



---

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
in der Helmholtz-Gemeinschaft

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 7159

# **Chips und ASAP1: funktionelle Genomik der Tumormetastasierung**

**T. Müller**

Institut für Toxikologie und Genetik

November 2005



**Forschungszentrum Karlsruhe**  
in der Helmholtz-Gemeinschaft  
Wissenschaftliche Berichte  
FZKA 7159

# **Chips und ASAP1: funktionelle Genomik der Tumormetastasierung**

Thomas Müller  
Institut für Toxikologie und Genetik

Von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
der Universität Karlsruhe (TH)  
genehmigte Dissertation

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe**  
**2005**

**Impressum der Print-Ausgabe:**

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

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

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

**ISSN 0947-8620**

**urn:nbn:de:0005-071591**

# **Chips und ASAP1: funktionelle Genomik der Tumormetastasierung**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN**

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der  
Universität Karlsruhe (TH)  
genehmigte

**DISSERTATION**

von

**Diplom-Biologe Thomas Müller**

**aus Ettlingen**

Dekan: Prof. Dr. M. Kappes

Referent: PD Dr. Jonathan P. Sleeman

Korreferent: Prof. Dr. Margot Zöller

Tag der mündlichen Prüfung: 21. April 2005



## Zusammenfassung

Mittels Suppressions-Subtraktions-Hybridisierung (SSH) wurden über ein differentielles Screening Gene identifiziert, die mit Tumorprogression und Metastasierung assoziiert sind. Insgesamt 268 Gene werden in den hoch-metastatischen Zelllinien ASML und MTLy überexprimiert, nicht jedoch in ihren nicht-metastatischen Gegenstücken.

Während meiner Doktorarbeit war es zunächst das Ziel, unter diesen Genen diejenigen zu identifizieren, welche in einem weiteren Tumorprogressionsmodell ebenfalls differentiell exprimiert werden und eine Korrelation zum metastatischen Phänotyp aufweisen. Dies geschah mit Hilfe der DNA-Mikroarray-Technologie. Alle 268 SSH-Gene, die sich in zwei subtraktiven Bibliotheken befanden, wurden auf Glaschips gespottet und mit Fluoreszenz-markierter cDNA aus der nicht-metastatischen Zelllinie G und der hoch-metastatischen Zelllinie MatLylu hybridisiert. Anhand der Auswertung dieser Hybridisierungen konnten 40 Gene identifiziert werden, die Assoziation zum metastatischen Phänotyp in unterschiedlichen Tumorprogressionssystemen zeigen. Unter diesen Genen befinden sich zahlreiche Gene, die bereits im Zusammenhang mit Tumorprogression oder Metastasierung in der Literatur beschrieben sind. Es wurden außerdem Gene identifiziert, die in diesem Zusammenhang noch nicht in der Literatur Erwähnung finden und einige noch völlig unbeschriebene Gene (novels).

Unter den identifizierten Genen, die noch nicht im Zusammenhang mit der Tumorprogression oder der Metastasierung beschrieben sind, befindet sich das Gen ASAP1. Dieses Gen wurde für weiterführende Charakterisierungen ausgewählt. ASAP1 ist ein Multidomänenprotein, das mit zahlreichen Proteinen interagieren kann. Unter den bereits beschriebenen Interaktionspartnern befinden sich die Tyrosinkinasen Src, Crk, FAK und Pyk2. Interaktionen mit ARF1 und ARF5, zwei Mitgliedern der Ras-Superfamilie, sind ebenfalls in der Literatur beschrieben. Weitere bereits identifizierte Interaktionspartner sind das Phospholipid PIP2 und das in den EGF-Rezeptor-Verkehr eingreifende Strukturprotein CIN85. Mit diesen Interaktionspartnern kann ASAP1 in für die Metastasierung wichtigen Modifikationen des Membranverkehrs, des Actinskeletts, des Phospholipidmetabolismus und des Zellwachstums eingreifen. *In situ* Hybridisationen, welche mit humaner ASAP1-cDNA durchgeführt wurden und immunhistochemische ASAP1 Expressionsstudien, mit von mir generierten anti- huASAP1-Antikörpern (IHC), zeigten eine Assoziation der ASAP1-Expression zum neoplastischen Phänotyp. Um nun Einblicke in die Funktion von ASAP1 hinsichtlich der Tumorprogression und der Metastasierung zu bekommen, wurde der Phänotyp von nicht-metastatischen 1AS-Bsp73 Zellen untersucht, die sowohl transient als auch stabil ASAP1 überexprimieren. Hierfür wurde eine von mir neu identifizierte konstitutiv aktive Spleißvariante von ASAP1 eingesetzt (rASAP1c). Es wurde ebenfalls der Phänotyp von hochmetastatischen ASML-Bsp73 Zellen untersucht, die transient oder stabil dominant negative ASAP1-Konstrukte überexprimieren. 1AS-Zellen, die ASAP1 überexprimieren, zeigen im Vergleich mit Vektorkontrollen in *in vitro* Wundheilungsexperimenten eine erhöhte Motilität, was darauf hinweist, dass ASAP1 zu der Gruppe von Genen zählt, die für die Regulation der Zellmigration verantwortlich ist. Die Überexpression von ASAP1 in 1AS-Zellen führt auch zu einer erhöhten Adhäsion an Fibronectin, wie *in vitro* Adhäsionsstudien zeigten. Diese Eigenschaft könnte z.B. über die Integrinsignalwege zu einer erhöhten Ausschüttung von Proteasen führen, was Pfade für die metastasierende Zelle in die extrazelluläre Matrix und durch Basalmembranen schaffen kann. Tierversuche mit 1AS-Tumoren, die rASAP1c überexprimieren, zeigten, dass diese Tumore zu Lungenmetastasen führen, was bei den Vektorkontrollen nicht der Fall war. Ebenfalls durchgeführte Tierversuche mit ASML-Tumoren, die dominant negative ASAP1-Varianten überexprimierten, zeigen dass die somit erreichte Blockierung der ASAP1-Funktion zu einer signifikanten Reduzierung der Metastasierung in die Lymphknoten und die Lunge führt.

