189	57968 - 58156	857 - 1045	AATC G TATGT	10	2,1	TTTC A GGGGA
11	43	60293 - 60335	1046 - 1088	AGAG G TAAAA	11	0,1	CTAC A GTGGA
12	57	60419 - 60475	1089 - 1145	TGAG G TAAATT	12	0,1	TTTT A GGCAG
13	89	60571 - 60659	1146 - 1234	CCAG G TAACT	13	5,1	CTTC A GCCAG
14	165	65764 - 65928	1235 - 1399	GCAG G TATGG	14	0,2	CCCT A GGCGT
15	53	66095 - 66147	1400 - 1452	GAAG G TAAAGT	15	1,3	TTCC A GATTC
16	175	67472 - 67646	1453 - 1627	TGAG G TACGT	16	11,0	TTTC A G GTTG
17	37	78677 - 78713	1628 - 1664	CAAT G TAAAGT	17	0,2	CCCC A GTTTG
18	141	78923 - 79063	1665 - 1805	AAAG G TCTCT	18	0,8	TTGC A GATAT
19	48	79857 - 79904	1806 - 1853	GAAG G TAAAGA	19	1,5	CTTC A G GATC
20	1148	81492 - 82643	1854 - 2999				

Tab. 4.4 Struktur des 26C/C9/2-Gens.

Die Exongrößen variieren von 37 bp bei Exon 17 bis 1148 bp bei Exon 20. Bei Intron 5, 11 und 12 handelt es sich mit 0,1 kb um die kleinsten, mit 11,4 kb und 11,0 kb bei Intron 1 und 16 um die größten Introns des Gens. Die genomische Sequenz von 26C/C9/2 umfaßt etwa 165 kb. Die Struktur des 26C/C9/2 Gens, das zu dem Transkript von 26C/C9/2 führt, ist in Abb. 4.24 dargestellt.


```

421      |           |           |           |           |           | 480
KIVPKATASLPEAEELIAPGTPIQFDIVLPATEFLDQNRGSRRRTNPFGETEDESFPEAED
481      |           |           |           |           |           | 520
SLLQQMFIVRFLGSMVKT DSTTEVIYEAMRQVLAARAIHNI FRMTESHLMVTSQSLRLI
541      |           |           |           |           |           | 600
DPQTQVSRANFELTSVTQFAAHQENKRLVGFVIRVPESTGEESLSTYIFESNSEGEKICY
601      |           |           |           |           |           | 657
AINLGKEIIEVQKDPEAL AQLMLSIPLTNDGKYVLLNDQPDDDDGNPNEHRGAEESEA

```

Abb. 4.25 Aminosäuresequenz des 26C/C9/2-Proteins.

Die beiden Peptidsequenzen, die für die Herstellung von polyklonalen Antikörpern ausgewählt wurden, sind gelb unterlegt.

Nach Bestimmung der Aminosäuresequenz wurde nach geeigneten Regionen gesucht, auf deren Grundlage peptidspezifische Antikörper erzeugt werden konnten. Die Bereiche der hydrophilen Peptid-Epitope lagen am unmittelbaren C-Terminus bzw. im zweiten Drittel des Proteins (in Abb. 4.25 gelb unterlegt), also in einer mehrfach verifizierten Region. In Kapitel 3.26 ist die Herstellung beschrieben und die Aminosäureabfolge der verwendeten Peptide aufgelistet.

Für den Nachweis des 26C/C9/2-Proteins wurden vier Kaninchen mit insgesamt zwei verschiedenen synthetischen Peptiden, die von Dr. Pipkorn hergestellt und an Hämocyanin gekoppelt wurden, immunisiert. Das Ergebnis eines Dot-Blots, der zur Überprüfung der Kaninchenserum hergestellt wurde, ist in Abb. 4.26 gezeigt. Dazu wurden die hämocyanin- und nichtgekoppelten Peptide in unterschiedlichen Verdünnungen aufgetragen und mit den verdünnten Seren inkubiert. Die Stärke der Reaktionen, d.h. die Zunahme bei den Signalintensitäten, korrelierte mit der Anzahl der vorgenommenen Immunisierungen. Bei den gebildeten Antikörpern handelte es sich im wesentlichen um Antikörper, die nicht gegen den Träger Hämocyanin gebildet wurden, sondern gegen das gewünschte Peptid. Dies ist daran zu erkennen, daß sowohl bei den gekoppelten, als auch ungekoppelten Peptiden Reaktionen mit den Seren zu beobachten sind.

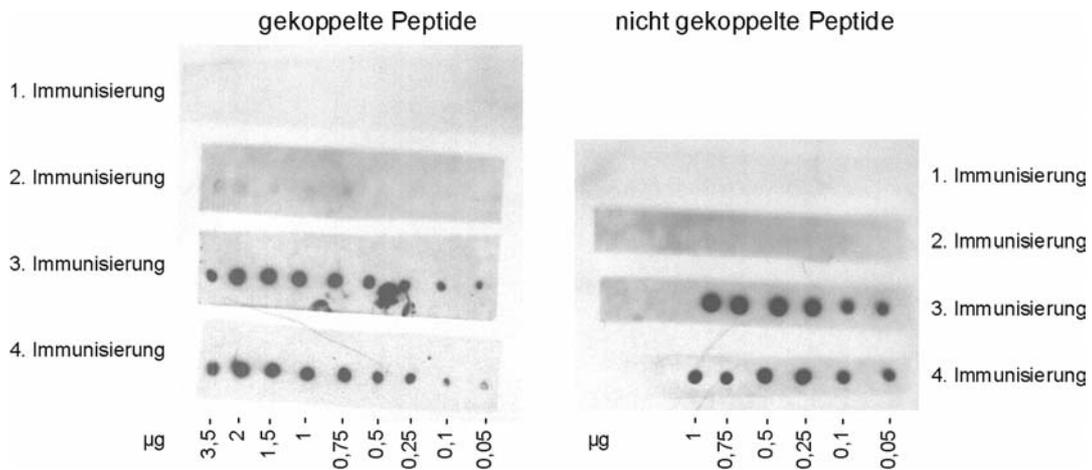


Abb. 4.26 Nachweis der Reaktivität eines peptidspezifischen Antikörpers mit dem zugrundeliegenden Peptid.

Auf die Nitrozellulosemembranen wurden gekoppelte und nicht gekoppelte Peptide in Mengen von 3,5 µg bis 0,05 µg aufgetragen. Die Membranen wurden mit 1:1000 verdünnten Seren, die nach erster, zweiter, dritter und vierter Immunisierung gewonnen wurden, inkubiert. Immunisierungen fanden nach 1, 14, 28 und 42 Tagen statt. Erst nach dritter Immunisierung sind ausreichend affine Antikörper in den Seren vorhanden um deutliche Reaktionen hervorzurufen. Danach ist selbst eine Peptidmenge von 0,05 µg nachweisbar. Die Antikörperreaktionen richten sich nicht gegen das gekoppelte Hämocyanin, sondern gegen das gewünschte Peptid.

4.7.8 in vitro Transkription und Translation von 26C/C9/2 im Retikulozyten-Lysat

Die in vitro Transkription und Translation mit Hilfe des TNT[®]-gekoppelten Retikulozyten-Lysats (Promega, Madison/USA) ermöglicht die Herstellung von RNA und die Proteinsynthese im zellfreien System. Ein Vorteil bei der Verwendung des Retikulozyten-Lysats ist in den posttranslationalen Modifikationen zu sehen, die in eukaryontischen Systemen stattfinden und die hier auch auf das Syntheseprodukt übertragen werden. Der Nachteil besteht in einer relativ geringen Proteinausbeute, die nicht für alle Anwendungen, wie beispielsweise die Herstellung von Antikörpern, ausreichend ist.

Mit Hilfe dieses Systems wurde überprüft, ob das Protein die erwartete Größe von 74 kDa besaß. Nach Klärung dieses Sachverhalts erfolgte die Bestimmung des für einen Immunblot am besten geeigneten Peptidantikörpers.

Zunächst wurde die Sequenz des offenen Leserasters von 26C/C9/2 in den Vektor pCRII kloniert und anschließend sequenziert (siehe Kapitel 4.7.5). Der pCRII Vektor besitzt sowohl einen Sp6 als auch T7-Promotor, wobei die Orientierung der 26C/C9/2 cDNA im Vektor die Verwendung des T7-Promotors erforderte. Einer der in vitro Transkriptions/Translations-Ansätze mit ³⁵S-markiertem Methionin wurde in Zusammenarbeit mit Sandra Kneiße (Abteilung Prof. Franke, DKFZ) hergestellt. Das Ergebnis einer Reaktion ist in Abb. 4.27 zu sehen.

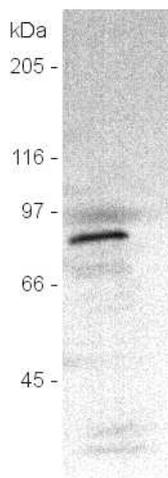


Abb. 4.27 Analyse der Größe des 26C/C9/2-Proteins.

Nach *in vitro* Transkription/Translation wurden 3 µl des Ansatzes auf einem 10%igen Kornberg SDS-PAGE aufgetrennt, Coomassie gefärbt und nach 10 min Natriumsalicylat-Bad, das der Fixierung der Banden diente, ein Film exponiert. Die Größe der signalstärksten Bande zwischen 66 und 97 kDa stimmte mit der vorhergesagten Größe von 74 kDa überein.

Dabei stimmte die Größe der signalstärksten Bande (zwischen 66 und 97 kDa) sehr gut mit dem berechneten Molekulargewicht des 26C/C9/2-Proteins von 74 kDa überein.

Aufgrund positiver Erfahrungen mit dem zellfreien RTS-System wurde der Versuch unternommen, 26C/C9/2 mit diesem System zu exprimieren.

Bevor das RTS-System zum Einsatz kommen konnte, mußte zunächst die cDNA des offenen Leserasters von 26C/C9/2 in den Vektor pIVEX2.4a umklontiert und sequenziert werden. Die Funktion des Konstrukts wurde erneut mit Hilfe des Retikulozyten-Lysats überprüft. Nach *in vitro* Transkription/Translation des offenen Leserasters von 26C/C9/2 und einer Negativkontrolle (Vektor ohne Insert) wurde ein SDS-Polyacrylamidgel mit einem Teil des Reaktionsansatzes beladen und die Proteine wurden elektrophoretisch getrennt. Nach Blotting der Proteine (siehe Kapitel 3.35) wurden diese mit PonceauS angefärbt und der Blot wurde je mit einem der vier Seren inkubiert. In Abb. 4.28 ist das Resultat abgebildet.

Zwischen den *in vitro* Transkriptions/Translations-Produkten der Negativkontrolle und Vektor inklusive 26C/C9/2 cDNA war ein deutlicher Unterschied im Bereich von etwa 80 kDa zu erkennen. Dabei handelte es sich um das exprimierte Protein von 26C/C9/2, das ein Molekulargewicht von 74 kDa besitzt. Nachdem geklärt war, daß der Vektor für die Expression geeignet ist, wurde im folgenden das RTS-System verwendet (die Ergebnisse sind hier nicht dargestellt).

Die Expression des 26C/C9/2-Proteins in Lysaten von Hela- und Ovarialkarzinomzelllinien wurde von Jürgen Kretschmer im Arbeitskreis von Prof. Ponstingl überprüft. Dabei entsprach das Molekulargewicht des Proteins in etwa der erwarteten Größe.

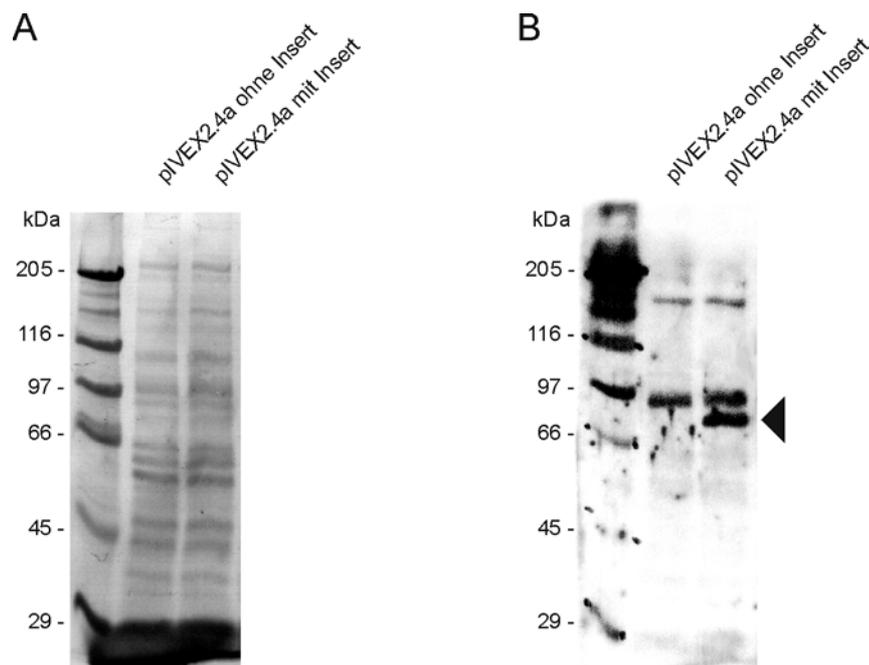


Abb. 4.28 Nachweis der in vitro Transkription und Translation von 26C/C9/2 cDNA in Vektor pIVEX2.4a.

Nach in vitro Transkription/Translation einer Negativkontrolle (pIVEX2.4a ohne Insert) und 26C/C9/2 cDNA, mittels Retikulozyten-Lysat, wurden 3 μ l Probe auf ein 10%iges Kornberg PAGE aufgetragen, die Proben elektrophoretisch getrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Der Blot wurde nach PonceauS-Färbung (A) mit einem peptidspezifischen Antikörper (24-2, weiter N-terminal gelegenes Peptid) inkubiert (B) mit dem Ziel, das Protein von 26C/C9/2 nachzuweisen. Dabei war im Gegensatz zur Negativkontrolle eine Bande bei etwa 74 kDa zu erkennen, die für die Expression des 26C/C9/2-Proteins spricht. Eine unspezifische Bande befindet sich in beiden Proben knapp oberhalb der spezifischen Bande.

4.7.9 Eigenschaften des 26C/C9/2-Proteins

Die Sekundär-Struktur von 26C/C9/2 wurde mit dem Programm Protean des DNASTAR-Pakets vorhergesagt (Abb. 4.29). Das Protein besteht demnach überwiegend aus zahlreichen α -Helices, die durch Schleifen verbunden oder von wenigen β -Faltblatt-Einheiten durchsetzt sind. Der vorhergesagte isoelektrische Punkt des Proteins liegt bei 4,79. Das Protein ist nicht membranständig und besitzt eine globuläre Struktur.

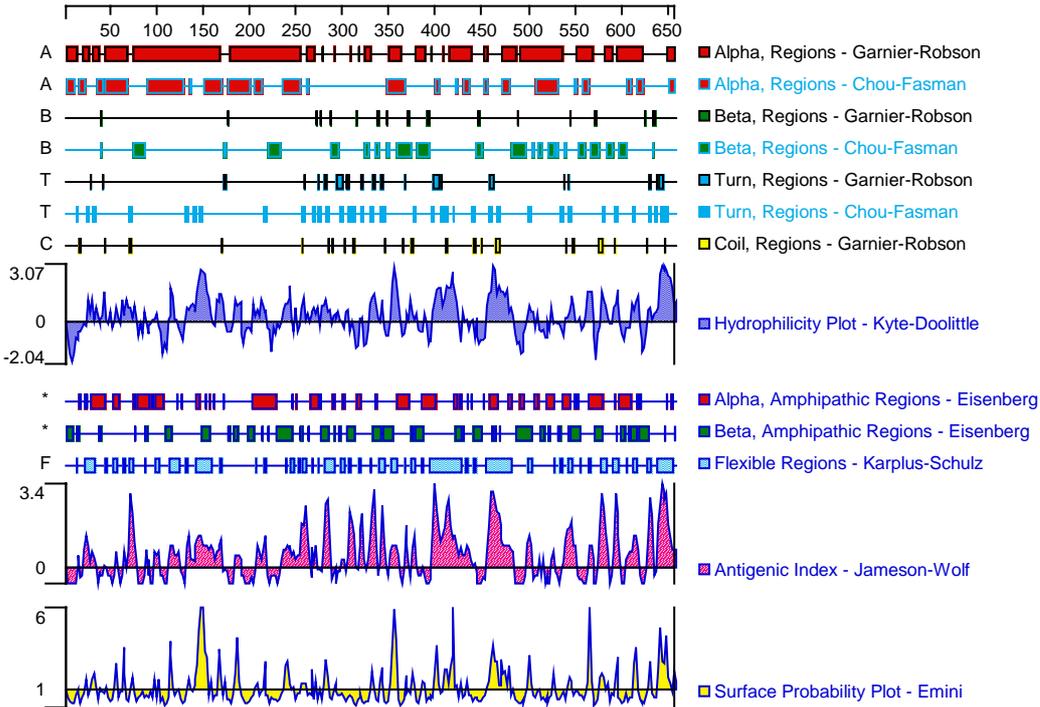


Abb. 4.29 Sekundärstruktur des 26C/C9/2-Proteins nach Vorhersage mit dem Programm Protean des DNASTAR-Pakets.

Die Datenbankrecherche mit „SMART“ (Simple Modular Architecture Research Tool des EMBL) zeigte eine pleckstrin-homologe Domäne (Position 271-370) und eine Phosphotyrosin-Bindungs-Domäne (482-615). Die Proteinstruktur ist in Abb. 4.30 dargestellt.