Durch die vorliegende Arbeit konnten also Gene identifiziert werden, die in mehreren Tumorprogressionssystemen differentiell exprimiert sind. Zusätzlich konnte einem dieser Gene - ASAP1 - eine funktionelle Beteiligung beim Prozess der Metastasierung nachgewiesen werden.

## Chips and ASAP1: functional genomic of the tumour metastasis

### Abstract

The differential screening method of Suppression Subtractive Hybridisation (SSH) has been used to identify genes associated with tumour progression and metastasis. Together 268 genes have been found to be up-regulated in the highly metastatic cell lines ASML and MTLy in comparison to its non-metastatic counterparts.

In my thesis I have screened this group of genes to identify those that are differentially expressed in further tumour progression systems and show a correlation to the metastatic phenotype. This was achieved with the help of the DNA microarray technology. All the 268 genes were bound on glass chips and hybridised with fluorescent labeled cDNA isolated out of the non-metastatic cell line G and the highly metastatic cell line MatLylu.

As a result of the hybridisation assays 40 genes have been identified showing association to the metastatic phenotype in varying tumour progression systems. Numerous of these genes have already been described in the literature as being associated to tumour progression or metastasis. Some of the identified genes have not been reported being related to tumour progression or metastasis and some of these genes are completely unknown (novels).

One of these genes which has not been reported being related to tumour progression or metastasis is ASAP1. This gene was chosen for further studies. ASAP1 is a multiple domain protein that can interact with numerous proteins. Known interaction partners of ASAP1 are the tyrosine kinases Src, Crk FAK and Pyk2. Interactions with ARF1 and ARF5, two members of the Ras-superfamily have been described in the literature already.

Further known interaction partners of ASAP1 are the phospholipid PIP2 and the scaffold protein CIN85 a regulator of the EGF receptors trafficking. By interacting with the proteins ASAP1 can regulate important cell functions like membrane remodeling, cytoskeleton organization, phospholipid metabolism and cell growth.

An association to the neoplastic phenotype of the ASAP1 expression was revealed by in situ hybridisations with human cDNA and by immunohistochemistry assays using generated anti huASAP1 antibodies. To get an insight into the function of ASAP1, the phenotype of 1AS-Bsp73 cells transiently and stably overexpressing ASAP1 was studied. For these assays a newly identified constitutive active alternative spliced variant of ASAP1 (rASAP1c) was used. Further studies concerning the phenotype of highly metastatic ASML-Bsp73 cells transiently and stably overexpressing ASAP1 were performed.

1AS cells ectopically expressing ASAP1 exhibit a higher migration rate in wound healing assays in comparison to empty vector transfected cells, suggesting that ASAP1 belongs to the set of genes responsible for regulating cell migration. 1AS cells overexpressing ASAP1 showed elevated adhesion to fibronectin, which was proven by in vitro adhesion assays. This might lead to a higher secretion rate of proteases via integrin signalling pathways, and therefore generating paths through the extracellular matrix and basal membranes for the metastasizing cell.

Animal experiments with 1AS-tumours overexpressing ectopic rASAP1c showed that these tumours are generating lung metastases, which were not generated by empty vector expressing 1AS-tumours.

Blocking the ASAP1 function in the cell by overexpressing dominant negative ASAP1 constructs in ASML tumours is leading to a reduction of metastases formation to the lymph-nodes and the lung.

In my thesis I was able to identify genes being differentially expressed in various tumour progression systems. As a further step one of these genes – ASAP1- was identified being functionally involved in the process of tumour metastasis.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Vorbemerkung	1
1.2 Krebs	1
1.3 Metastasen	2
1.4 Die metastatische Kaskade	2
1.5 Adhäsion, Invasion und Motilität von Tumorzellen	4
1.5.1 EMT (epithelialer-zu-mesenchymaler Übergang)	4
1.5.2 Adhäsion	4
1.5.3 Proteolyse	6
1.5.4 Migration	7
1.5.5 Tumore und Angiogenese	7
1.5.6 Lymphangiogenese	8
1.6 Zu dieser Arbeit	8
1.6.1 Zugrunde liegende Hypothese	8
1.6.2 SSH - Subtraktive Suppressive Hybridisierung	9
1.6.3 Tumorprogressionssysteme	10
1.6.3.1 Das Bsp73-Rattenadenokarzinomsystem (Pankreas)	10
1.6.3.1.1 Bestätigung des metastatischen Potentials der Bsp73-Zelllinien	11
1.6.3.2 Das 13762NF-Rattenadenokarzinomsystem (Brust)	12
1.6.3.3 Das Dunning R3327 Rattenadenokarzinomsystem (Prostata)	12
1.6.4 Hintergrund der beiden zu untersuchenden subtraktiven Bibliotheken	14
1.6.5 DNA-Mikroarrays	15
1.6.6 Charakterisierung eines Metastasen-assoziierten Gens	16
1.6.6.1 ARF-GAP-Familie (Centaurine)	16
1.6.6.2 ARF-Proteine	16
1.6.6.3 Aufbau von ASAP1	17
1.6.6.4 Funktionen von ASAP1 in der Zelle	17
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	19
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1 Bezugsquellen der Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	21
2.2 Geräte	23
2.3 Radiochemikalien	24
2.4 Antikörper	24
2.4.1 Primärantikörper:	24
2.4.2 Sekundärantikörper:	24
2.5 Plasmide	24
2.6 Oligonukleotide	24
2.7 Pro- und eukaryotische Zelllinien	25
2.7.1 Prokaryotische Zellen:	25
2.7.2 Eukaryotische Zellen:	25
2.8 DNA-Methoden	26
2.8.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	26

2.8.2 Phenol/Chloroform Extraktion	26
2.8.3 Fällung von Nukleinsäuren	26
2.8.4 Agarose-Gelelektrophorese	26
2.8.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	26
2.8.6 Plasmid DNA Mini-Präparation	27
2.8.7 Plasmid-DNA Maxi-Präparation	27
2.8.8 PCR – Ansätze	27
2.8.9 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	28
2.8.10 Dephosphorylierung von DNA	28
2.8.11 Ligation von DNA-Fragmenten	28
2.8.12 TOPO-Klonierung	29
2.8.13 Radioaktive Markierung von cDNA	29
2.9 Gebrauch eines Matched Tumor/Normal Expression Array	29
2.10 Präparation elektrokompetenter Bakterien	29
2.11 Transformation durch Elektroporation:	29
2.12 RNA Methoden	30
2.12.1 Präparation von gesamt-RNA aus Zellen und Gewebe	30
2.12.2 Präparation von PolyA+ -RNA aus Zellen	30
2.12.3 RNA – Agarose – Gelelektrophorese	30
2.12.4 Northern Blot: Transfer von RNA auf Nylonmembran	31
2.12.5 Northern-Hybridisierung	31
2.12.6 Herstellung von cDNA aus PolyA+ -RNA	31
2.12.7 In situ Hybridisation	32
2.13 Methoden für die Herstellung und Benutzung von DNA-Mikroarrays	32
2.13.1 Reinigung des Amplikons und Kontrolle der PCR-Reaktion	32
2.13.2 Vorlage in 384-well Mikrotiterplatten für den Kontaktpotter	32
2.13.3 Fluoreszenzmarkierung von DNA und Hybridisierung	32
2.13.4 Hybridisierung	33
2.13.5 Waschen der Mikroarrays	33
2.13.6 Auslesen mit dem Axon 4000B	33
2.13.7 Statistische Auswertung	34
2.14 Proteinmethoden	35
2.14.1 Präparation von Zellen und Gewebe für Proteingele	35
2.14.2 Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)	35
2.14.3 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE	35
2.14.4 Analyse von Proteinen durch Transfer auf Membranen und Detektion durch spezifische Antikörper (Western Blot)	36
2.14.5 Radioaktive Immunpräzipitation von Proteinen (hot-IP)	36
2.14.6 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	37
2.14.7 Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen	37
2.14.8 Immunhistochemie	37
2.15 Antikörperproduktion und Aufreinigung	38
2.15.1 Aufreinigung des huASAP1-GST-Fusionsproteins	38
2.15.2 Immunisierung von Mäusen zur Herstellung monoklonaler ASAP1-Antikörper	39
2.15.3 Vorbereitung der Hybridom-Bildung	39
2.15.4 Hybridom-Bildung	39
2.15.5 Testen der Klone	40