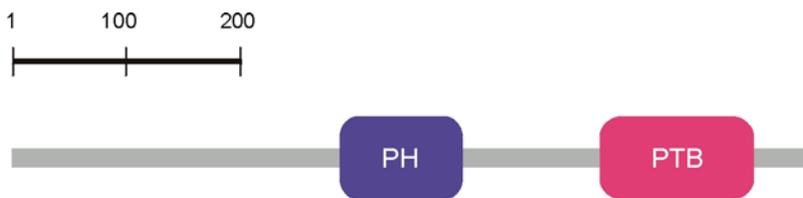


Abb. 4.30 Aufbau der Proteinstruktur des 26C/C9/2-Proteins nach Vorhersage mit dem SMART-Programm des EMBL.

Das Protein zeigt eine pleckstrin-homologe Domäne (PH, Position 271-370) und eine Phosphotyrosin-Bindungs-Domäne (PTB, 482-615).

Phosphotyrosin-Bindungs-Domänen besitzen eine ähnliche Struktur wie die Pleckstrin-homologen und IRS-1 ähnlichen PTB-Domänen. Pleckstrin-homologe Domänen werden gewöhnlich in eukaryontischen Signal-Proteinen gefunden. Die Struktur und die Funktion der Phosphotyrosin-Bindungs-Domäne und der pleckstrin-homologen Domäne werden in Kapitel 5.3.2 diskutiert.

4.7.10 Homologe Proteine zu 26C/C9/2

Bei dem Vergleich des offenen Leserasters von 26C/C9/2 mit Sequenzen der Datenbanken konnten Homologien zu teilweise bereits bekannten Proteinen ermittelt werden. Dabei weist das Adaptor Protein APPL (AF169797) mit über 60% die größte Homologie zu dem 26C/C9/2-Protein auf. Ein Vergleich der Nukleotid-Sequenz der beiden homologen Proteinen ist in Abb. 4.31 zu sehen.



Abb. 4.31 Vergleich der Nukleotidsequenz von 26C/C9/2 mit APPL.

Durch Datenbankanalyse der Nukleotidsequenz von 26C/C9/2 konnten homologe Proteine identifiziert werden. Das Protein mit der höchsten Homologie wird als APPL bezeichnet. Seine Nukleotidsequenz wurde mit der von 26C/C9/2 verglichen und stimmte zu über 60% damit überein.

4.8 Charakterisierung von 26C/G8/2

Auch das 26C/G8/2 cDNA Fragment wies einen Unterschied bei der Differential Display-PCR auf, der in einer quantitativen PCR bestätigt werden konnte. Dabei war das Fragment im Tumorgewebe des Ovars von Patientin 26 und 31 etwa um den Faktor 10 höher exprimiert als in der Referenzprobe. Aus diesem Grund bestimmte ich die genomische Struktur, das vollständige Transkript und die sich daraus ableitende Aminosäuresequenz. Ferner habe ich eine Klonierungsstrategie entwickelt, die es ermöglicht, das entsprechende Protein in zahlreichen bakteriellen- und Säugerzellen zu exprimieren. Zusätzlich erfolgte die Digoxigenin-Markierung eines cDNA-Fragments für die *in situ* Hybridisierung, damit die Überprüfung der Expression in den zu untersuchenden Geweben durchgeführt werden kann.

4.8.1 *in situ* Hybridisierung von 26C/G8/2 und 26C/C9/2

Nachdem durch quantitative PCR die Ergebnisse der Differential Display-PCR der Fragmente von 26C/C9/2 und 26C/G8/2 verifiziert worden waren, bei denen größere mRNA-Mengen in den Tumorgeweben der Ovarien als im Eileiterepithel nachgewiesen wurden, muß mit einer weiteren Methode bestimmt werden, ob diese Verhältnisse auch für Tumorgewebe der Ovarien und normales Ovariepithel zutreffen. Die einfachste Methode dafür ist die *in situ* Hybridisierung. Für die *in situ* Hybridisierung wurde von mir das Protokoll zur Digoxigenin-Markierung von DNA-Fragmenten standardisiert und auf die beiden Proben angewandt. Die Markierung der Proben ist in Kapitel 3.36 beschrieben. Ein Beispiel dafür ist in Abb. 4.32 dargestellt.

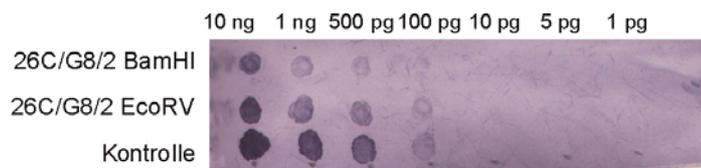


Abb. 4.32 Dot Blot zur Überprüfung der Effizienz der Digoxigenin-Markierung.

Auf die Nitrozellulose wurden die Digoxigenin-markierten sense- (26C/G8/2 EcoRV) und antisense-RNAs (26C/G8/2 BamHI) eines Fragments von 26C/G8/2 und einer gebrauchsfertigen Kontrolle (Digoxigenin-markierte antisense Neo-RNA) aufgetragen. Die Menge der RNA betrug jeweils 10 ng, 1 ng, 0,5 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, 0,005 ng und 0,001 ng. Mit dem Anti-Digoxigenin-AP Antikörper (Roche, Mannheim) erfolgte die Nachweisreaktion. In dieser Darstellung sind die Signale der Kontrolle etwas stärker als die der 26C/G8/2-Fragmente. Der Dot Blot ermöglicht die Abschätzung der Effizienz der Markierungs-Reaktion.

Da diese Durchführung der *in situ* Hybridisierung erst vor kurzem in dem Arbeitskreis von Prof. Ponstingl etabliert wurde, war es noch nicht möglich, eine komplette Hybridisierung durchzuführen.

4.8.2 Struktur des 26C/G8/2-Gens

Der größte Teil des 26C/G8/2-Gens konnte anhand der drei humanen genomischen DNA-Sequenzen der Klone RP11-464D19 (AC027018), RP11-181D18 (AC018620) und RP11-353G20 (AC021897) bestimmt werden. Aufgrund der Chromosomenlokalisierung der Klone konnte das Gen der Bande 8q13 auf dem langen Arm des Chromosoms 8 zugeordnet werden. Es besteht aus mehr als 14 Exons, wovon die Exons e1–e12 Teile des Klones RP11-464D19, Exon ey und ez Teile der Klone RP11-181D18 und RP11-353G20 sind. Zusätzlich zu dem Gen auf 8q13 befindet sich in der Chromosomenbande Xq21.31 ein Pseudogen. Dieses wird durch die Klone RP13-140E4 (AL121877) und RP13-436D9 (AL590041) repräsentiert. Die 5'- und 3'-Spleißstellen der Exon-Intron-Übergänge sowie weitere Daten zu den einzelnen Exons sind aus Tab. 4.5 zu entnehmen.

Exon	Größe (bp)	Position RP11-464D19 bzw. RP11-181D18	cDNA Position	5'-Spleiß-Donor	Intron	Größe (kb)	3'-Spleiß-Akzeptor
e1	58	168432 - 168375	1 - 58	GAAG GT AAAT	i1	7,1	TGTT AG AGGC
e2	113	161461 - 161349	59 - 171	GAAG GT AATC	i2	1,6	TTCC AG TTTT
e3	66	159942 - 159877	172 - 237	TCAG GT GAGT	i3	29,3	TTAC AG CTTC
e4	131	130755 - 130625	238 - 368	AAAG GT AAGG	i4	20,5	TCTA AG ATGT
e5	160	110406 - 110247	369 - 528	CCAG GT TATGG	i5	15,7	AAAC AG GCAG
e6	136	94834 - 94699	529 - 664	AGAG GT TTTGT	i6	56,0	TTTT AG GTAT
e7	160	39041 - 38882	665 - 824	TCAG GT GTGG	i7	1,8	ATTT AG AATG
e8	108	37372 - 37265	825 - 932	TGAG GT TATGT	i8	2,0	TAAT AG GTTA
e9	213	35546 - 35334	933 - 1145	AAAG GT AAGT	i9	10,2	TTTT AG GCCG
e10	138	25453 - 25316	1146 - 1283	GCAG GT TATTT	i10	8,7	TATC AG GTGA
e11	132	16887 - 16756	1284 - 1415	GAAG GT AAGA	i11	12,5	TTTC AG ACAG
e12	61	4421 - 4361	1416 - 1476	AAT AGT AAGT	i12	4,4	?
	308			?	?	?	TTTT AG GCAG
ey	89	95181 - 95269	1719 - 1808	AAA AGT GAGT	iy	1,1	CTTT AG ACAA
ez	1095	96418 - 97512	1809 - 2903				

Tab. 4.5 Struktur des 26C/G8/2-Gens.

Die oben genannten 5'- und 3'-Spleißstellen der Exon-Intron-Übergänge entsprechen dem konservierten Sequenzmuster. Die Organisation des Gens, das zu dem Transkript von 26C/G8/2 führt, ist in Abb. 4.33 dargestellt.

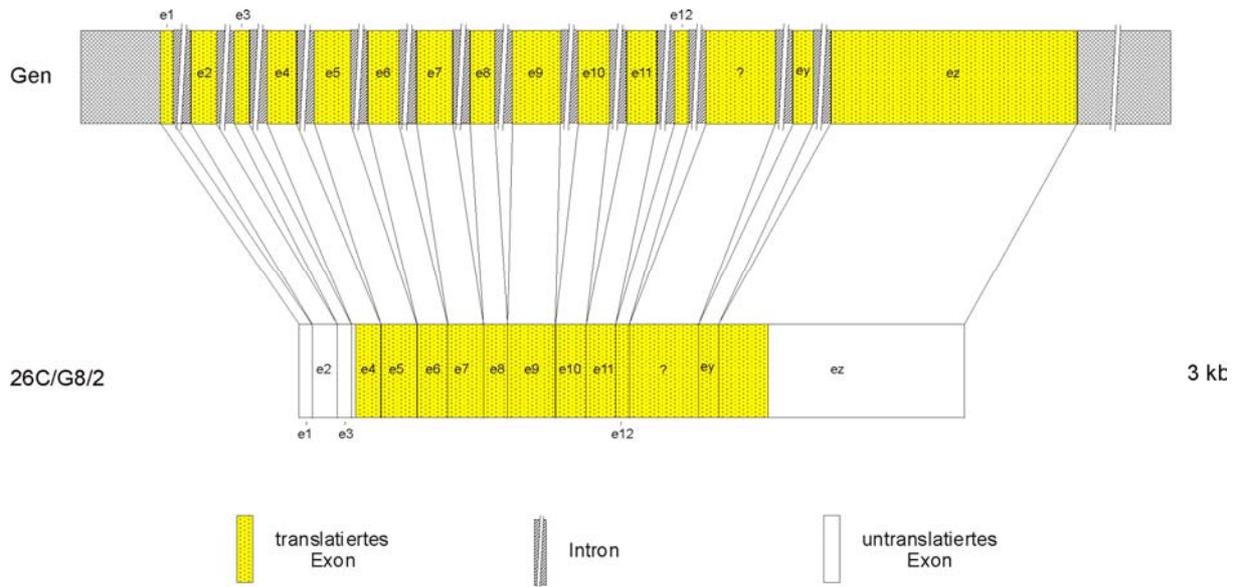


Abb. 4.33 Organisation des 26C/G8/2-Gens und seines Transkripts.

Das 26C/G8/2-Gen ist Teil der Klone RP11-464D19 (AC027018), RP11-181D18 (AC018620) und RP11-353G20 (AC021897). Aufgrund der mangelnden Sequenzüberlappung (fehlende(s) Exon(s)) zwischen Klone RP11-464D19 mit den Klonen RP11-181D18 bzw. RP11-353G20 konnte die Größe des/der Introns nicht bestimmt werden. Das Gen befindet sich in der Chromosomenbande 8q13. Ein Pseudogen konnte der Chromosomenbande Xq21.31 zugeordnet werden. Der offene Leseraster von 26C/G8/2 erstreckt sich zu etwa 20% in Exon ez hinein. Es resultiert hieraus ein Molekulargewicht von etwa 63 kDa.

Das Contig, das zur vollständigen Sequenz des Transkripts führt ist in Abb. 4.34, die daraus resultierende Sequenz ist in Abb. 4.35 dargestellt. Der ursprüngliche DD-Klon ist gelb, der offene Leseraster durch Großbuchstaben gekennzeichnet.

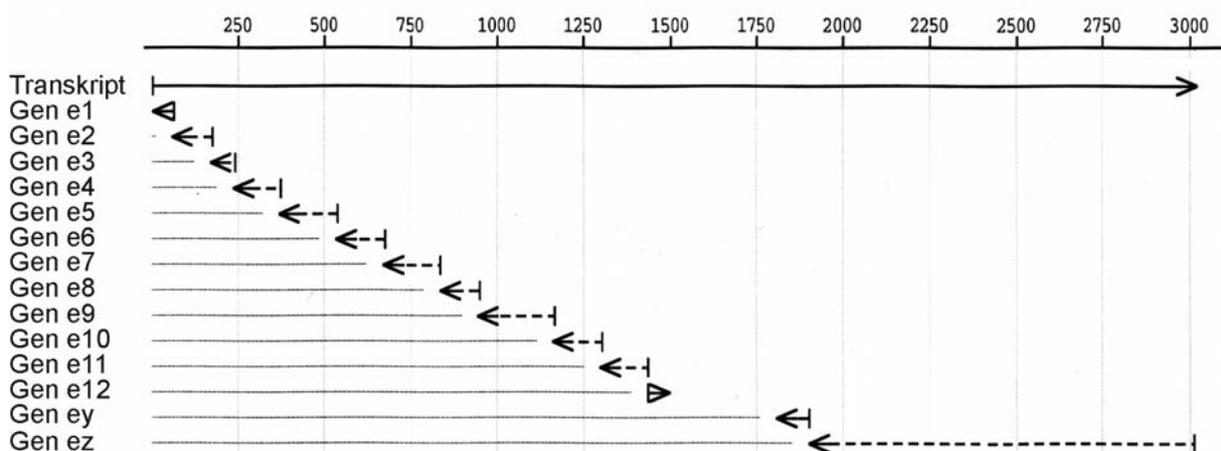


Abb. 4.34 Contig von 26C/G8/2.

Das Contig wurde mit Hilfe des Programms SeqManII des DNASTAR-Pakets erstellt.

```

1          |          |          |          |          |          | 60
agttctctgtagtggttgccaatggtggagccgtctgcaaagtgtccccggcaagaagag
61         |          |          |          |          |          | 120
gctgcctaccacaaggacttttagcttactttttaagattgaagaaaaaaaaagaagacag
121        |          |          |          |          |          | 180
aaaaagaagaactcaaagatacacaaagtaatttgaaccaaggctcagaagtttttggag
181        |          |          |          |          |          | 240
ccgtgagggatacagcagtttgggtcaatattgtcttaacatgcttcaaataaatcagctt
241        |          |          |          |          |          | 300
ctctccaagataaaaATGGCAAACCCAAAAGAGAAAAGACTGCAATGTGTCTGGTAAATGAGT
301        |          |          |          |          |          | 360
TAGCCCGTTTCAATAGAGTCCAACCCAGTATAAACTTCTGAATGAAAGAGGGCCTGCTC
361        |          |          |          |          |          | 420
ATTCAAAGATGTTCTCAGTGCAGCTGAGTCTTGGTGAGCAGACATGGGAATCCGAAGGCA
421        |          |          |          |          |          | 480
GCAGTATAAAGAAGGCTCAGCAGGCTGTTGCCAATAAAGCTTTGACTGAATCTACGCTTC
481        |          |          |          |          |          | 540
CCAAACCAGTTCAGAAGCCACCCAAAAGTAATGTTAACAATAACCCAGGCAGTATAACTC
541        |          |          |          |          |          | 600
CAACTGTGGAAGTGAATGGGCTTGCTATGAAAAGGGGAGAGCCTGCCATCTACAGGCCAT
601        |          |          |          |          |          | 660
TAGATCCAAAGCCATTCCCAAATTATAGAGCTAATTACAACCTTTCGGGGCATGTACAATC
661        |          |          |          |          |          | 720
AGAGGTATCATTGCCAGTGCCTAAGATCTTTTATGTTAGCTCACTGTAGGAAATAATG
721        |          |          |          |          |          | 780
AATTTTTTTGGGGAAGGAAAGACTCGACAAGCTGCTAGACACAATGCTGCAATGAAAGCCC
781        |          |          |          |          |          | 840
TCCAAGCACTGCAGAATGAACCTATTCCAGAAAGATCTCCTCAGAATGGTGAATCAGGAA
841        |          |          |          |          |          | 900
AGGATATGGATGATGACAAAGATGCAAATAAGTCTGAGATCAGCTTAGTGTGTTGAAATTG
901        |          |          |          |          |          | 960
CTCTGAAGCGAAATATGCCTGTGCTAGTTTTGAGGTTATTAAAGAAAGTGGACCACCACATA
961        |          |          |          |          |          | 1020
TGAAAAGCTTTGTTACTCGAGTGTGAGTAGGAGAGTTCTCTGCAGAAGGAGAAGGAAATA
1021       |          |          |          |          |          | 1080
GCAAAAAACTCTCCAAGAAGCGCGTGCAGCCACCGTCTTACAGGAGCTTAAAAAACTTC
1081      |          |          |          |          |          | 1140
CACCTCTTCCTGTGGTGGAAAAGCCAAAAGTATTTTTTAAAAAACGCCCTAAAACAATAG
1141      |          |          |          |          |          | 1200
TAAAGCCCGGACCAGAATATGGCCAAGGGATGAACCCTATTAGCCGCCTGGCGCAAATTC
1201      |          |          |          |          |          | 1260
AACAGGCCAAAAAGGAAAAGGAGCCGGATTATGTTTTGCTTTCAGAAAGAGGAATGCCTC
1261      |          |          |          |          |          | 1320
GACGTCGAGAATTTGTGATGCAGGTGAAGGTAGGCAATGAAGTTGCTACAGGAACAGGAC
1321      |          |          |          |          |          | 1380
CTAATAAAAAGATAGCCAAAAAAATGCTGCAGAAGCAATGCTGTTACAACCTGGTTATA
1381      |          |          |          |          |          | 1440
AAGCATCCACTAATCTTCAGGATCAACTTGAGAAGACAGGGGAAAACAAAGGATGGAGTG
1441      |          |          |          |          |          | 1500
GTCCAAAGCCTGGGTTTCTGAAACCAACAAATAATACTCCAAAAGGAATTCTTCATTTGT
1501      |          |          |          |          |          | 1560
CTCCTGATGTTTATCAAGAGATGGAAGCCAGCCGCCACAAAGTAATCTCTGGCACTACTC
1561      |          |          |          |          |          | 1620
TAGGCTATTTGTCACCCAAAGATATGAACCAACCTTCAAGCTCTTTCTTCAGTATATCTC

```


Durch die Bestimmung der Sequenz des offenen Leserasters von 26C/G8/2 konnte die Aminosäuresequenz des Proteins abgeleitet werden. Sie umfaßt insgesamt 570 Aminosäurereste und ist in Abb. 4.36 dargestellt.

```

1          |          |          |          |          |          | 60
MANPKEKTAMCLVNELARFNRVQPQYKLLNERGPAHSMFSVQLSLGEQTWESEGSSIKK
61          |          |          |          |          |          | 120
AQQAVANKALTESTLPKPVQKPPKSNVNNNPGSITPTVELNGLAMKRGEPAIYRPLDPKP
121         |          |          |          |          |          | 180
FPNYRANYNFRGMYNQRYHCPVPKIFYVQLTVGNNEFFGEGKTRQAARHNAAMKALQALQ
181         |          |          |          |          |          | 240
NEPIPERSPQNGESGKMDDDKDANKSEISLVFEIALKRNMPVSFEVIKESGPPHMKSFV
241         |          |          |          |          |          | 300
TRVSVGEFSAEEGNSKKLSKKRAATTVLQELKKLPPLPVVEKPKLFFKKRPKTIVKAGP
301         |          |          |          |          |          | 360
EYQGGMNPISRLAQIQQAKKEKEPDYVLLSERGMPRRREFVMQVKGNEVATGTGPNKKI
361         |          |          |          |          |          | 420
AKKNAAEAMLLQLGYKASTNLQDQLEKTGENKGWSGPKPGFPEPTNNTPKGILHLSPDVY
421         |          |          |          |          |          | 480
QEMEASRHKVISGTTLGYLSPKDMNQPSSSSFFSISPTSNSSATIARELLMNGTSSTAEAI
481         |          |          |          |          |          | 540
GLKGSSPTPPCSPVQPSKQLEYLARIQGFQAALSALKQFSEQGLDPIDGAMNIEKGSLEK
541         |          |          |          |          |          | 570
QAKHLREKADNNQAPPGSIAQDCKKNSAV

```

Abb. 4.36 Aminosäuresequenz des 26C/G8/2 Proteins.

4.8.3 Eigenschaften des 26C/G8/2-Proteins

In Abb. 4.37 ist das Ergebnis der Sekundärstrukturanalyse von 26C/G8/2 abgebildet. Das etwa 63 kDa schwere Protein weist überwiegend α -Helices auf, die mit wenigen β -Faltblattstrukturen durchsetzt sind. Es werden nur wenige aperiodische Bereiche vorhergesagt. Der theoretisch bestimmte isoelektrische Punkt liegt bei etwa 10,4. Durch Datenbankanalyse konnten keine Transmembran-Regionen oder ER-Retentionsmotive nachgewiesen werden. Laut PSORT-Analyse befindet sich das Protein wahrscheinlich im Kern.

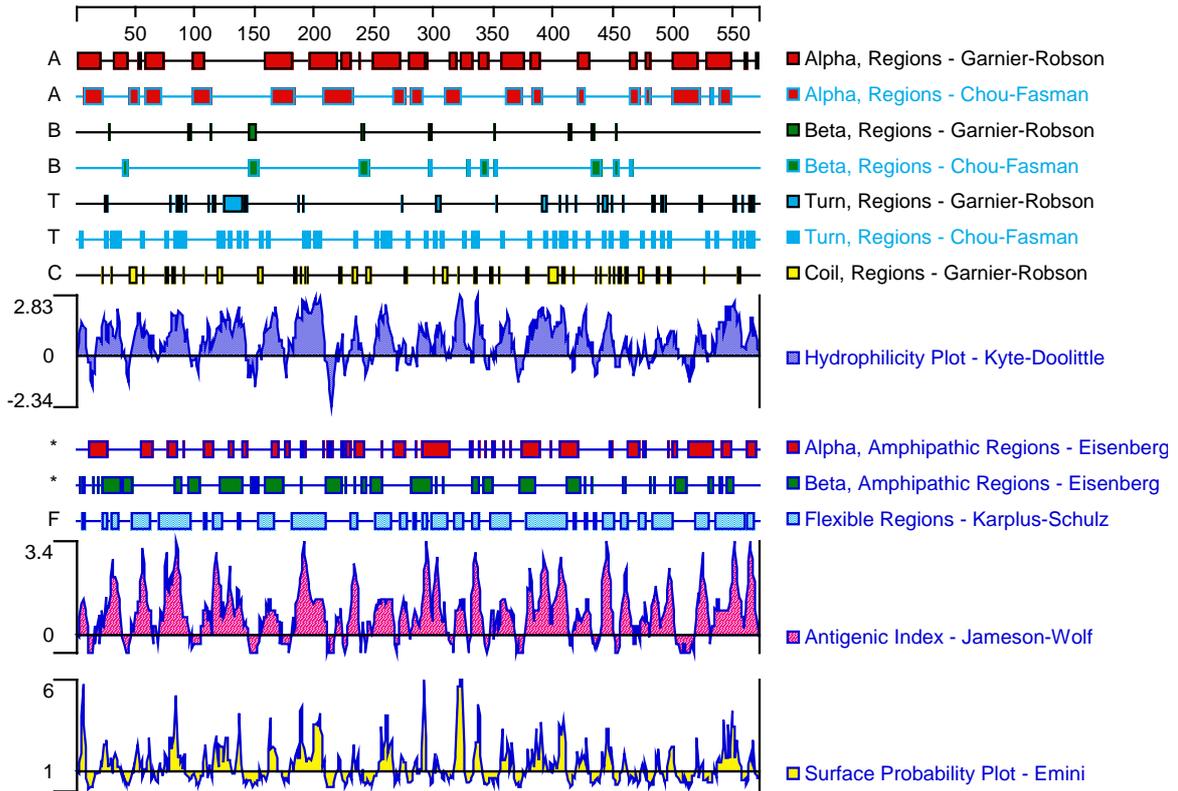


Abb. 4.37 Sekundärstruktur des 26C/G8/2-Proteins nach Vorhersage mit dem Programm Protean des DNASTAR-Pakets.

Das 26C/G8/2-Protein besitzt 4 doppelsträngige RNA Bindungs-Motive (Position 9-74, 96-180, 208-273 und 308-374). Eine Darstellung des Aufbaus des Proteins ist in Abb. 4.38 zu sehen.

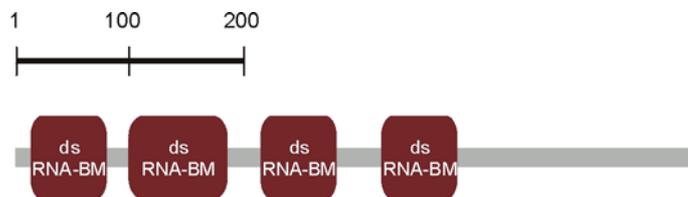


Abb. 4.38 Aufbau der Proteinstruktur des 26C/G8/2-Proteins nach Vorhersage mit SMART, einem Programm des EMBL.

Die Abkürzung dsRNA-BM steht für doppelsträngiges RNA Bindungs-Motiv.

Zahlreiche Proteine besitzen eine ähnliche Domänen-Organisation wie das 26C/G8/2-Protein. Die doppelsträngigen RNA Bindungs-Motive sind nicht nur in eukaryontischen, sondern auch in zahlreichen bakteriellen und viralen Proteinen anzutreffen. In insgesamt 70

verschiedenen Spezies sind Proteine mit dieser Domäne vertreten. Beispiele für diese Spezies sind Homo sapiens (in 56 verschiedenen Proteinen), Mus musculus, Drosophila melanogaster, Musca domestica, Caenorhabditis elegans, Arabidopsis thaliana, Saccharomyces cerevisiae, Escherichia coli und Bacillus subtilis. In Abb. 4.39 sind fünf Proteine der am nächsten verwandten Proteine zum 26C/G8/2-Protein, zu sehen. Dies sind Proteine von Drosophila melanogaster, Drosophila virilis, Homo sapiens und Musca domestica.

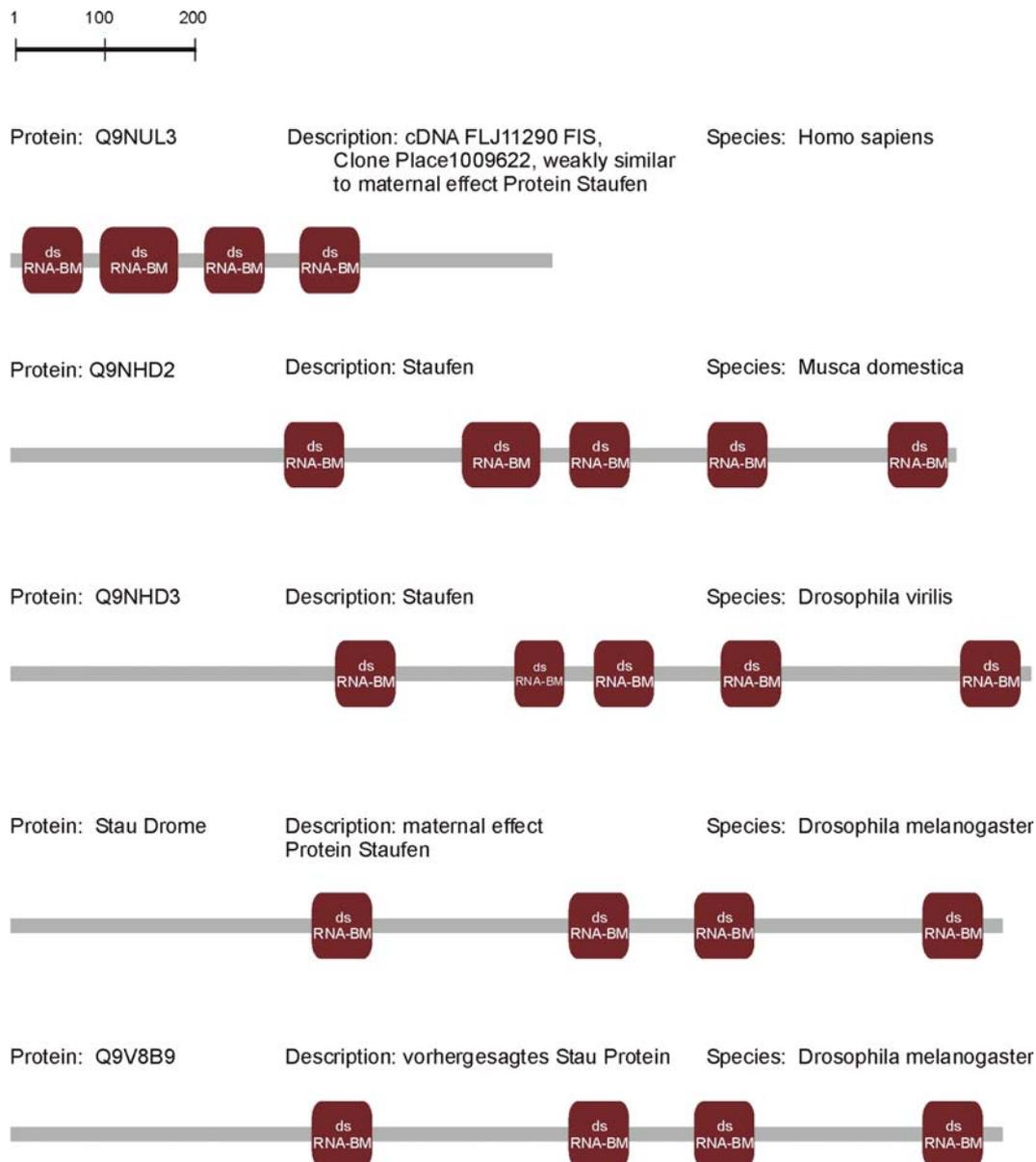


Abb. 4.39 Proteine mit Ähnlichkeiten zur Proteinstruktur von 26C/G8/2.

5 Diskussion

Eine Krebserkrankung der Ovarien führt bei den meisten Patientinnen zum Tod. Gründe dafür sind mangelnde Beschwerden der betroffenen Frauen während der Entstehungsphase des Krebses, in der eine Therapie noch relativ gute Aussichten hätte und das Fehlen von diagnostischen Markern, um die Krankheit rechtzeitig zu identifizieren, wie sie heute bereits für Cervix- oder Colonkarzinome zur Verfügung stehen.

Damit eine frühe Diagnose möglich wird und bessere Therapien angewandt werden können, muß an der Identifizierung neuer Marker gearbeitet werden. Auch diese Arbeit beschäftigt sich mit der Entstehung ovarieller Karzinome. Hierzu wurde die Veränderung des Genexpressionsmusters des Ovariepithels bei Tumoren untersucht. Die Betrachtung des Epithels ist deshalb von entscheidender Bedeutung, da die überwiegende Anzahl der Ovarialtumoren epithelialen Ursprungs sind. Im Zusammenhang mit der Asservation der Epithelien sind einige Punkte zu beachten.

5.1 Problematik der Probengewinnung und Lösungsansätze

5.1.1 Gewebe von Patientinnen

Wie bereits in Kapitel 4.1 gezeigt wurde, müssen die zu untersuchenden Gewebe eine hohe Qualität aufweisen. Kriterien für die Qualität sind die Integrität und die Reinheit der Proben. Die Integrität der Gewebe kann nur gewährleistet werden, wenn die Gewebeproben nach der operativen Entnahme unverzüglich in einen geeigneten Puffer überführt werden, um die endogene RNase-Aktivität zu minimieren. Die Reinheit der Probe muß gesichert sein, damit beim Vergleich der Gewebeexpression der Einfluß nichtepithelspezifischer Unterschiede vermieden wird.

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden durch Abstrich gewonnen. Sowohl was die Integrität als auch die Reinheit der Proben betrifft, mußten wir uns zunächst auf die Fähigkeiten und Erfahrungen unserer klinischen Kooperationspartner verlassen, da die Überprüfung dieser Kriterien unsererseits nur eingeschränkt möglich war. Es gelang, den Zustand der RNA der Tumorproben des Ovars aufgrund der RNA-Verteilung nach elektrophoretischer Trennung zu analysieren. Die Überprüfung der Integrität der RNA aus dem Tubenepithel und die Prüfung der Gewebe auf nichtepitheliale Verunreinigungen war uns jedoch nicht möglich. Der mesenchymale Anteil der Zellen konnte mit molekularbiologischen Methoden nicht abgeschätzt werden, da ich selbst nach intensiver Datenbankrecherche keinen hinreichenden Marker identifizieren konnte, der nur in der Basalschicht, nicht aber im Ovariepithel vorkommt. Der Grund dafür liegt in der

Entwicklungsgeschichte der Ovarien, bei der sich die Gonaden aus dem Coelomepithel, dem darunterliegenden Mesenchym und den primordialen Keimzellen entwickeln (Moor, 1973).

Die Untersuchung der Gewebe auf Kontaminationen durch Blutzellen gelang im Gegensatz dazu durch den Einsatz von Primern für ein CD53-Fragment zusammen mit cDNA aus den Gewebeproben. Da CD53 fast ausschließlich auf lymphatischen und myeloiden Zellen nachgewiesen werden kann, würde der Nachweis größerer Mengen an CD53 für eine Verunreinigung sprechen. Es ist dann ratsam, auf die Untersuchung solcher Gewebe zu verzichten.

Doch selbst geringe Spuren an nichtepithelialen Bestandteilen, wie sie oft nicht vermeidbar sind und auch z.B. in den Geweben von Patientin 30 vorkamen, kann zu falsch positiven Ergebnissen bei der Analyse der Genexpression führen, die durch weitere Experimente, wie z.B. die *in situ* Hybridisierung, überprüft werden müssen.

Das Problem der Gewebeverunreinigungen, das gerade im Verlauf meiner Arbeit immer deutlicher wurde, konnte durch eine geeignete Mikrodisektions-Methode gelöst werden. Seit kurzem verfügt der Arbeitskreis von Prof. Ponstingl über eine laser-gestützte Mikrodisektionsapparatur, bei der entsprechende Zellverbände aus einzelnen Gewebeschnitten herausgelöst und somit reinere Proben gewonnen werden können (siehe Kapitel 4.1). Ein Nachteil dabei besteht sicherlich in einem bedeutenden zeitlichen Mehraufwand bei der Probengewinnung, der aber in jedem Fall in Anbetracht der folgenden Schritte und der Bedeutung für das gesamte Projekt unerlässlich ist.