2.15.6	Aufreinigung der Antikörper	40
2.16	Benutzung eines SH3 TransSignal SH3 Domain Array	40
2.17	Zellkulturmethoden	40
2.17.1	Passagieren von Zellen	40
2.17.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	40
2.17.3	Stabile und transiente Transfektionen mit GenePORTER	41
2.17.4	Ermittlung der Transfektionseffizienz	41
2.18	Funktionelle in vitro Methoden	41
2.18.1	Wundheilungsexperiment (Kratzassay)	41
2.18.2	Adhäsionsexperimente	42
2.18.3	Proliferationsexperimente	42
2.18.4	Ermittlung der Apoptoserate	42
2.19	Tiermethoden	42
2.19.1	Tumorwachstum und Metastasierungsexperimente in Ratten	43
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1	Charakterisierung zweier subtraktiver Bibliotheken	45
3.1.1	DNA-Mikroarray-Design	45
3.1.2	Amplifizierung und Aufreinigung der SSH-Klone	46
3.1.3	Spotten der SSH-Klone auf die Glaschips	47
3.1.4	Auswahl der Zelllinien für die Hybridisation der DNA-Mikroarrays	48
3.1.5	Hybridisation und Auswertung der DNA-Arrays	49
3.2	Charakterisierung von ASAP1	51
3.2.1	Differentielle Expression von ASAP1 in Rattentumorprogressionsmodellen	51
3.2.2	ASAP1-Expressionsstudien in humanen Tumoren im Vergleich zu Normalgeweben	52
3.2.3	In situ Hybridisation von menschlichen Tumorschnitten mit Fluoreszenz-markierter ASAP1-mRNA	55
3.2.4	Herstellung monoklonaler anti-ASAP1-Antikörper	57
3.2.4.1	Präparation eines ASAP1-GST-Fusionsproteins	57
3.2.4.2	Testen der in den Hybridomüberständen enthaltenen Antikörper	57
3.2.5	Charakterisierung der monoklonalen anti-ASAP1-Antikörper	58
3.2.5.1	Strip Westerns mit aufgereinigtem Protein zum Testen der anti-ASAP1- Antikörper	59
3.2.5.2	Expression von ASAP1 in menschlichen Kolonkarzinomzellen	60
3.2.5.3	Monoklonale anti-human-ASAP1-Antikörper kreuzreagieren mit Ratten-ASAP1	60
3.2.5.4	Differentielle Expression von ASAP1 im Bsp73 Pankreassystem der Ratte	61
3.2.5.5	Immunpräzipitation von ASAP1	61
3.2.5.6	Bestimmung der Lokalisation von ASAP1-Protein in der Zelle über Immunfluoreszenz	62
3.2.5.7	Immunohistochemie (IHC) mit monoklonalen anti-ASAP1-Antikörpern auf humanen SW1116-Kolonkarzinom-Tumorschnitten	64
3.2.5.8	Immunohistochemie (IHC) mit monoklonalen anti-ASAP1-Antikörpern auf ASML-Rattentumorschnitten	66
3.2.5.9	Zusammenfassung der anti-ASAP1-Antikörper-Charakterisierung	67
3.2.6	Immunohistochemische Analysen menschlicher Tumor-/Normalgewebe zeigen, dass ASAP1 in Tumoren hochreguliert ist.	68
3.2.7	Isolation der kompletten Länge der Ratten-ASAP1-cDNA	70
3.2.7.1	5'- RACE	70
3.2.7.2	Identifikation dreier Spleißvarianten von rASAP1	72