Große Bedeutung muß auch der Asservation der zu vergleichenden Gewebe zugemessen werden. Wie bereits in Kapitel 4.2 erwähnt, ist es uns nicht möglich, Abstriche des gesunden Ovariepithels und des Tumorgewebes des Ovars derselben Patientin zu erhalten, da das gesunde Ovar entweder nicht entnommen werden darf oder aber das Epithel durch kontinuierliche Ovulationen stark geschädigt ist. Deshalb wurde bereits vor Beginn meiner Arbeit, in Absprache mit den klinischen Kooperationspartnern, der Kompromiß eingegangen, Gewebe gleicher embryologischer Abstammung zu vergleichen. Dazu wurde das Epithel der Tube als Pendant zum Karzinomgewebe asserviert. Wie ich später jedoch feststellen konnte, weicht die embryologische Entwicklung der beiden Gewebe voneinander ab.

Die undifferenzierten Gonaden, bei denen es sich um die Vorläufer der Testis und Ovarien handelt, entwickeln sich vollständig aus dem Coelomepithel, dem sich darunter befindenden Mesenchym und den primordialen Keimzellen (Moor, 1973). Im Gegensatz dazu ist die Abstammung der Eileiter umstritten. Es gibt dazu zwei unterschiedliche Hypothesen.

Die erste besagt, daß der gesamte Eileiter vollständig vom Coelomepithel abstammt. Hierbei soll eine massive epitheliale Proliferation vom Trichter ausgehend in das darunterliegende Mesenchym hineinwandern und sich zu einer tubulären Struktur ausbilden. Die massive Spitze wird so nahe mit dem Wolffschen Gang verbunden, daß keine basale Membran beide Epithelien voneinander trennt. Laut dieser Theorie dient der Wolffsche Gang lediglich als eine „Führungshilfe“ für den Müllerschen Gang, um den Sinus urogenitalis zu erreichen (Ludwig, 1998).

Der zweiten Hypothese nach ist nur das ursprüngliche Segment des Müllerschen Gangs, das später das Infundibulum und zu einem gewissen Grad die Ampulle bildet, eine unabhängige Formation aus dem Coelomepithel. In der Gegend des Mesonephros (Urniere) fusioniert der Müllersche- mit dem Wolffschen Gang; der Wolffsche Gang schwillt zur Ampulle und zum Isthmus an. Unterhalb des caudalen Pols des Mesonephros entwickelt sich der Müllersche Gang als Auswuchs des Wolffschen Gangs und nicht länger als unabhängige Struktur.

Die zweite Hypothese, die von der Fusion von Müllerschem- mit Wolffschem Gang ausgeht, wurde von Ludwig (1998) belegt. Dazu wurden Gewebeschnitte von Embryonen unterschiedlichen Alters und Entwicklungsstadien verglichen. In Abb. 5.1 ist ein Diagramm dargestellt, das die Entwicklung des Müllerschen Gangs zeigt. Dabei entspricht der mit MD_t (grau unterlegt) gekennzeichnete Teil des Eileiters der Region, die aus dem Coelomepithel gebildet wurde. Der mit MD_w bezeichnete (nicht unterlegte) Bereich zeigt das Verschmelzungsprodukt von Wolffschem- und Müllerschem Gang.

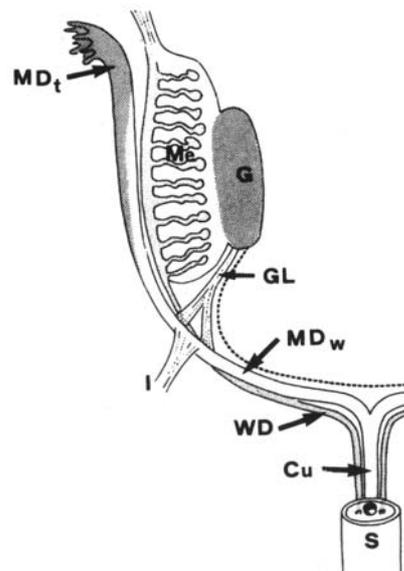


Abb. 5.1 Diagramm der Entwicklung des Müllerschen Gangs (Ludwig, 1998).

Der mit MD_t bezeichnete Bereich entwickelt sich aus dem Coelomepithel ohne die Mitwirkung des Wolffschen Gangs (WD). Der mit MD_w bezeichnete Müllersche Gang proliferiert vom Wolffschen Gang aus. Mit *Me* ist der Mesonephros, mit *G* die Gonade, mit *GL* das caudale Gonaden-Ligament, mit *I* das inguinale Ligament des Mesonephros, mit *Cu* der Canalis Uterovaginalis und mit *S* der Sinus Urogenitalis gekennzeichnet.

Für diese Hypothese sprechen nicht nur Gewebeschnitte, auch eine Krankheit, das Mayer-Rokitansky-Küster-Syndrom, das verschiedene Ausprägungen besitzt, läßt sich durch die Nichtverschmelzung beider Gänge erklären (Ludwig, 1998). Bei dieser Krankheit ist der Müllersche Gang lediglich bis zum caudalen mesonephritischen Ligament, dem runden Ligament, ausgebildet, das in einer muskulären Verdickung endet. So liegt beispielsweise beim Bilateralen MRK-Syndrom der Uterus als Rudiment vor, eine Verbindung zur Vagina fehlt (uterus bispartitus rudimentarius solidus seu partim excavatus, Vagina rudimentaria). Beim Unilateralen MRK-Syndrom ist der Uterus ausgebildet, die Verbindung besteht jedoch nur zu einem Eileiter (uterus unicornis cum cornu rudimentario, Vagina simplex).

Da die embryologische Entwicklung von Tube und Ovar voneinander abweicht, darf lediglich der oberste Teil, das Infundibulum, des Eileiters mit dem Tumorgewebe des Ovars verglichen werden.

Nur durch den Vergleich von Gewebe gleicher Abstammung kann ausgeschlossen werden, daß aufgezeigte Unterschiede nicht von vorneherein auf unterschiedlicher embryonaler Entwicklung beruhen. Damit ist als Referenzgewebe in unserem Fall das Infundibulum die geeignetste Probe für die Untersuchungen. Dies konnte experimentell bestätigt werden. So erwiesen sich die mit Differential Display untersuchten Proben aus Tumoren des Ovars und Infundibulumepithelien als sehr ähnlich. Die Genexpression von Tubenepithel und Tumorgewebe des Ovars mit den verschiedenen Primerkombinationen waren bei fast allen Banden identisch. Nur in Ausnahmefällen wurden differentiell exprimierte Gene gefunden. Die Vergleichbarkeit, speziell bei krankhafter Veränderung, wird durch Erkenntnisse untermauert, die zeigen, daß Tumoren des Ovidukts denen von Ovarien molekularbiologisch sehr ähnlich sind (Pere et al., 1998).

Da die ermittelten Genexpressionsunterschiede zwischen Tumorgewebe und Tubenepithel zwei unterschiedlich differenzierte Gewebe betreffen, müssen sie mit einer weiteren Methode, beispielsweise der *in situ* Hybridisierung, überprüft werden. Bei dieser Methode werden Gewebeproben von gesundem Ovar, bei dem fast immer auch Bereiche mit Resten des Epithels erhalten sind und Infundibulum von einer Patientin, sowie Tumorprobe einer anderen Patientin eingesetzt. Die markierten Sonden können mit den entsprechenden mRNAs aller Gewebeproben hybridisieren. Somit werden Unterschiede in der Genexpression zwischen Eileiter- und Tumorepithel, die nicht mit der Tumorentstehung in Zusammenhang stehen, sondern durch die Verwendung verschiedener Gewebetypen bedingt sind, ermittelt. Erst wenn die Ergebnisse der derzeit im Arbeitskreis durchgeführten *in situ* Hybridisierung vorliegen, sind die Daten von 26C/C9/2 und 26C/G8/2 im Zusammenhang mit der Ovarialtumorentstehung belastbar, so daß die vorliegenden Daten publiziert werden können.

Die geringen Mengen an asserviertem Gewebe der Patientinnen führten zu einer zusätzlichen Einschränkung. Üblicherweise waren die Gewebeproben des Tumors völlig ausreichend, um die Mehrzahl der Primerkombinationen anzuwenden. Limitierend waren jedoch die Zellen des normalen Tubenepithels, bei dem die Probenentnahme aus dem geschlossenen Zellverband schwierig ist. Aus diesem Grund konnten bei Patientin 26 sehr viel weniger Primerkombinationen verwendet werden, als es zu Beginn geplant war. Damit wurden die ursprünglichen Erwartungen, alle mRNAs zu erfassen, zwar nicht erfüllt, es konnten dennoch einige sehr interessante Unterschiede ermittelt und weiterverfolgt werden.

5.1.2 Primärzellkulturen

Ein völlig anderer Ansatzpunkt in der Bereitstellung von Referenzgewebe geht von Ovaroberflächenepithel selbst aus. So könnten Primärkulturen von Oberflächenepithel als alternative Referenz zur Tube verwendet werden (*Hough et al., 2001*). Diese Zellkulturen besitzen jedoch neben einem anderen Hormonstatus auch eine andere Histokompatibilität als die ursprünglichen Oberflächenepithelzellen. Selbst Haushaltgene wie G3PDH oder β -Actin, die für das Überleben der Zellen essentiell sind, weisen bei Zellkulturzellen gegenüber den ursprünglichen Zellen ein anderes Expressionsmuster auf (Daten hier nicht gezeigt). Ein weiterer Grund, der gegen die Verwendung von Primärkulturen als Referenz spricht ist, daß die Zelllinien aus Geweben verschiedener Patientinnen gewonnen wurden. Die Gewebe haben somit eine andere Vorgeschichte, die beispielsweise das Alter der Patientin oder die Therapie angeht. Aus den genannten Gründen wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Ponstingl auf die Verwendung von Primärkulturen als Referenz verzichtet.

5.2 Vor- und Nachteile der subtraktiven Hybridisierung und des Differential Displays

Für die Erfassung von Genexpressionsunterschieden zwischen zwei Zellpopulationen stehen mehrere Methoden zur Verfügung (siehe auch Kapitel 1.1.4). Dazu gehören beispielsweise die cDNA Microarrays (*Emmert-Buck et al., 1996; Welsh et al., 2001*), die subtraktive Hybridisierung (*Rouvier et al., 1993; Hubank und Schatz, 1994*) und das Differential Display (*Liang und Pardee, 1992; Liang und Pardee, 1995; Liang und Pardee, 1997*). Im Rahmen meiner Dissertation verwendete ich zwei dieser Verfahren, die subtraktive Hybridisierung mittels positiver PCR-Selektion und das Differential Display. Beide Methoden wiesen Vor- und Nachteile auf, die hier kurz gegenübergestellt werden:

Der bedeutendste Vorteil bei der subtraktiven Hybridisierung liegt darin, selbst sehr selten vorkommende mRNAs nachweisen zu können. Beim Differential Display liegt laut Literaturaussage die Nachweisgrenze um etwa den Faktor 10 höher (*Sagerström et al., 1997; Matz und Lukyanov, 1998*). Dies würde für mRNAs, die in geringer Anzahl vorliegen bedeuten, daß sie vom Differential Display im Gegensatz zur subtraktiven Hybridisierung nicht erfaßt werden und Unterschiede in der Expression unbemerkt bleiben. Eigene Erfahrungen haben jedoch gezeigt, daß dies hier nicht der Fall war (siehe hierzu Kapitel 5.3).

Ein Nachteil bei der subtraktiven Hybridisierung besteht in der Notwendigkeit, in „beide Richtungen“ subtrahieren zu müssen, damit in beiden Zellpopulationen erhöhte Mengen an mRNAs auffindig gemacht werden können. In „beide Richtungen“ subtrahieren bedeutet, daß beide Zellpopulationen sowohl einmal Tester als auch einmal Driver sein müssen. Dies ist ein deutlicher zeitlicher und materieller Mehraufwand im Gegensatz zum Differential Display, bei dem gleichzeitig auf einem Gel reprimierte und induzierte mRNAs zu erfassen sind. Ein weiterer Nachteil ist in der Unvollständigkeit der Subtraktion zu sehen. Zu viele Subtraktionsrunden wären erforderlich, um sämtliche Unterschiede komplexer Gewebe zu erfassen (*Sagerström et al., 1997*).

Vorteile des Differential Displays sind die rasche Durchführbarkeit der Methode, die geringe Menge an mRNA die benötigt wird und die Möglichkeit, gleichzeitig auf einem Gel induzierte und reprimierte mRNAs mehrerer Zellpopulationen zu identifizieren.

Nachteile sind die große Anzahl der Primer, die benötigt werden, um das Genspektrum eines Gewebes abzudecken und die Häufigkeit der falsch positiven Ergebnisse (*Callard et al., 1994*). Ursachen für falsch positive Ergebnisse können beispielsweise die PCR-Bedingungen oder eine mangelnde elektrophoretische Auftrennung unterschiedlicher cDNAs einer Bande sein.

Da nicht abzusehen war, welche Methode für unsere Zwecke die geeignete ist, testete ich zunächst die Methode der subtraktiven Hybridisierung an Ovarialkarzinomzelllinien. Die eigentliche Subtraktion konnte erfolgreich durchgeführt werden. Da dazu jedoch entgegen der Herstellerangaben mehr RNA eingesetzt werden muß, als vom Hersteller des Kits angegeben worden war, ist eine vorherige Amplifikation der cDNA aus den Patientengeweben unumgänglich. Wie in jeder PCR werden dabei einige Matrizen bevorzugt, andere nur schlecht vermehrt (*Luce and Burrows, 1998; Graf et al., 1997; Ledakis et al., 1998; von Stein et al., 1997*). Davon betroffen sind insbesondere niedrig exprimierte DNAs, was dazu führt, daß diese nach PCR in der Gesamt-DNA vermindert vorliegen. Somit ist die entstandene cDNA Population hinsichtlich der relativen Verhältnisse

der Einzelspezies zueinander mit der Ausgangspopulation nicht vergleichbar. Wird die auf diese Art bereits selektierte DNA-Population bei den subtraktiven Hybridisierungs-PCRs eingesetzt, entsprechen die Ergebnisse nicht mehr der ursprünglichen Verteilung.

Die Zweifel an der Reproduzierbarkeit der mit SMART amplifizierten DNA wurden durch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppenmitglieder bestätigt. In ihren Versuchen war die vervielfältigte DNA in einer Differential Display PCR eingesetzt worden. Aus diesen Gründen wurde auf die subtraktive Hybridisierung verzichtet und die Methode des Differential Displays gewählt.

Wie auch bei der subtraktiven Hybridisierung zeigten sich bald Unzulänglichkeiten bei dieser Methode. Einige der Probleme, wie z.B. das Vorkommen zahlreiche Anker/Anker geprimten Banden, kurze cDNA-Fragmente und viele falsch positive Klone konnte ich durch Modifikationen der Methode spürbar verbessern (siehe Kapitel 4.6).

Andere Schwierigkeiten blieben nach wie vor bestehen. Dazu zählt beispielsweise die Zuordnung eines Fragments zu einem Unterschied in dem DD-PAGE, wenn mehrere Fragmente gleicher Größe existieren. Hier bleibt nur die Möglichkeit, die sequenzierten Inserts in Gruppen einzuteilen und alle Gruppen über eine semiquantitative PCR auf differentielle Expression hin zu überprüfen. Dies dauert nicht nur sehr lange, sondern erfordert zusätzlich sehr viel der limitierten cDNA. So mußte etwa die Hälfte der gesamten zur Verfügung stehenden cDNA alleine für die Überprüfung der Unterschiede eingerechnet werden.

Obwohl durch die Modifikation der Differential Display Methode bereits längere cDNA-Fragmente amplifiziert werden als mit der unmodifizierten Methode, entsprechen aufgrund der Verwendung der Ankerprimer die cDNAs in der Regel der 3'-untranslatierten Region eines Gens. Für die Ermittlung der vollständigen Sequenz muß teilweise sehr viel Zeit investiert werden, was doch als großer Nachteil der Methode anzusehen ist.

Trotz des Mankos, daß die Methode des Differential Displays mit zahlreichen Nachteilen behaftet ist, muß sie jedoch unter den gegebenen Umständen für die Untersuchung der subtraktiven Hybridisierung vorgezogen werden. Neben der raschen Durchführbarkeit besitzt diese Methode den großen Vorteil geringe Mengen an mRNA zu benötigen und gleichzeitig auf einem Gel induzierte und reprimierte mRNAs mehrerer Zellpopulationen zu identifizieren.

5.3 Ergebnisse des Differential Displays

Im Rahmen dieser Dissertation sollten mit Hilfe der Methode des Differential Displays Genexpressionsunterschiede von Ovarialkarzinomen identifiziert werden. Es gelang mir, mehrere Unterschiede zu ermitteln. Einige konnten einem bereits bekannten Protein zugeordnet werden, andere besaßen zu dem Zeitpunkt der Sequenzierung nur sehr schwach homologe ESTs in den Datenbanken. Im Laufe meiner Arbeit wurden jedoch sehr viele ESTs veröffentlicht, die mit diesen cDNAs nun eine sehr hohe Übereinstimmung aufweisen. Dies spricht dafür, daß im Gegensatz zur allgemeinen Auffassung niedrig exprimierte mRNAs mit der Methode des Differential Displays erfaßt werden können.

Einige der bereits bekannten Unterschiede in Geweben von Patientinnen betrafen cDNA-Fragmente, die einem Teil der Transkripte von K-ras, dem Prefoldin5/c-Myc bindenden Protein MM-1, einer kleinen GTPase oder Rabin2 entsprachen. Bislang nicht beschriebene Unterschiede betrafen unter anderem die mRNAs von 26C/C9/2 oder 26C/G8/2.