3.2.8 Funktionelle Analysen von ASAP1	74
3.2.8.1 Hintergrund zu den ASAP1-Konstrukten	74
3.2.8.2. Adhäsion	75
3.2.8.2.1 Transient transfiziertes rASAP1 erhöht die Adhäsion von 1AS-Tumorzellen zu Fibronectin	77
3.2.8.3 Zellstreckung in vitro	79
3.2.8.4 In vitro Wundheilungsversuch	80
3.2.8.5. Proliferation	82
3.2.8.6 Apoptose	86
3.2.9. Identifikation von ASAP1-Interaktionspartnern anhand eines SH3-Domain-Arrays	88
3.2.10 Tierversuche zur in vivo Analyse von mit ASAP1-Konstrukten stabil transfizierten 1AS- und ASML-Rattentumorzellen	90
3.2.10.1 Generation stabil transfizierter ASAP1 überexprimierender Zelllinien	90
3.2.10.2. In vivo Analyse von mit ASAP1-Konstrukten stabil transfizierten 1AS- Rattentumorzellen	92
3.2.10.3 In vivo Analyse von mit ASAP1-Konstrukten stabil transfizierten ASML-Rattentumorzellen	96
<b>4. Diskussion</b>	<b>99</b>
4.1 Charakterisierung zweier subtraktiver Bibliotheken durch DNA-Mikroarrays	99
4.2 Identifikation Metastasen-assoziiierter Gene	99
4.3 Charakterisierung des Metastasen-assoziierten Gens ASAP1	101
4.3.1 Assoziation der ASAP1-Expression zum neoplastischen Phänotyp	101
4.3.2 Modulationen für die Metastasierung wichtiger Zellfunktionen durch ASAP1	101
4.3.3 Beeinflussung des metastatischen Phänotyps durch ASAP1	101
4.4 Mögliche Mechanismen der Tumorprogression und Metastasierung	102
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>A-I</b>
<b>Abbildungen und Tabellen</b>	<b>A-XI</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>A-XIII</b>
<b>Danksagung</b>	<b>A-XV</b>

# 1. Einleitung

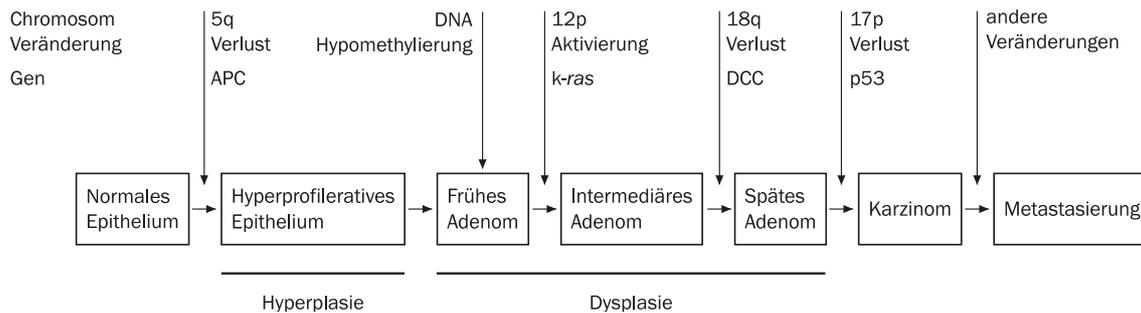
## 1.1 Vorbemerkung

Die metastatische Ausbreitung von Tumorzellen ist verantwortlich für eine Großzahl der Krebstoten. Deshalb ist der, aus klinischer Sicht, interessanteste Punkt bei der Tumorentwicklung die Erwerbung des metastatischen Potentials. Bis zum heutigen Tag sind die Mechanismen, welche die Metastasierung regulieren, kaum verstanden. Aus diesem Grund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Identifizierung der Gene, die spezifisch in metastatischen Zellen überexprimiert werden.

Im folgenden wird eine kurze Übersicht über Mechanismen und Moleküle, die bei der Entstehung und der Progression von Tumoren und Metastasen beteiligt sind gegeben.

## 1.2 Krebs

Krebs kann man knapp als den zellulären Verlust der proliferativen und räumlichen Kontrolle definieren (Schwarz et al., 1988). Diese Definition drückt aus, dass sich Tumorzellen von nicht-transformierten Zellen in ihrer Proliferationskapazität als auch in Ihrer Fähigkeit in umgebende Gewebe einzudringen und zu Metastasieren unterscheiden. Die Entstehung eines Tumors kann vielfältige Ursachen haben. Es gibt Tumore, die durch Viren wie Hepatitis B-, Hepatitis C-, Papilloma- oder RNA-Tumorviren ausgelöst werden können. In den meisten Fällen sind jedoch spontane oder vererbte genetische Veränderungen (Mutationen) für die Tumorentstehung verantwortlich. Die spontanen Veränderungen können durch exogene Mutagene wie UV- und radioaktive Strahlung oder kanzerogene Stoffe ausgelöst werden. Krebs entsteht allerdings nicht durch eine einzige Mutation, sondern durch die Anhäufung mehrerer Mutationen. Dies kann man durch das Multi-Hit-Modell zur schrittweisen Tumorprogression (Fearon und Vogelstein, 1990) veranschaulichen. Dieses Modell basiert auf der Tumorgenese im kolorektalen Karzinom und postuliert, dass sich Tumoren in einem Prozess klonaler Evolution entwickeln, der durch Mutationen gesteuert wird. Jeder Krebs entsteht also aus einer einzelnen Vorläuferzelle (klonales Wachstum), die durch eine genetische Veränderung einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen neoplastischen Zellen des Tumors erwirbt. Es wird angenommen, dass mindestens fünf Mutationen notwendig sind, damit sich aus einer normalen Zelle ein invasiver Tumor entwickelt.