5.3.1 Unterschiedlich exprimierte Zelloberflächenproteine und extrazelluläre Signalproteine in Ovarialkarzinomzelllinien

Um die Methode des Differential Displays zu verbessern, wurden einige Modifikationen bei der reversen Transkription und der DD-PCR vorgenommen (siehe Kapitel 4.6). Bevor die veränderte Methode an Geweben von Patientinnen angewandt wurde, erfolgte zunächst ein Testlauf mit Hilfe von Ovarialkarzinomzelllinien. Die folgenden Genexpressionsunterschiede, wurden zwischen den Ovarialkarzinomzelllinien GG und MT ermittelt.

Fibronectin

Durch das modifizierte Differential Display wurden relativ große Unterschiede bezüglich der Fibronectin-Genexpression (X02761) zwischen den Ovarialkarzinomzelllinien GG und MT festgestellt. Die differentielle Expression in den Zelllinien GG und MT und in weiteren Ovarialkarzinomzelllinien konnte ich mit Hilfe einer semiquantitativen PCR und Northern Blot-Analyse verifizieren (siehe Kapitel 4.6). Dabei traten besonders große Unterschiede zwischen den Zelllinien GG, bei der Fibronectin sehr stark exprimiert ist, und beispielsweise den Zelllinien Caov3 und NIH:OVCA-3 auf, bei denen sehr viel schwächere Signale zu verzeichnen sind.

Neben dem löslichen Plasma-Fibronectin, das im Blut und anderen Körperflüssigkeiten kreist und vermutlich bei der Blutgerinnung, Wundheilung und Phagozytose mitwirkt, spielen Fibronectin-Filamente als Bestandteile der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle. Sie

wirken bei der Anheftung der Zellen an die Matrix mit und dirigieren beispielsweise in der Wirbeltierembryoentwicklung die Wanderung von Zellen (*Alberts et al., 1995*).

Im Zusammenhang mit dem Krebsgeschehen ist Fibronectin von besonderem Interesse, da es an der Zelladhäsion, Migration und Proliferation beteiligt ist (*Hynes, 1986*).

Semaphorin E/3C

Ein weiterer Genexpressionsunterschied zwischen den Ovarialkarzinomzelllinien GG und MT konnte durch Analyse der NCBI Genbank als Teil der Semaphorin E (jetzt Semaphorin 3C)-mRNA (AB000220) identifiziert werden. Das Differential Display cDNA-Fragment besaß eine Länge von 624 bp und entsprach der Region 1177-1800 bp, die im offenen Leseraster des Semaphorin E/3C (Sema 3C) Transkripts liegt.

Semaphorine sind extrazelluläre oder Transmembranproteine, die in der Entwicklung von Geweben als chemoattraktive und repulsive Signale wirken. Semaphorin E/3C wird von den Zellen ausgeschieden, es besitzt eine Sema-Signaldomäne, gefolgt von einer immunoglobulinartigen Domäne und einem kurzen basischen Bereich.

Martín-Satué und Blanco (*1999*) konnten experimentell eine Erhöhung des metastatischen Potentials von menschlichen Lungen-Adenokarzinomzelllinien bei Überexpression von Semaphorin E/3C nachweisen. Auch Versuchsdaten von Yamada et al. (*1997*) sprechen für eine Beteiligung von Semaphorin E/3C an der Cisplatin-Resistenz menschlicher Tumoren. In Versuchen konnte eine 6fach höhere Expression des Proteins in resistenten Ovarialkarzinomzelllinien als in den nichtresistenten Ausgangszelllinien nachgewiesen werden.

Auf der Grundlage der experimentellen Daten, die auf Fibronectin und Semaphorin E/3C bei der Krebsentstehung hinweisen, sollten durch unsere Kooperationspartner weitere Informationen gesammelt werden. Durch Korrelation der Ergebnisse der Differential Display Analyse mit Informationen zu den betroffenen Organen, wie schnell oder langsam der Tumor metastasiert, welche Therapie angewandt wurde, und neue Details der pathologischen Befunde für die Tumor-Diagnose, wäre dies möglich. Damit ließe sich das Bild bezüglich der Eigenschaften und genetischen Charakterisierung der einzelnen Ovarialkarzinomzelllinien vervollständigen.

5.3.2 Komponenten von Signalübertragungswegen, die in Tumoren differentiell exprimiert sind

Aus den Geweben von Patientin 26 konnten mit Hilfe der unmodifizierten DD-PCR mehrere differentiell exprimierte cDNA-Fragmente isoliert werden, die Komponenten verschiedener Signalübertragungswege darstellen. Dabei handelte es sich um cDNA-Fragmente mit der Bezeichnung 26C/C1/1, 26C/C9/1, 26N/G16/1 und 26C/C9/2.

K-ras

Nach Reamplifikation des cDNA-Fragments 26C/C1/1 wurden zwei unterschiedliche DNA-Populationen ermittelt. Dabei besaßen zwei der Klone (26C/C1/1-6,10) eine Homologie zur K-ras (M54968) mRNA und drei Klone (26C/C1/1-2,4,8) ein Insert mit einer Homologie zu einer mRNA, die sowohl die Bezeichnung Prefoldin5 als auch MM-1 (D89667) trägt (siehe unten).

Wie bereits in der Einleitung unter Kapitel 1.1.4 beschrieben ist, zählt K-ras zu den Proto-Onkogenen, das einen Knotenpunkt bei zahlreichen Signalübertragungswegen darstellt. So vermittelt es unter anderem Informationen des epidermalen Wachstumsfaktors- oder des Cytokin-Rezeptors auf Transkriptions-Faktoren des Zellkerns (*Ellis und Clark, 2000*).

In zahlreichen Veröffentlichungen sind Mutationen des K-ras Onkogens beschrieben, die in Tumoren des Ovars auftreten (*Mok et al., 1993; Gallion et al., 1995*). Es liegen jedoch nur wenige Daten vor, die eine erhöhte Genexpression von K-ras im Zusammenhang mit der Tumorentstehung bei Adenokarzinomen des Ovars beschreiben (*Filmus und Buick, 1985*). Bei Patientin 26 wurde die vermehrte Expression eines cDNA-Fragments im Tumorgewebe und keine Mutation beobachtet.

26C/C9/1

Ein weiterer Genexpressionsunterschied wurde als 26C/C9/1 bezeichnet. Im Gegensatz zum gesunden Tubenepithel war die Expression im Tumorgewebe des Ovars von Patientin 26 erhöht. Zwei Klone (26C/C9/1-3 und -5) waren zur mRNA einer bislang in der Literatur noch nicht beschriebenen kleinen GTPase homolog. Es liegen keine weiteren Informationen über dieses Protein vor.

Rabin3

Eine Komponente eines Signalübertragungsweges stellt das cDNA-Fragment 26N/G16/1, mit Homologie zur mRNA des Ratten Rabin3 (RN19181) dar. Im Gegensatz zu den bislang genannten Fragmenten, bei denen eine erhöhte Expression im Tumorgewebe von Patientin

26 festgestellt wurde, war die Expression von 26N/G16/1 im Tumorgewebe der selben Patientin vermindert (siehe Kapitel 4.5.6).

Ursprünglich wurde Rabin3 (Rab3-interagierendes Protein) durch das Hefe-Zwei-Hybrid-System als Bindungspartner zu Rab3A, einer kleinen GTPase, identifiziert. Rab3A wurde bislang ausschließlich in neuroendokrinen Zellen nachgewiesen. Dort ist es mit den sekretorischen Vesikelmembranen assoziiert. Mutationsanalysen zeigten, daß Rab3A eine wichtige Rolle bei der regulierten Sekretion einnimmt. Möglicherweise kontrolliert das Protein den Zusammenbau und die Auflösung inhibitorischer Komplexe, die eine Vesikel-Verschmelzung mit der Plasmamembran verhindern (*Brondyk et al., 1995*).

Das Rabin3-Protein hat eine molekulare Masse von 50 kDa und bildet in der Zelle wahrscheinlich einen Komplex mit zusätzlichen Polypeptidketten, so daß ein etwa 200 kDa-Komplex entsteht (*Brondyk et al., 1995*). Die N-terminale Region dieses Proteins ist mit einer großen Gruppe von Proteinen verwandt, die hauptsächlich strukturelle Aufgaben bei der Zytoskeltausbildung übernehmen. Zwei Regionen des Rabin3-Proteins zeigen jedoch starke Homologien zu Sec2p, einem zytosolischen Protein von *S.cerevisiae*. Sec2p interagiert mit Sec4p, einer kleinen GTPase, die zu 53% mit der Rab3A-Sequenz identisch ist.

Dabei scheinen die Funktionen von Sec4p und Rab3a sehr ähnlich zu sein. Wie Rab3A ist auch Sec4p eine essentielle Komponente des gerichteten sekretorischen Transports.

Obwohl die Daten von Rabin3 dafür sprechen, daß es eine Aufgabe beim Guanin-Nukleotid-Austausch von Rab3a übernimmt, konnten dafür noch keine Beweise geliefert werden (*Brondyk et al., 1995*).

Ob die Überexpression von Rabin3 mit der Tumorentstehung in Zusammenhang steht, ist noch unbekannt. Es gibt jedoch Befunde, die für einen veränderten Vesikeltransport bei Tumoren sprechen. So trägt der erhöhte Auswärtstransport, wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, der vermehrten Ausscheidung von Zellgiften und Chemotherapeutika aus den Zellen bei, so daß diese trotz zytotoxischer Bedingungen überleben.

Prefoldin5/c-myc-bindendes Protein MM-1

Wie bereits oben erwähnt, wurden nach Reamplifikation des 26C/C1/1 cDNA-Fragments zwei unterschiedliche DNA-Populationen ermittelt. Zwei Klone waren homolog zu einem Teil der K-ras mRNA, drei Klone (26C/C1/1-2,4,8) hatten ein Insert mit einer Homologie zu einer mRNA (D89667), die sowohl die Bezeichnung Prefoldin5 (dies ist eine Untereinheit des Prefoldin-Chaperons) als auch MM-1 (ein c-Myc bindendes Protein) trägt.

Die Funktion dieses Fragments kann in der Unterstützung der Faltung von nicht nativen Proteinen und/oder der Regulierung des c-Myc Onkogens bestehen.

Prefoldin ist ein Chaperon-Protein, das sich aus sechs verschiedenen Polypeptidketten zusammensetzt. Die Untereinheiten drei, vier, fünf und sechs wurden zuvor als cDNAs eines VHL (von Hippel-Lindau Tumorsuppressor Gen) bindenden Proteins (U56833), eines Transkriptionsfaktors C1 (U41816), des c-Myc bindenden Proteins MM-1 (D89667) und eines Proteins unbekannter Funktion mit Namen KE2 (Q03958) identifiziert. Untersuchungen zeigten, daß eukaryontische Prefoldin-Proteine (H.sapiens, M.musculus, C.elegans, S.cerevisiae) untereinander und auch zu dem Archaeobakterium M.jannaschii stark homolog sind (*Vainberg et al., 1998*). Das Chaperon Prefoldin unterstützt die Faltung von Proteinen, indem es an nicht native Proteine bindet und es einem weiteren Chaperon zuführt. Am besten untersucht ist die Interaktion von Prefoldin mit nicht nativem β -Aktin und dem cytosolischen Chaperon c-cpn. Dabei überträgt Prefoldin β -Aktin auf c-cpn ohne die Verwendung von Nukleotiden wie ATP oder ADP, die von anderen Chaperonen wie beispielsweise von GroEL/GroES benötigt werden. Weitere Proteine, denen Prefoldin zur Ausbildung der nativen Struktur verhilft sind beispielsweise α - und β -Tubulin, oder Transducin (*Vainberg et al., 1998*).

Neben der allgemein anerkannten Funktion des Prefoldins als Chaperon-Protein ist es grundsätzlich auch denkbar, daß eine Untereinheit des Chaperons, das Prefoldin5, eigenständig neben dem Gesamtprotein aktiv werden kann. Prefoldin5 wurde auch als c-Myc bindendes Protein, MM-1 bezeichnet (*Mori et al. 1998*).

Dementsprechend lassen sich für die Mitwirkung des Prefoldin5/MM-1 Proteins in der Entstehung von Tumoren zwei Arbeitshypothesen aufstellen.

Steht die Funktion des Gesamt-Proteins im Vordergrund, ist die Aufgabe des Chaperons im Tumorgewebe für seine Überexpression ausschlaggebend. Ist hingegen die Ursache der Überexpression in der Funktion des c-Myc bindenden Proteins MM-1 zu suchen, so kann dies mit der Entstehung des Tumors im Zusammenhang gesehen werden.

Im ersten Fall ist die Überexpression als Sekundär-Wirkung zu sehen. Dabei können wiederum zwei Mechanismen unterschieden werden. Zum einen werden aufgrund der schnellen Proliferation der Tumorgewebe vermehrt Proteine gebildet, die ihrerseits in Abhängigkeit von Chaperonen ihre native Konfiguration erhalten. Dementsprechend nimmt auch die Zahl der Chaperone im Tumorgewebe zu. Fehlerhafte Proteine, die aufgrund veränderter Tumorsuppressoren nicht mehr zur Apoptose der Zellen führen, könnten ebenfalls zu einer Häufung von Chaperonen im Tumorgewebe führen, wenn man unterstellt,

daß es durch diese Proteine zu einer vermehrten Belastung der Chaperone kommt. Besitzen Proteine nach ihrer Faltung nicht die native Konformation und werden dementsprechend von Chaperonen erneut gefaltet, belegen sie zum wiederholten mal das Chaperon und verringern so die Produktivität der Chaperone. Diese wird durch eine vermehrte Expression der Chaperone ausgeglichen, womit Chaperonen eine passive Rolle zuzuschreiben wäre.

Zum anderen ist es aber auch denkbar, daß eine Überexpression des Prefoldin-Chaperons aktiv zur Tumorentstehung beiträgt. Wie bereits oben erwähnt wurde, sind Interaktionen zwischen Prefoldin und α - und β -Tubulin beschrieben. Diese wiederum können mit c-Myc, einem Proto-Onkogen interagieren. So beschreibt Alexandrova (*Alexandrova et al., 1995*) die Interaktion von α -Tubulin mit c-MYC.

c-Myc gehört zu den Proto-Onkogenen (siehe Kapitel 1.1.4). Das Gen umfaßt drei Exons, wobei Exon eins untranslatiert ist, Exon zwei und drei dagegen von zwei verschiedenen Start ATGs für ein 2,2 bzw. ein 2,4 kb großes Transkript kodieren. Je nach Gewebetyp wird somit ein 67 bzw. 64 kDa Protein hergestellt (*Facchini und Penn, 1998*). Das Protein kann grob in drei Domänen unterteilt werden. Domäne eins (Aminosäurerest 1 bis 203) nimmt eine globuläre Struktur ein und beinhaltet die Myc-Boxen 1 (MB1, Position 45-63) und 2 (MB2, Position 129-141). Domäne zwei (Reste 204 bis 237) weist eine unstrukturierte Region auf. Domäne drei (Reste 238 bis 439) enthält den α -helicalen Carboxy-Terminus mit einer basischen Region (BR, Position 355-368), einem Helix-Loop-Helix Motiv (HLH, Position 369-410) und einem Leucin-Zipper (Zip, Position 411-439).



Abb.: 5.2 Struktur des c-MYC-Proteins.

Das Proteins erstreckt sich über 439 Aminosäurereste und kann grob in drei Domänen eingeteilt werden. Die aminoternale Domäne (Position 1-203) mit den Myc-Boxen 1 (MB1, Position 45-63) und 2 (MB2, Position 129-141) nimmt eine globuläre Struktur ein. Die Aminosäurereste 204-237 weisen eine unstrukturierte Region auf. Die carboxyterminale Region zeigt eine α -helicale Struktur und beinhaltet eine basische Region (BR, Position 355-368), ein Helix-Loop-Helix Motiv (HLH, Position 369-410) und einen Leucin-Zipper (Zip, Position 411-439).

Die Interaktion zwischen α -Tubulin und c-MYC findet an der aminoterminalen Region des c-MYC-Proteins in der Region der Myc-Boxen 1 und 2, genauer zwischen Position 48-135 statt (Alexandrova et al., 1995). Durch die Interaktion wird das c-MYC-Protein an dem Cytoskelett verankert. Dies führt dazu, daß c-MYC im Zytoplasma bleibt, statt in den Kern zu wandern, womit der Kernimport von c-MYC reguliert werden könnte. Niklinski et al. (2000) beobachteten eine erhöhte zytoplasmatische Lokalisation des c-MYC in ruhenden normalen humanen Vorhaut-Fibroblasten verglichen mit wachsenden Zellen, bei denen c-MYC vermehrt in der Kernfraktion nachgewiesen wurde. Dieser Befund würde dafür sprechen, daß erhöhte Konzentrationen von c-MYC im Kern dazu führen, daß sich die Zellen häufiger teilen und proliferieren.

Würde das Chaperon Prefoldin aufgrund eines Signals überexprimiert, so könnte dies dazu führen, daß das normal exprimierte α -Tubulin von den Chaperonen in stärkerem Maß aufgegriffen wird und so das Gleichgewicht zwischen α - und β -Tubulin gestört wäre. Als Folge würden weniger Mikrotubuli gebildet werden, die c-MYC als Verankerungsstellen am Zytoskelett fehlen. c-Myc würde in den Zellkern importiert werden und dort zu einer veränderten Transkription führen. Die veränderte Transkription könnte zur Verstärkung/Ausbildung der Tumorentstehung beitragen.

Nach der zweiten Hypothese beruht die Wirkung der Überexpression von MM-1 auf seiner Funktion als c-Myc bindendes Protein MM-1. Dieses Protein wird als mögliche Ursache in der Tumorentstehung diskutiert. Bislang lassen sich dazu erst wenige Informationen aus der Literatur entnehmen.