**Abb. 1.1 Ein genetisches Modell für die schrittweise klonale Tumorgenese**

Als Beispiele für die Veränderungen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen sind APC, k-ras, DCC und p53 aufgeführt. Die Art und Anzahl der tatsächlich involvierten Gene kann variieren. Nicht die Reihenfolge, sondern die Anhäufung der Ereignisse ist ausschlaggebend für die Entwicklung eines invasiven Karzinoms. Die Entwicklung kann sich über mehrere Jahre hinziehen, nach Fearon und Vogelstein, 1990.

### 1.3 Metastasen

Der Begriff Metastasierung beschreibt die Streuung von Tumorzellen aus einem Primärtumor und die Bildung von Tochter Tumoren an entfernten Stellen des Körpers. Damit eine Tumorzelle metastatisch wird, muss sie sich eine große Anzahl von Fähigkeiten aneignen, die ihr erlauben sich vom Primärtumor zu lösen, durch die Basalmembran und extrazelluläre Matrix (ECM) zu wandern, in Blut- und/oder Lymphgefäße einzudringen und in diesem Mikromilieu zu überleben (Fearon und Vogelstein, 1990; Fidler et al., 1978, 1990). In den Gefäßsystemen müssen die Metastasen Immunantworten überleben und die Fähigkeit haben sich an Endothelzellen zu haften, um bei der Extravasation in sekundäre Organgewebe durch die Endothelschicht hindurch zu gelangen. Im Organparenchym komplettiert die Proliferation den Prozess der Metastasierung. Um eine messbare Tumorgroße zu erreichen, müssen die Metastasen ihr eigenes Gefäßsystem entwickeln, da metastatische Zellen ohne Angiogenese keinen Tumor entwickeln können, dessen Durchmesser größer als 2 mm ist (Folkmann, 1989, 1990, 1995; van Roy et al., 1992; Hart et al., 1989; Ahmad et al., 1996).

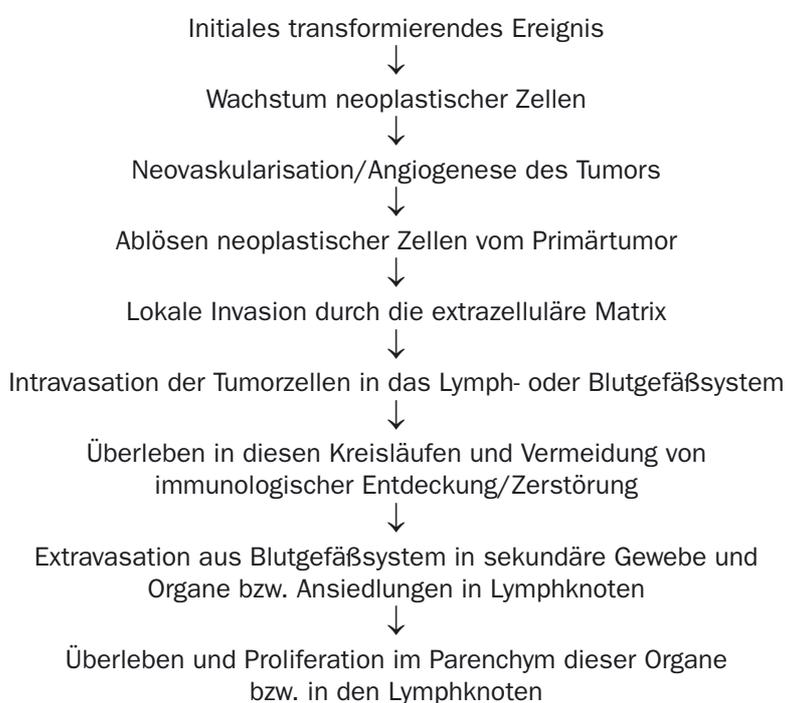
Sie müssen den Immunreaktionen entgehen und auf organspezifische Faktoren reagieren, die ihren Wachstum beeinflussen. Wenn sie sich so weit entwickelt haben, können sich ihre Zellen durch das Stroma bewegen und Blutgefäße penetrieren um im Blutkreislauf sekundäre Metastasen zu bilden, das ist die so genannte Metastasierung von Metastasen (Fidler, 1995).

### 1.4 Die metastatische Kaskade

Untersuchungsergebnisse zeigen, dass die Tumorgenese und die Metastasenentwicklung nicht notwendigerweise das Resultat der gleichen genetischen Veränderungen sind (Fidler & Radinsky, 1990; Liotta et al.; 1991). So führen definierte Mutationen in Protoonkogenen bei Zellen zu tumorartigen Merkmalen, wogegen ihr metastatisches Potential nicht aktiviert wird (Price et al.; 1989). In der Tat kann man die charakteristischen Merkmale dieser zwei Prozesse, jedenfalls zum Teil, trennen. Die Entwicklung von unbeschränktem Wachstum, ist auf erworbene Unabhängigkeit gegenüber Wachstumsfaktoren und auf dem Verlust der Kontaktinhibition zurückzuführen, während die Metastasenentwicklung auf gesteig-

gerte Zellmotilität, der Expression von bestimmten Proteasen und der Veränderung der Expression von Zell- und Matrixadhäsionsmolekülen zurückzuführen ist. Die angehäuften Mutationen in der genomischen DNA von neoplastisch transformierten Zellen, könnten die Expression von Genen hochregulieren, welche entweder Zellwachstum, Mobilität und Angiogenese verstärken, oder Zellteilung und Differenzierung unterdrücken (Fearon et al., 1990).

Während der fortschreitenden Entwicklung des Tumors entsteht eine Auswahl von Zellvarianten mit angehäuften genomischen und phänotypischen Abnormalitäten, dies führt zu heterogenen Tumoren. Diese, durch die genetische Instabilität hervorgerufenen heterogenen Primärtumore (Tlsty, 1998), erzeugen Populationen von Tumorzellen, welche die nötigen Eigenschaften für die Invasion, die Wanderung und die Koloniebildung metastatischer Zellen in anderen Organen besitzen (Fidler, 1978). Diese Ereignisse sind unter dem Begriff „metastatische Kaskade“ bekannt.



**Abb. 1.2 Die einzelnen Schritte der metastatischen Kaskade.**

(Hart et al.; 1989) verändert nach Sleeman (1998). Nach dem initialen transformierenden Ereignis, folgen acht weitere Schritte bis zum sekundären Tumor, die alle erfolgreich durchlaufen werden müssen. Fehler in irgendeiner Phase verhindern die Metastierung.

## 1.5 Adhäsion, Invasion und Motilität von Tumorzellen

Invasive Tumorzellen müssen drei Eigenschaften besitzen, um den Primärtumor verlassen zu können:

1. Sie müssen ihre eigenen oder fremde Adhäsionsmoleküle modifizieren können, da diese für Interaktionen zwischen Tumorzellen untereinander, zwischen Tumorzellen und Stromazellen, Endothelzellen, dem intestinalen Stroma und der Basalmembran verantwortlich sind.
2. Sie müssen zur Proteolyse fähig sein, um die Basalmembran abzubauen und sich durch Stromazellen und der extrazellulären Matrix bewegen zu können. Für die Proteolyse produzieren und sekretieren Tumorzellen entweder selbst Proteasen, stimulieren umgebende Zellen dazu, oder sie erzeugen Faktoren, welche lokal vorhandene Proteasen aktivieren.
3. Sie müssen zur Bewegung fähig sein. Die Vorwärtsbewegung von Zellen erfolgt mittels Vorstoßen von Pseudopoden, gefolgt von Translokation und Einziehen des nachfolgenden Zellkörpers. Die Migration von Krebszellen wird durch parakrine und autokrine Bewegungsfaktoren stimuliert (Price et al., 1997).

### 1.5.1 EMT (epithelialer-zu-mesenchymaler Übergang)

Die meisten Tumorzellen sind epitheliale Ursprungs (Karzinome), und der Wechsel vom normalen zum metastasierenden Phänotyp erfordert drastische Änderungen im genetischen als auch im physiologischen Programm der Zellen, was als epithelial-zu-mesenchymaler Transition (EMT) bezeichnet wird (Birchmeier, 1995). Das Ergebnis dieses Wechsels sind Änderungen in der adhäsiven Fähigkeit der Zellen, Umgestaltung des Cytoskeletts, Erkennung chemotaktischer und haptotaktischer Reize, proteolytische Prozessierung und Ausschüttung von ECM-Proteinen (Schmitz et al., 2000).