Mori et al. (1998) isolierten durch das Hefe Zwei-Hybrid-System einen Bindungspartner von c-MYC, den sie als c-Myc bindendes Protein (MM-1) bezeichneten. Das MM-1-Protein besteht nach ihren Untersuchungen aus 167 Aminosäureresten und interagiert über die gesamte Sequenz hinweg mit der Myc-Box 2 des c-MYC-Proteins. Da das MM-1-Protein in Luziferase-Aktivitäts-Analysen die transkriptionelle Aktivität von c-MYC reprimierte, schlugen Mori et al. als Wirkungsweise die eines Repressors vor, schränkten diese Hypothese aber insofern ein, als das p107-Protein, ein weiteres Protein, das die Transaktivator-Domäne von c-MYC erkennt, die gleichen Bindungseigenschaften wie das MM-1-Protein aufweist und es die transkriptionelle Aktivität von c-MYC in Lymphomzellen nicht beeinflusst.

Da sowohl bei K-ras als auch bei dem Prefoldin5/c-Myc bindenden Protein MM-1, die ich in Geweben von Patientin 26 fand, eine Mitwirkung bei der Tumorentstehung denkbar ist, aufgrund der limitierten cDNA aus Patientengewebe aber keine PCR zur Verifizierung der

Ergebnisse der DD-PCR durchgeführt werden konnte, wurden bislang keine weiteren Untersuchungen in diesem Kontext durchgeführt. Im Arbeitskreis von Prof. Ponstingl ist jedoch geplant, eine Reihe von cDNAs auf Mikrochips zu transferieren und diese mit markierten cDNA-Proben aus Geweben von tumor erkrankten Patientinnen zu hybridisieren. Dabei werden zusätzlich zu den cDNAs von K-ras und dem Prefoldin5/c-Myc bindenden Protein MM-1 auch cDNAs von Fibronectin und Semaphorin E/3C (siehe Kapitel 5.3.1) verwendet. Damit sollte es möglich sein, die hier zusammengefaßten Befunde zu überprüfen.

26C/C9/2, ein möglicher Kinase-Bindungspartner

Ein ursprünglich in den Geweben der Patientinnen 26 und 18 mit einer DD-PCR entdeckter Genexpressionsunterschied zwischen Tumorgewebe des Ovars und Tubenepithel wurde als 26C/C9/2 bezeichnet. Nach quantitativer PCR ließ sich der Unterschied in Geweben der Patientinnen 18, 30 und 46, nicht aber in Patientin 26 verifizieren. Das cDNA-Fragment war in Tumorgewebe von Patientin 18 etwa 14fach stärker, von Patientin 30 2fach und von Patientin 46 5fach höher exprimiert als in dem jeweils korrespondierenden Normalgewebe. Durch eine Kombination von RACE-Sequenzen und Datenbankanalysen gelang es mir, die Struktur des zugrundeliegenden Gens zu ermitteln. Die Gensequenz wird durch die BAC-Klone RP11-61E11 (AC016257) und RP11-781C15 (AC078874) abgedeckt. Aufgrund dieser BAC-Klone konnte das Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 12 in der Region 12q23-24.1 lokalisiert werden. Es umfaßt 165 kb mit 20 Exons. Die Exons 2-19 sind Teil beider BAC-Klone, das erste Exon ist nur in RP11-781C15 vertreten.

Die Expression des Transkripts wurde in Ovariakarzinomzelllinien überprüft (siehe Abb. 4.23). Eine Northern Blot-Analyse mit einem 26C/C9/2 cDNA-Fragment (in Abb.: 4.18 dargestellt) erbrachte eine ungefähre Größe des Transkripts von etwa 3,2 kb. Die mRNA-Menge in Milz, Thymus, Dünndarm, Ovar, Darm und den peripheren Blutleukozyten ist im Vergleich zu den anderen Geweben vermindert. Zusätzlich kann ein 3,2 kb großes Transkript auch in allen verwendeten Ovariakarzinomzelllinien nachgewiesen werden. Wird ein Poly-A-Schwanz von etwa 200 bp zu dem Transkript von 2999 bp hinzugerechnet, stimmt die Länge mit der in der Northern Blot-Analyse ermittelten Länge von 3,2 kb überein.

Für den Nachweis von 26C/C9/2, das ich in E.coli rekombinant herstellte, wurden Seren mit peptidspezifischen Antikörpern generiert. Zwei Regionen hoher Antigenizität, die sich unmittelbar am C-Terminus bzw. im zweiten Drittel des Proteins befanden (siehe Kapitel 3.26), wurden dazu ausgewählt. Die Seren der Kaninchen zeigen eine Korrelation zwischen der Anzahl der Immunisierungen und der Zunahme der Signalintensitäten gegen die Peptide

(Kapitel 4.7.7), was für die Spezifität der Antikörper spricht. Auch die Reaktion der Seren mit dem durch das TNT[®]-Retikulozyten-Lysat transkribierten Protein spricht dafür.

Das Protein von 26C/C9/2 weist eine bemerkenswerte Struktur auf, die eine Rolle in der intrazellulären Signalübermittlung nahelegt. Wie durch die „SMART“-Analyse ermittelt werden konnte, besitzt das 26C/C9/2-Protein eine pleckstrin-homologe Domäne (AS 482-615) und eine Phosphotyrosin-Bindungs-Domäne (AS 271-370). Beide Domänen zeigen sehr ähnliche dreidimensionale Strukturen, die evolutionär konserviert sind (*Rebecchi und Scarlata, 1998*), haben jedoch unterschiedliche Funktionen. Eine der bekannten Eigenschaften der Phosphotyrosin-Bindungs-Domäne (PTB), die nicht von der pleckstrin-homologen Domäne (PH) geteilt wird, ist die Bindung an Liganden mit einem Phosphotyrosin-X-Asparagin-Bindungs-Motiv.

Die besser untersuchte und in der Literatur ausführlich beschriebene Domäne ist die pleckstrin-homologe Domäne.

Aufbau der pleckstrin-homologen Domäne

Eine strukturelle Einheit des 26C/C9/2-Proteins ist eine pleckstrin-homologe Domäne. Dabei handelt es sich um eine etwa 100 Aminosäurereste lange Domäne, die in fast 100 eukaryontischen Proteinen, nicht jedoch in Pflanzen, entdeckt wurde (*Bottomley et al., 1998*). Der Name der PH-Domäne leitet sich von dem Protein ab, in dem zwei solcher Domänen zuerst charakterisiert wurden, dem „Platelet and Leukocyte C Kinase Substrate Protein (*Haslam et al., 1993*). Obwohl die dreidimensionale Struktur der PH-Domäne sehr stark konserviert ist, sind die Sequenzhomologien in den Domänen der einzelnen Proteine mit etwa 10-20% minimal. Dies steht im Gegensatz zu anderen bekannten, weit verbreiteten Domänen wie der SH2-Domäne, bei der die Sequenz relativ stark konserviert ist (*Ingleby und Hemmings, 1994*) und führt bei den PH-Domänen zu einer höheren Funktionsdiversität. Die Vielfalt der möglichen Aufgaben verhinderte in der Vergangenheit die Zuordnung einer PH-Domäne eines Proteins zu einer bestimmten Aufgabe.

Die Struktur einer PH-Domäne ist in Abb. 5.3 am Beispiel des Pleckstrin-Proteins dargestellt.

Die mit Hilfe der NMR-Methode ermittelte Struktur der Domäne zeigt einen Kern, bestehend aus sieben antiparallelen β -Faltblatt-Strängen und einer langen C-terminalen Helix. Vier der Faltblattstrukturen stehen nahezu orthogonal zu den anderen drei antiparallelen Strängen und bilden eine faß-ähnliche Struktur aus, die von der α -Helix stabilisiert ist. Die N- und C-Termini der Domäne liegen auf der selben Seite des Proteins, weisen jedoch in unterschiedliche Richtungen.

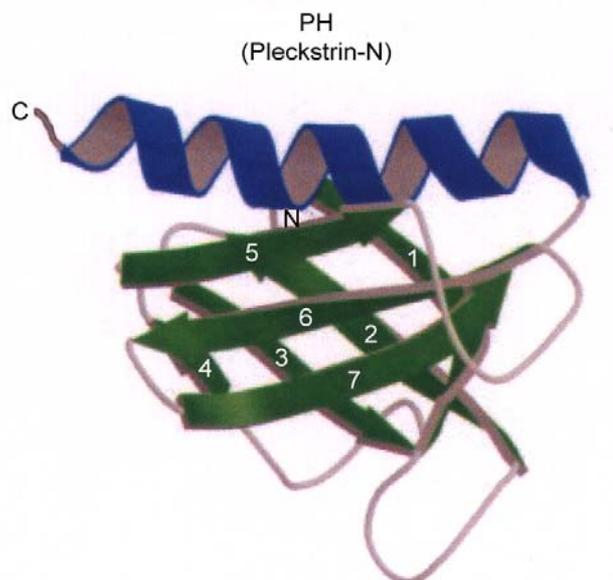


Abb. 5.3 Raumstruktur der PH-Domäne des Pleckstrin-Proteins (Lemmon und Ferguson, 2000). Die Faltblattstränge der PH-Domäne sind mit 1-7 bezeichnet, die α -Helix ist blau gekennzeichnet.

Eine der bemerkenswertesten Eigenschaften der PH-Domäne ist in der elektrostatischen Polarisation ihrer Oberfläche zu sehen. Auf der positiv geladenen Seite der Domäne befinden sich zahlreiche Lysine, Arginine und Histidine. Die andere Seite mit der C-terminalen α -Helix ist durch saure Aminosäurereste negativ geladen. Durch die Polarisation können die Proteine mit ihren Liganden in Wechselwirkung treten, so daß die positiv geladenen Aminosäuren beispielsweise an die nach Zellstimulation auftretenden Plasmamembranbestandteile Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP_3) (Carpenter und Cantley, 1996) oder an das wasserlösliche Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) (Rameh et al., 1997; Dove et al., 1997).

Da das 26C/C9/2-Protein ebenfalls eine PH-Domäne trägt, ist auch für dieses Protein anzunehmen, daß es an einer Singalübertragungskaskade beteiligt ist.

Funktionen der PH-Domäne

Ebenso zahlreich wie die Bindungspartner sind auch die Funktionen der PH-Domänen. Deshalb ist die tatsächliche Funktion der PH-Bindungsdomäne des 26C/C9/2-Proteins nicht von vorneherein zuzuordnen. Modelle für die Rolle der PH-Domäne einiger Proteine wurde von Bottomley et al. (1998) aufgestellt (siehe Abb. 5.4).

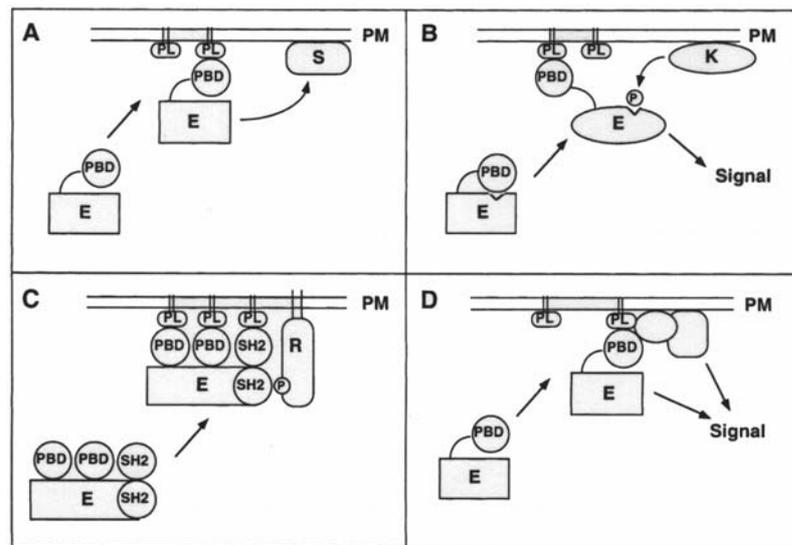


Abb. 5.4 Modelle für unterschiedliche Funktionen der PH-Domänen (Bottomley et al., 1998).

Phospholipide sind mit PL, Proteine mit E, Substrate mit S und die PH-Domänen mit PBD gekennzeichnet. In der Abbildung sind vier Varianten der Funktionen (A-D) einer pleckstrin-homologen Domäne dargestellt (siehe Text).

Bei der ersten Modellvariante (siehe Abb. 5.4, A) ermöglicht die Bindung der PH-Domäne (PBD) eines Proteins (E) an ein spezifisches Phosphatidylinositol (PL) die Translokation an ein membrangebundenes Substrat. Als Beispiel für dieses Modell dient die Phospholipase C- δ 1. Sie bindet mit ihrer PH-Domäne an PIP_2 . Dabei schneidet die Phospholipase die Phosphodiester-Bindung von PIP_2 und setzt die Botenstoffe IP_3 und Diacylglycerol frei (Rebecchi und Scarlata, 1998).

Wie bereits oben erwähnt, binden einige Proteine mit PH-Domäne auch an IP_3 . Sind die Affinitäten der PH-Domänen zu PIP_2 und IP_3 , gleich stark, könnte das bei der Spaltung freigesetzte wasserlösliche IP_3 mit dem PIP_2 konkurrieren, so daß sich das Protein von der Membran lösen könnte.

Bei der zweiten diskutierten Variante (siehe Abb. 5.4, B) verändert die Bindung eines Proteins mit PH-Domäne an ein membranständiges Phospholipid die Konformation des Proteins, so daß durch ein regulatorisches Protein (K) die Aktivität des Proteins verändert und somit eine Signalübertragung ermöglicht wird. Ein Beispiel dafür ist Akt2, eine

Serin/Threonin-Kinase der PKB Familie, die bereits in Kapitel 1.1.4 erwähnt wurde. Sie ist hier von besonderem Interesse, da sie auch mit APPL, dem Protein mit der höchsten Homologie zum 26C/C9/2-Protein, interagiert.

Akt2 wird durch die Phosphoinositol-3-Kinase aktiviert, wenn Säugerzellen durch Insulin und Wachstumsfaktoren stimuliert werden. Zusätzlich ist die Aktivität von Akt2 unter anderem auch abhängig von der Phosphorylierung eines Threoninrestes an Position 308 durch eine zweite Protein-Kinase, PDK1. Die Phosphorylierungsstelle bleibt für PDK1 solange unzugänglich, bis die PH-Domäne von Akt an PIP₃ gebunden hat und eine Änderung der Proteinkonformation bewirkt. Interessant dabei ist, daß auch PDK1 eine PH-Domäne besitzt, die zusammen mit der Akt2 PH-Domäne eine Co-Lokalisation an der Plasmamembran bewirkt und somit für eine Orientierung sorgt, die die Wechselwirkung der beiden Proteine bevorzugt.

Die dritte Modellvariante (siehe Abb. 5.4, C) geht von der Verstärkung der Affinität eines Proteins zur Plasmamembran durch Kooperation mehrerer PH-Domänen oder einer PH-Domäne mit verschiedenen anderen Domäne, wie einer SH2- oder PTB-Domäne, aus.

In der vierten Modellvariante (siehe Abb. 5.4, D) interagiert die PH-Domäne zusätzlich zu den membranständigen Phospholipiden mit Proteinen, die an die Membran gebunden sind, was schließlich zu einer synergistischen Membrantranslokation und Enzymaktivierung führt.

Ein Beispiel für die dritte und vierte Modellvariante ist die Phospholipase C- δ 1. Die Phospholipase C- δ 1 besitzt neben der PH- eine SH2-Domäne. Diese Domäne bindet an ein Phosphotyrosin-X-Asparagin-Motiv, das in membranständigen Proteinen zu einer synergistischen Membrantranslokation führen könnte. Sie bindet aber auch an Phosphoinositide (*Rameh et al., 1995*) und erhöht somit die Affinität zur Plasmamembran. Dies könnte auch für das 26C/C9/2-Protein gelten. Es besitzt neben der PH- eine PTB-Domäne, die wie die SH2-Domäne das Phosphotyrosin-X-Asparagin-Motiv erkennt und ebenso zu einer Translokation beitragen könnte. Damit passen die Voraussetzungen auf die dritte und vierte Modellvariante.

Bei dem Zusammenspiel mehrerer Domänen ist aber auch eine regulatorische Rolle der einzelnen Domänen denkbar. Dies ist der Fall, wenn bei einer Domäne eine hohe Affinität zu PIP₂ vorliegt, bei der anderen Domäne jedoch lediglich eine geringe Affinität vorhanden ist. Eine der beiden Domänen könnte für die Lokalisation, die andere für eine enzymatische Aktivierung verantwortlich sein. (*Bottomley et al., 1998*).

Für das Protein 26C/C9/2 ist eine gesicherte Zuordnung zu einer der Modellvarianten bislang nicht möglich. Auch bei dem APPL-Protein, das mit über 60% Übereinstimmung die höchste Homologie zu 26C/C9/2 besitzt, ist nicht geklärt, welche Funktion die PH-Domäne tatsächlich übernimmt. Dennoch deuten, wie im folgenden Abschnitt erläutert, alle Daten auf eine Mitwirkung bei der Tumorentstehung hin.

Homologie von 26C/C9/2 zu APPL

Das 26C/C9/2-Protein zeigt nach Datenbankrecherchen die höchste Homologie zu dem APPL-Protein. Mitsuuchi et al. (1999) konnten durch das Hefe-Zwei-Hybrid System einen Bindungspartner der Serin/Threonin-Kinase Akt2 (siehe 1.1.4) identifizieren, den sie APPL („Adaptor Protein Containing PH-Domain, PTB-Domain and Leucine Zipper Motif“) nannten. Das Gen für APPL besitzt ein 57 bp untranslatiertes 5'-Ende, einen offenen Leseraster von 2127 bp, eine 3786 bp lange 3'-untranslatierte Region und kodiert für ein Protein mit einer molekularen Masse von etwa 80 kDa. In Experimenten wiesen Mitsuuchi et al. eine Interaktion zwischen der PTB-Domäne des APPL und der katalytischen Domäne des inaktiven Akt2 nach. Gleichzeitig konnten sie eine hohe Affinität von APPL für die p110 α -Untereinheit der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) zeigen. Aufgrund dieser Befunde stellten die Autoren eine Hypothese auf, die besagt, daß APPL als Adaptor zwischen Akt2 und PI3K im Zytoplasma fungiert. Nach Stimulation durch Wachstumsfaktoren oder Insulin vermag die p110 α -Untereinheit der PI3K Akt2 zu phosphorylieren. Das phosphorylierte Akt2 bindet mit seiner PH-Domäne an das, nach Stimulation vermehrt auftretende, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat oder Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat und wird nach der bereits vorne beschriebenen zusätzlichen Phosphorylierung eines Threoninrestes an Position 308 durch die PDK1-Protein-Kinase aktiviert. Die Phosphorylierung von Akt2 an einer weiteren Stelle ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. In den beschriebenen Versuchen konnte weder eine Bindung der PH-Domäne von APPL an die zytoplasmatische Membran, noch der gemeinsame Transport von APPL zusammen mit Akt2 zur Membran nachgewiesen werden. Da das 26C/C9/2-Protein eine große Homologie zu APPL aufweist, was insbesondere aufgrund der hohen Varianz der PH- und PTB-Domänen bemerkenswert ist, liegt die Vermutung nahe, daß auch 26C/C9/2 am Signaltransport, evtl. im Zusammenhang mit der Kinase Akt2, an der Informationsübertragung beteiligt ist. Diese Vermutung ist umso näherliegend, als die mRNA von 26C/C9/2 im Tumorgewebe von Patientin 18, 30 und 46 vermehrt auftrat, was die Phosphorylierung und damit die Aktivität von Akt2 erhöht hätte. Eine Erhöhung der Aktivität führt ebenso wie eine vermehrte Expression zu einem veränderten Ausmaß der Phosphorylierung. Da von Akt2 bekannt ist, daß es bei einigen Tumortypen überexprimiert wird, darunter auch in Ovarialtumoren (*Bellacosa et al., 1995*), kann dem 26C/C9/2-Protein eine analoge Wirkung zugeschrieben werden. Andererseits

spielt Akt2 auch bei der Induktion der Apoptose eine Rolle (Yuan et al., 2000; Page et al., 2000).

5.3.3 26C/G8/2, ein Protein mit doppelsträngigen RNA Bindungs-Motiven

Eine differentiell exprimierte cDNA, die als 26C/G8/2 bezeichnet wurde, konnte durch DD-PCR bei den Patientinnen 26 und 31 identifiziert werden. Durch quantitative PCR ließ sich der Unterschied verifizieren. Dabei war die cDNA von 26C/G8/2 etwa 10fach höher im Ovarialkarzinomgewebe exprimiert als im korrespondierenden Normalepithel des Eileiters. Durch Datenbankanalyse gelang es, zunächst das vollständige Transkript und den größten Teil des zugrundeliegenden Gens zu ermitteln. Die Sequenz des Gens ist durch die drei humanen genomischen Sequenzen der Klone RP11-464D19 (AC027018), RP11-181D18 (AC018620) und RP11-353G20 (AC021897) abgedeckt. Aufgrund der Chromosomenlokalisierung dieser Klone konnte das Gen der Bande 8q13 auf dem langen Arm des Chromosoms 8 zugeordnet werden. Das vollständige Gen besteht aus mehr als 14 Exons, wovon die Exons e1-e12 Teile des Klons RP11-464D19, Exon ey und ez Teile der Klone RP11-181D18 und RP11-353G20 sind. Zusätzlich zu diesem Gen befindet sich in der Chromosomenbande Xq21.31 ein Pseudogen, das durch die Klone RP13-140E4 (AL121877) und RP13-436D9 (AL590041) repräsentiert wird. Die 5'- und 3'-Spleißstellen der Exon-Intron-Übergänge sind konserviert und in Tab. 4.5 dargestellt. Zur Zeit wird im Arbeitskreis von Prof. Ponstingl das Protein entsprechend meiner Vorgaben kloniert und exprimiert. Wie bei 26C/C9/2 wurde auch von 26C/G8/2 ein Teilstück der cDNA von mir mit Digoxigenin gelabelt und wird bei einer *in situ* Hybridisierung eingesetzt.

Aufbau und Funktion der doppelsträngigen RNA Bindungs-Domäne

Das 26C/G8/2-Protein beinhaltet vier Domänen, die evolutionär stark konserviert sind. Diese umfassen je 65-70 Aminosäurereste und sind homolog zu den RNA Bindungs-Motiven des Drosophila-Staufen-Proteins, das mit doppelsträngiger RNA interagiert (St. Johnston et al., 1991). Durch NMR-Analysen von Bycroft et al. (1995) oder Kharrat et al. (1995) wurde die Struktur isolierter dsRBS von E.coli RNase III und des Drosophila Staufen-Proteins in Lösung bestimmt. Die Proteinstruktur zeigte eine α - β - β - β - α Topologie, bei der die N- und C-terminalen α -Helices gegen die drei antiparallelen β -Stränge gerichtet sind.

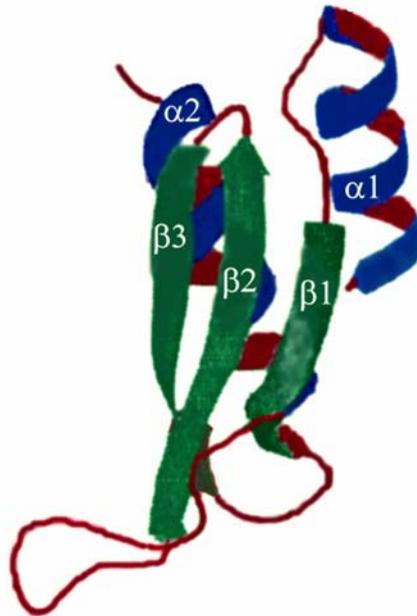


Abb.: 5.5 Die Struktur einer doppelsträngigen RNA Bindungs-Domäne ist am Beispiel der dritten dsRBD des *Drosophila* Staufen-Proteins gezeigt (Perez-Canadillas und Varani, 2001).

Bislang wurde keine Konsensus-Sequenz der RNA ermittelt, die die Proteine zur Bindung an die RNA veranlaßt. Vielmehr scheint die Spezifität von der Konformation der RNA abzuhängen. In diesem Zusammenhang konnten Ryter und Schultz (1998) die Kristallstruktur eines Komplexes zwischen der zweiten dsRBD des RNA-bindenden Proteins A von *Xenopus laevis* mit doppelsträngiger RNA (dsRNA) bestimmen. Dabei umspannte das Protein 16 bp der dsRNA, indem es mit zwei kleinen Taschen über die eine Seite der großen Tasche hinweg interagierte. Da lediglich die eine Seite der großen Tasche beteiligt ist, könnte die verbliebene Seite weiteren Bindungspartnern offen stehen und damit z.B. ein Umwinden der RNA durch ein Protein mit mehreren Bindungsdomänen ermöglichen. Zahlreiche Proteine besitzen mehrere dsRBDs. Beispielsweise hat ein humanes Poly(A)-bindendes Protein (PABP, U68104) vier, *Drosophila* Staufen fünf doppelsträngige RNA-Bindungs-Domänen. Die Art der Interaktion zwischen der dsRNA und den dsRBDs macht deutlich, weshalb die dsRBDs keine einzelsträngige RNA, einzelsträngige oder doppelsträngige DNA erkennt.

Das 26C/G8/2-Protein besitzt ebenfalls vier dsRBDs, die mit doppelsträngiger RNA interagieren können, so daß auch in diesem Fall eine verstärkende Wirkung auf die RNA-Bindung denkbar ist.

Homologe Proteine zu 26C/G8/2 und deren Funktion

Das bekannteste Protein der dsRBD-Familie ist das Staufen-Protein von *Drosophila melanogaster*. Es besitzt insgesamt fünf Kopien des dsRBD-Motivs, wobei drei der Kopien die vollständige und zwei Kopien verkürzte Domänen aufweisen (St. Johnston et al., 1991; St. Johnston et al., 1992). In Experimenten wurde die Interaktion des Staufen-Proteins mit den mRNAs des „bicoid“ und „oscar“ sowie der „prospero“ mRNA in Neuroblasten nachgewiesen. Dabei bindet das Staufen-Protein direkt an die mRNAs und organisiert in einem mehrstufigen Mechanismus deren Transport im Zytoplasma, der zudem von Zytoskelettbestandteilen abhängig ist (Broadus et al., 1998; Erdelyi et al., 1995; St. Johnston, 1995). Die mRNA von „bicoid“ gelangt auf diese Weise ins anteriore, die von „oscar“ ins posteriore Zytoplasma der Oocyten und die von „prospero“ in den basalen Cortex von Neuroblasten (Broadus et al., 1998).

Die einzelnen dsRNA bindenden Domänen haben offenbar verschiedene Funktionen, so ist dsRBD2 für die mikrotubuli-abhängige Lokalisation von „oscar“ notwendig, dsRBD5 dagegen für den actin-abhängigen Transport von „prospero“ (Micklem et al., 2000).

Die bei *Drosophila* gewonnenen Erkenntnisse legen den Schluß nahe, daß Proteine mit dsRBDs für den Transport von mRNA im allgemeinen verantwortlich sind. Auch das 26C/G8/2-Protein weist doppelsträngige RBDs auf. Deshalb ist vermutlich auch dieses Protein am Transport von mRNA beteiligt. Der dabei zugrundeliegende Mechanismus ist nicht geklärt, hängt aber von der 3'-untranslatierten Region der gebundenen mRNAs und von den Proteinen ab, die an diese Signale binden.

Die Hypothese über die Vermittlung des Transportes von mRNA durch Proteine mit dsRBDs in Abhängigkeit mit dem Zytoplasma wurde durch experimentelle Daten von Wickham et al. (1999) untermauert. Das humane Staufen-Protein bindet mit zwei seiner dsRBDs an doppelsträngige RNA und gleichzeitig an Tubulin. Weiterhin konnte das humane Staufen am rauhen endoplasmatischen Reticulum (rER) lokalisiert werden. Da dieses Protein keine Transmembran-Domäne besitzt und sich dennoch am rER befindet, sind folgende Hypothesen denkbar:

- (a) Proteine mit dsRBDs können mRNAs zum rER transportieren und eine unmittelbare Nachbarschaft zu Signalerkennungspartikeln (Signal recognition Partikels) ergeben, was die Translation und Translokation ermöglicht.
- (b) Proteine könnten mit dsRBD am rER gelagert werden, bis sie zu einem bestimmten Zeitpunkt benötigt werden. Zusammen mit den mRNAs und Cofaktoren könnten sie RNP-Komplexe bilden, die entlang der Mitkrotubuli transportiert werden.

Die Interpretationsmöglichkeiten ergeben bislang kein klares Bild für die Funktion. Doch weisen sie auf eine Störung des mRNA-Transports durch die Überexpression des 26C/G8/2-Gens hin und können so mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht werden. Seine Überexpression in den Ovarialkarzinomen der Patientinnen 26 und 31 könnte unter anderem zur vermehrten Translokation und Translation einzelner mRNAs führen, die an der Zellregulation beteiligt sein könnten und somit zur Tumorentstehung beitragen.

5.3.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit können möglicherweise zu Einblicken in die Entstehung von Ovarialkarzinomen auf molekularer Ebene führen. Zunächst aber handelt es sich nicht um kausale Zusammenhänge, sondern um die Korrelation von Expressionsunterschieden mit dem Tumorwachstum in einzelnen Patientinnen.

Die gefundenen Ergebnisse müssen noch an weiteren Gewebeproben von Patientinnen überprüft und durch andere experimentelle Methoden untermauert werden.

Neben der Differential Display Methode, mit der die hier gezeigten Ergebnisse erhalten wurden, besteht die Möglichkeit, weitere Tumorgewebeproben von Ovarien hinsichtlich der Genexpressionsunterschiede durch den Einsatz von cDNA Microarrays zu analysieren. Als weiterer Schritt bietet sich die Untersuchung auf Proteinebene an. So können Antikörper gegen die oben genannten differentiell exprimierten Proteine hergestellt werden, um die Genexpressionsunterschiede in Gewebeschnitten zahlreicher Tumorproben schnell und effektiv zu überprüfen. Mit diesen Ergebnissen könnten im nächsten Schritt von den klinischen Kooperationspartnern die Befunde auf molekularer- und Proteinebene mit den morphologischen Tumortypen korreliert werden. Mit Kenntnis dieser Zusammenhänge besteht unter Umständen die Möglichkeit, die Überlebenschancen zu bestimmen, eventuell die Therapie zu verbessern und als Fernziel eine deutlich verbesserte Diagnostik im Frühstadium der Tumorentstehung zu ermöglichen. Könnten aus erkannten Genexpressionsunterschieden Marker abgeleitet werden, die bereits zu einem Zeitpunkt eine Diagnose eines Ovar tumors ermöglichen, zu dem mit konventionellen Untersuchungsmethoden noch keinerlei Aussage möglich ist, kann eine Therapie in sehr frühem Stadium erfolgen und damit die Heilungschancen der betroffenen Patientin erheblich verbessern.

Ausgehend von den gefundenen Genexpressionsunterschieden werden sich Untersuchungen zur Funktion der kodierten Proteine auf molekularer Ebene anschließen. Nach der Expression der entsprechenden cDNAs können die rekombinanten Proteine auf ihre Funktion hin untersucht werden. Eine geeignete Methoden dazu ist beispielsweise die

regulierte Überexpression in Zellen oder die Einführung von antisense-Oligonukleotiden in den Zellkern von Zellkulturzellen, um die Expression des Proteins einzuschränken. Ein neues, sehr effektives Verfahren ist die sequenzspezifische posttranskriptionelle Stilllegung (Silencing) durch RNA-Interferenz mit doppelsträngigen RNA-Stücken von 21 Nukleotiden, die zum untersuchten Gen homolog sind (*Elbashir et al., 2001*).

Auswirkungen von Mutationen und Deletionen können detailliertere Aufschlüsse über die Wirkungsweise des Gens liefern. Die Wechselwirkung des Proteins mit anderen Proteinen kann durch Hefe-Zwei-Hybrid-Systeme analysiert und zusätzlich durch Immunpräzipitationen untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Durch den Vergleich der Genexpression in Tumorgewebe und Normalepithel von Patientinnen mit epithelialen Ovarialkarzinomen gelang es, mit dem Verfahren des Differential Displays, unterschiedlich exprimierte Gene zu identifizieren, die an der Entstehung von Ovarialtumoren beteiligt sein könnten. Die gefundenen Unterschiede wurden durch quantitative PCR mit genspezifischen Primern an mehreren Patientinnen bestätigt.

Eine Gruppe dieser Gene kodiert für Komponenten von Signalübertragungswegen. Dazu gehören die kleine GTPase K-ras, Prefoldin5/c-Myc bindendes Protein MM-1, eine kleine GTPase, die in der Literatur noch nicht beschrieben wurde, Rabin3 und ein neues Protein, das vermutlich Bindungspartner einer Kinase ist.

Der offene Leseraster des vermutlichen Kinase- Bindungspartners wurde durch Amplifikation von cDNA-Enden und Datenbankvergleich vervollständigt. Das Gen besteht aus mindestens 20 Exons und umfaßt etwa 165 kb. Es liegt in der Chromosomenbande 12q23-24.1 und kodiert für ein Transkript von 2999 bp. Durch Northern Blot-Analyse konnte die mRNA in allen untersuchten Geweben und Ovarialkarzinomzelllinien nachgewiesen werden. Das Protein ist 657 Aminosäurereste lang und besitzt eine Größe von etwa 74 kDa. Der vorhergesagte isoelektrische Punkt des Proteins liegt bei 4,79. Das Protein wurde rekombinant exprimiert. Es besitzt eine globuläre Struktur und verfügt über eine pleckstrin-homologe- und eine Phosphotyrosin-Bindungs-Domäne, die eine Interaktion mit der Plasmamembran und mit Kinasen wahrscheinlich erscheinen lassen.

Ein weiteres Gen kodiert für ein Protein mit vier doppelsträngigen RNA Bindungs-Domänen. Das Gen liegt in der Chromosomenbande 8q13 und besteht aus mehr als 14 Exons. Es kodiert für ein Transkript von 2968 bp. Aus der Nukleotidsequenz des 1710 bp langen offenen Leserasters konnte die Aminosäuresequenz des Proteins abgeleitet werden. Das Protein umfaßt demnach 570 Aminosäurereste und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 63 kDa sowie einen isoelektrischen Punkt von 10,4. Es könnte, wie das Staufens-Protein, das ebenfalls solche Domänen trägt, am Transport und der Lokalisation von mRNA beteiligt sein.

7 Literatur

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, D. (1995). *Molekularbiologie der Zelle*, 3. Auflage (VCH, Weinheim).

Alexandrova, N., Niklinski, J., Bliskovsky, V., Otterson, G. A., Blake, M., Kaye, F. J. und Zajac-Kaye, M. (1995). The N-terminal domain of c-Myc associates with α -Tubulin and Microtubules in vivo and in vitro, *Mol. Cell. Biol.* 15, 5188-5195.

Auersperg, N., Edelson, M. I., Mok, S. C., Johnson, S. W. und Hamilton, T. C. (1998). The biology of ovarian cancer, *Semin. Oncol.* 25, 281-304.

Auersperg, N., Pan, J., Grove, B. D., Peterson, T., Fisher, J., Maines-Bandiera, S., Somasiri, A. und Roskelley, C. D. (1999). E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6249-6254.

Banks, E., Beral, V. und Reeves, G. (1997). The epidemiology of epithelial ovarian cancer a Review, *Int. J. Gynecol. Cancer* 7, 425-438.

Becker, N. und Wahrendorf, J. (1997). *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990*, 3. Auflage (Springer, Berlin).

Bellacosa, A., de Feo, D., Godwin, A. K., Bell, D. W., Cheng, J. Q., Altomare, D. A., Wan, M., Dubeau, L., Scambia, G., Masciullo, V. und et al. (1995). Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas, *Int. J. Cancer* 64, 280-285.

Bottomley, M. J., Salim, K. und Panayotou, G. (1998). Phospholipid-binding protein domains, *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 165-183.

Broadus, J., Fuerstenberg, S. und Doe, C. Q. (1998). Stufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate, *Nature* 391, 792-795.

Brondyk, W. H., McKiernan, C. J., Fortner, K. A., Stabila, P., Holz, R. W. und Macara, I. G. (1995). Interaction cloning of Rabin3, a novel protein that associates with the Ras-like GTPase Rab3A, *Mol. Cell. Biol.* 15, 1137-1143.

Bycroft, M., Grunert, S., Murzin, A. G., Proctor, M. und St Johnston, D. (1995). NMR solution structure of a dsRNA binding domain from *Drosophila* stufen protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5, *Embo J.* 14, 3563-3571.

Callard, D., Lescure, B. und Mazzolini, L. (1994). A method for the elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique, *Biotechniques* 16, 1096-1097, 1100-1093.

Carpenter, C. L. und Cantley, L. C. (1996). Phosphoinositide kinases, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8, 153-158.

Chen, Y., Farmer, A. A., Chen, C. F., Jones, D. C., Chen, P. L. und Lee, W. H. (1996). BRCA1 is a 220-kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle-dependent manner, *Cancer Res.* 56, 3168-3172.

- Cheng, J. Q., Godwin, A. K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T. F., Hamilton, T. C., Tschlis, P. N. und Testa, J. R. (1992). AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein- serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9267-9271.
- Chuaqui, R. F., Zhuang, Z. und Merino, M. J. (1997). Molecular genetic events in the development and progression of ovarian cancer in humans, *Mol Med Today* 3, 207-213.
- Church, G. M. und Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1991-1995.
- Claus, E. B. und Schwartz, P. E. (1995). Familial ovarian cancer. Update and clinical applications, *Cancer* 76, 1998-2003.
- Czernobilsky, B., Moll, R., Levy, R. und Franke, W. W. (1985). Co-expression of cytokeratin and vimentin filaments in mesothelial, granulosa and rete ovarii cells of the human ovary, *Eur. J. Cell Biol.* 37, 175-190.
- Daly, M. und Orams, G. I. (1998). Epidemiology and risk assessment for ovarian cancer, *Semin. Oncol.* 25, 255-264.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. und Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery, *Cell* 91, 231-241.
- Dove, S. K., Cooke, F. T., Douglas, M. R., Sayers, L. G., Parker, P. J. und Michell, R. H. (1997). Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis, *Nature* 390, 187-192.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. und Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature* 411, 494-498.
- Ellis, C. A. und Clark, G. (2000). The importance of being K-Ras, *Cell Signal* 12, 425-434.
- Emmert-Buck, M. R., Bonner, R. F., Smith, P. C., Chuaqui, R. F., Zhuang, Z., Goldstein, S. R., Weiss, R. A. und Liotta, L. A. (1996). Laser capture microdissection, *Science* 274, 998-1001.
- Erdelyi, M., Michon, A. M., Guichet, A., Glotzer, J. B. und Ephrussi, A. (1995). Requirement for *Drosophila* cytoplasmic tropomyosin in oskar mRNA localization, *Nature* 377, 524-527.
- Facchini, L. M. und Penn, L. Z. (1998). The molecular role of Myc in growth and transformation recent discoveries lead to new insights, *Faseb J.* 12, 633-651.
- Fathalla, M. F. (1971). Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia?, *Lancet* 2, 163.
- Filmus, J. E. und Buick, R. N. (1985). Stability of c-K-ras amplification during progression in a patient with adenocarcinoma of the ovary, *Cancer Res.* 45, 4468-4472.
- Frost, M. R. und Guggenheim, J. A. (1999). Mammalian polyadenylation sites implications for differential display, *Nucleic Acids Res.* 27, 1386-1391.
- Gallion, H. H., Pieretti, M., DePriest, P. D. und van Nagell, J. R., Jr. (1995). The molecular basis of ovarian cancer, *Cancer* 76, 1992-1997.

- Graf, D., Fisher, A. G. und Merckenschlager, M. (1997). Rational primer design greatly improves differential display-PCR (DD-PCR), *Nucleic Acids Res.* 25, 2239-2240.
- Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P. und Eisenman, R. N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 653-699.
- Haslam, R. J., Koide, H. B. und Hemmings, B. A. (1993). Pleckstrin domain homology, *Nature* 363, 309-310.
- Hough, C. D., Cho, K. R., Zonderman, A. B., Schwartz, D. R. und Morin, P. J. (2001). Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer, *Cancer Res.* 61, 3869-3876.
- Hubank, M. und Schatz, D. G. (1994). Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA, *Nucleic Acids Res.* 22, 5640-5648.
- Hynes, R. O. (1986). Fibronectins, *Sci. Am.* 254, 32-41.
- Ingley, E. und Hemmings, B. A. (1994). Pleckstrin homology (PH) domains in signal transduction, *J. Cell Biochem.* 56, 436-443.
- Janeway, C.A. und Travers, P. (1995). *Immunologie*, 1. Auflage (Spektrum, Heidelberg).
- Kharrat, A., Macias, M. J., Gibson, T. J., Nilges, M. und Pastore, A. (1995). Structure of the dsRNA binding domain of *E. coli* RNase III, *Embo J.* 14, 3572-3584.
- Knippers, R. (1997). *Molekulare Genetik*, 7. Auflage (Thieme, Stuttgart).
- Kupryjanczyk, J. und Karpinska, G. (1998). Desmin expression in reactive mesothelium a potential aid in evaluation of gynecologic specimens, *Int. J. Gynecol. Pathol.* 17, 123-128.
- Ledakis, P., Tanimura, H. und Fojo, T. (1998). Limitations of differential display, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 653-656.
- Lemmon, M.A. und Ferguson, K.M. (2000). Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains, *Biochem. J.* 350, 1-18.
- Liang, P. (1998). Factors ensuring successful use of differential display, *Methods* 16, 361-364.
- Liang, P. und Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction, *Science* 257, 967-971.
- Liang, P. und Pardee, A. B. (1995). Recent advances in differential display, *Curr. Opin. Immunol.* 7, 274-280.
- Liang, P. und Pardee, A. B. (1997). Differential display. A general protocol, *Methods Mol. Biol.* 85, 3-11.
- Liang, P., Averboukh, L. und Pardee, A. B. (1994). Method of Differential Display, *Methods Mol. Genetics* 5, 3-16.
- Linskens, M. H. K., Tonkin, L. A. und Saati, S. M. (1998). Enhanced Differential Display a reproducible method for the analysis of differential gene expression, *Cell Biol.* 4, 275-280.

- Lisitsyn, N. und Wigler, M. (1993). Cloning the differences between two complex genomes, *Science* 259, 946-951.
- Liu, A. X., Testa, J. R., Hamilton, T. C., Jove, R., Nicosia, S. V. und Cheng, J. Q. (1998). AKT2, a member of the protein kinase B family, is activated by growth factors, v-Ha-ras, and v-src through phosphatidylinositol 3-kinase in human ovarian epithelial cancer cells, *Cancer Res.* 58, 2973-2977.
- Luce, M. J. und Burrows, P. D. (1998). Minimizing false positives in differential display, *Biotechniques* 24, 766-768, 770.
- Ludwig, K. S. (1998). The Mayer-Rokitansky-Kuster syndrome. An analysis of its morphology and embryology. Part I Morphology, *Arch. Gynecol. Obstet.* 262, 1-26.
- Ludwig, K. S. (1998). The Mayer-Rokitansky-Kuster syndrome. An analysis of its morphology and embryology. Part II Embryology, *Arch. Gynecol. Obstet.* 262, 27-42.
- Lynch, H. T., Casey, M. J., Lynch, J., White, T. E. und Godwin, A. K. (1998). Genetics and ovarian carcinoma, *Semin. Oncol.* 25, 265-280.
- Maecker, H. T., Todd, S. C. und Levy, S. (1997). The tetraspanin superfamily molecular facilitators, *Faseb J.* 11, 428-442.
- Martin, K. J. und Pardee, A. B. (1999). Principles of differential display, *Methods Enzymol.* 303, 234-258.
- Martin-Satue, M. und Blanco, J. (1999). Identification of semaphorin E gene expression in metastatic human lung adenocarcinoma cells by mRNA differential display, *J. Surg. Oncol.* 72, 18-23.
- Matz, M. V. und Lukyanov, S. A. (1998). Different strategies of differential display areas of application, *Nucleic Acids Res.* 26, 5537-5543.
- Mayer, B. J., Ren, R., Clark, K. L. und Baltimore, D. (1993). A putative modular domain present in diverse signaling proteins, *Cell* 73, 629-630.
- Menzin, A. W., Loret de Mola, J. R., Bilker, W. B., Wheeler, J. E., Rubin, S. C. und Feinberg, R. F. (1998). Identification of oncofetal fibronectin in patients with advanced epithelial ovarian cancer detection in ascitic fluid and localization to primary sites and metastatic implants, *Cancer* 82, 152-158.
- Micklem, D. R., Adams, J., Grunert, S. und St. Johnston, D. (2000). Distinct roles of two conserved Stauf domains in oskar mRNA localization and translation, *Embo J.* 19, 1366-1377.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W. und et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1, *Science* 266, 66-71.
- Mitsuuchi, Y., Johnson, S. W., Moonblatt, S. und Testa, J. R. (1998). Translocation and activation of AKT2 in response to stimulation by insulin, *J. Cell. Biochem.* 70, 433-441.

- Mitsuuchi, Y., Johnson, S. W., Sonoda, G., Tanno, S., Golemis, E. A. und Testa, J. R. (1999). Identification of a chromosome 3p14.3-21.1 gene, APPL, encoding an adaptor molecule that interacts with the oncoprotein-serine/threonine kinase AKT2, *Oncogene* 18, 4891-4898.
- Mok, S. C., Bell, D. A., Knapp, R. C., Fishbaugh, P. M., Welch, W. R., Muto, M. G., Berkowitz, R. S. und Tsao, S. W. (1993). Mutation of K-ras protooncogene in human ovarian epithelial tumors of borderline malignancy, *Cancer Res.* 53, 1489-1492.
- Mok, S. C., Chan, W. Y., Wong, K. K., Muto, M. G. und Berkowitz, R. S. (1996). SPARC, an extracellular matrix protein with tumor-suppressing activity in human ovarian epithelial cells, *Oncogene* 12, 1895-1901.
- Mok, S. C., Wong, K. K., Chan, R. K., Lau, C. C., Tsao, S. W., Knapp, R. C. und Berkowitz, R. S. (1994). Molecular cloning of differentially expressed genes in human epithelial ovarian cancer, *Gynecol. Oncol.* 52, 247-252.
- Monteiro, A. N. A. (2000). BRCA1 exploring the links to transcription, *TIBS* 25, 469-474.
- Moore, K.L. (1973). *The developing Human*, (Saunders Company).
- Mori, K., Maeda, Y., Kitaura, H., Taira, T., Iguchi-Arigo, S. M. und Ariga, H. (1998). MM-1, a novel c-Myc-associating protein that represses transcriptional activity of c-Myc, *J. Biol. Chem.* 273, 29794-29800.
- Ness, R. B. und Cottreau, C. (1999). Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer, *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 1459-1467.
- Niklinski, J., Claassen, G., Meyers, C., Gregory, M. A., Allegra, C. J., Kaye, F. J., Hann, S. R. und Zajac-Kaye, M. (2000). Disruption of Myc-Tubulin interaction by hyperphosphorylation of c-Myc during mitosis or by constitutive hyperphosphorylation of mutant c-Myc in Burkitt's Lymphoma, *Mol. Cell. Biol.* 20, 5276-5284.
- Okochi, H., Mine, T., Nashiro, K., Suzuki, J., Fujita, T. und Furue, M. (1999). Expression of tetraspans transmembrane family in the epithelium of the gastrointestinal tract, *J. Clin. Gastroenterol.* 29, 63-67.
- Page, C., Lin, H. J., Jin, Y., Castle, V. P., Nunez, G., Huang, M. und Lin, J (2000). Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis, *Anticancer Res.* 20, 407-416
- Pere, H., Tapper, J., Seppala, M., Knuutila, S. und Butzow, R. (1998). Genomic alterations in fallopian tube carcinoma: comparison to serous uterine and ovarian carcinomas reveals similarity suggesting likeness in molecular pathogenesis, *Cancer Res.* 58, 4274-4276.
- Perez-Canadillas, J. M. und Varani, G. (2001). Recent advances in RNA-protein recognition, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 53-58.
- Rameh, L. E., Chen, C. S. und Cantley, L. C. (1995). Phosphatidylinositol (3,4,5)P₃ interacts with SH2 domains and modulates PI 3-Kinase association with tyrosin-phosphorylated proteins, *Cell* 83, 821-830.
- Rameh, L. E., Tolias, K. F., Duckworth, B. C. und Cantley, L. C. (1997). A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, *Nature* 390, 192-196.

- Rebecchi, M. J. und Scarlata, S. (1998). Pleckstrin homology domains a common fold with diverse functions, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct* 27, 503-528.
- Romberger, D. J. (1997). Fibronectin, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 939-943.
- Rouvier, E., Luciani, M. F., Mattei, M. G., Denizot, F. und Golstein, P. (1993). CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene, *J. Immunol.* 150, 5445-5456.
- Runnebaum, I. B. und Stickeler, E. (2001). Epidemiological and molecular aspects of ovarian cancer risk, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127, 73-79.
- Ryter, J. M. und Schultz, S. C. (1998). Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA, *Embo J.* 17, 7505-7513.
- Sagerstrom, C. G., Sun, B. I. und Sive, H. L. (1997). Subtractive cloning past, present, and future, *Annu. Rev. Biochem.* 66, 751-783.
- Smith, N. R., Li, A., Aldersley, M., High, A. S., Markham, A. F. und Robinson, P. A. (1997). Rapid determination of the complexity of cDNA bands extracted from DDRT-PCR polyacrylamide gels, *Nucleic Acids Res* 25, 3552-3554.
- St Johnston, D. (1995). Developmental biology. New role for tropomyosin, *Nature* 377, 483.
- St Johnston, D., Beuchle, D. und Nusslein-Volhard, C. (1991). Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg, *Cell* 66, 51-63.
- St Johnston, D., Brown, N. H., Gall, J. G. und Jantsch, M. (1992). A conserved double-stranded RNA-binding domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10979-10983.
- Staal, S. P. (1987). Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2 Amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5034-5037.
- Thomas, J. O. und Kornberg, R. D. (1975). An octamer of histones in chromatin and free in solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2626-2630.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- Vainberg, I. E., Lewis, S. A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Klein, H. L. und Cowan, N. J. (1998). Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin, *Cell* 93, 863-873.
- van Niekerk, C. C., Vooijs, P., Casparie-van Velsen, I. J. und Poels, L. G. (1997). Differentiation margins of ovarian tumor pathology first incidences of epithelial ovarian tumors monitored by marker antibodies, *Cancer Detect. Prev.* 21, 247-257.
- Venkitaraman, A. R. (2001). Chromosome stability, DNA recombination and the BRCA2 tumour suppressor, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13, 338-343.

von der Kammer, H., Albrecht, C., Mayhaus, M., Hoffmann, B., Stanke, G. und Nitsch, R. M. (1999). Identification of genes regulated by muscarinic acetylcholine receptors application of an improved and statistically comprehensive mRNA differential display technique, *Nucleic Acids Res.* 27, 2211-2218.

von Stein, O. D., Thies, W. G. und Hofmann, M. (1997). A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes, *Nucleic Acids Res.* 25, 2598-2602.

Welsh, J.B., Zarrinkar, P.P., Sapinoso, L.M., Kern, S.G., Behling, C.A., Monk, B.J., Lockhart, D.J., Burger, R.A. und Hampton, G.M. (2001). Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1176-1181.

Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I. R. und DesGroseillers, L. (1999). Mammalian stau6 is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum, *Mol. Cell Biol.* 19, 2220-2230.

Woolnough, E., Russo, L., Khan, M. S. und Heatley, M. K. (2000). An immunohistochemical study of the rete ovarii and epoophoron, *Pathology* 32, 77-83.

Yamada, T., Endo, R., Gotoh, M. und Hirohashi, S. (1997). Identification of semaphorin E as a non-MDR drug resistance gene of human cancers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14713-14718.

Yuan, Z. Q., Sun, M., Feldman, R. I., Wang, G., Ma, X., Jiang, C., Coppola, D., Nicosia, S. V. und Cheng, J. Q. (2000). Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer, *Oncogene* 19, 2324-2330.

Hiermit erkläre ich an Eides statt,
daß ich die vorliegende Arbeit selbständig
und ohne unerlaubte Hilfsmittel
durchgeführt habe.

Heidelberg, im Juni 2001