### 1.5.2 Adhäsion

Die Vermittler der Adhäsion sind die Zelladhäsionsmoleküle. Diese repräsentieren eine sehr große Gruppe von Oberflächenmolekülen, welche in Zell-Zell und Zell-Matrix Wechselwirkungen eingebunden sind. Ihre Modifizierung macht den Prozess der Metastasierung erst möglich, da keine Metastasen gebildet werden können, wenn die Tumorzellen über ihre Zelladhäsionsmoleküle mit anderen Zellen im Primärtumor eng verbunden bleiben würden (Van Roy et al., 1992). In der Anfangsphase der Metastasierung muss also eine wichtige Veränderung im Phänotyp einiger Tumorzellen passieren, von stationären eng aneinander gebundenen Zellen müssen sie zu Zellen mit verminderter Adhäsionsfähigkeit bzw. herunterregulierten Adhäsionsmolekülen werden (Jouanneau et al., 1991). Auf diese Weise erlangen sie die Fähigkeit den Primärtumor zu verlassen und in die Lymph- und Blutgefäßen zu wandern. Nach dem Eindringen in die Kreislaufsysteme müssen die Zellen wiederum ihre Adhäsionsmolekülausstattung verändern, um an die Basalmembran der Kapillarendothelien zu binden und diese zu durchdringen (transendotheliale Wanderung) oder um in den Lymphknoten zu verweilen, zu proliferieren und anschließend über den Blutkreislauf und dessen Kapillarendothelien in sekundäre Gewebe einzudringen.

Die Zelladhäsionsmoleküle, die an diesen Interaktionen beteiligt sind, können aufgrund ihrer Struktur in vier Superfamilien eingeteilt werden, nämlich die Integrine, Cadherine, Immunglobuline und andere Adhäsionsmoleküle.

Integrine sind transmembrane Glycoproteine, zusammengesetzt aus  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten, welche zu nichtkovalent gebundenen, heterodimeren Komplexen assoziieren (Hynes, 1992). Die Kombination von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten bestimmt ihre Ligandenspezifität. Da die Anzahl der möglichen Heterodimere relativ hoch ist, können auch viele unterschiedliche extrazelluläre Proteinliganden gebunden werden, wie z.B. Laminin, Fibronectin, Vitronectin, Tenascin, Thrombospondin und Kollagene (Hynes, 1992). Als Beispiel für die Beteiligung dieser Moleküle bei der Tumorprogression sollen hier kurz die Integrine  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$  und  $\alpha 6\beta 1$  erwähnt werden, deren Hochregulierung in menschlichen Melanomen mit dem metastatischen Potential und der Zellbeweglichkeit korreliert (Danen et al., 1993). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Integrine mit Metalloproteinasen (MMPs) assoziieren und diese somit auf der Oberfläche von metastatischen Tumorzellen binden können. Die Bindung aktiver Proteasen auf der Oberfläche ermöglicht diesen Zellen eine koordinierte Matrixdegradation und zelluläre Bewegung, womit sie die Tumorzellinvasion fördern (Brooks et al., 1996).

Cadherine sind eine Familie von Zelloberflächenmolekülen, welche Calcium-abhängige, homophile Zell-Zell und Zell-Matrix Verbindungen vermitteln, wobei E-Cadherin auch mit einem Integrin, welches auf einer Untergruppe von Lymphozyten exprimiert wird, interagieren kann (Cepek et al., 1990). Es konnte gezeigt werden, dass verminderte oder abwesende E-Cadherin-Expression in epithelialen Tumorzellen zu einem Anstieg des invasiven Potentials führt und mit einigen epithelialen Karzinomzelllinien assoziiert ist (Frixen et al., 1991; Matsuura et al., 1992; Girolodi et al., 1994; Shiozaki et al., 1996; Behrens 1993). Für N-Cadherin wurde eine wichtige Rolle bei der Zellmigration, Tumorinvasion und Metastasierung nachgewiesen (Hazan et al., 1997). Es konnte auch gezeigt werden, dass N-Cadherin die Expression der Matrix-Metalloprotease MMP-9 hochreguliert und bei exogener Expression in Brustkrebszellen Zellmigration, Invasion und Metastasierung induziert (Hazan et al., 2000).

Die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) besteht aus einer großen Zahl von transmembranen, Calcium-unabhängigen Molekülen, welche sowohl zu heterophilen als auch zu homophilen Interaktionen fähig sind. Die Expression einiger Mitglieder dieser Familie kann durch Cytokine hochreguliert werden. Mitglieder der Superfamilie sind unter anderen der T-Zell-Rezeptor, CD2, CD4, CD8 (MHC-Moleküle), zelluläre Adhäsionsmoleküle (CAM), wie z.B. ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 (interzellulär), VCAM (vaskulär), NCAM (Neuralleiste), PeCAM (Plättchen endothelial), CCAM (Epithel), CEA (karzinoembryonales Antigen), (Pignatelli et al., 1994; Zetter, 1993). Der wohl gebräuchlichste Tumormarker CEA vermittelt über homophile Bindungen die Aggregation von Krebszellen und vermittelt das „homing“ kolorektaler Krebszellen in der Leber (Johnson, 1991; Jothy et al., 1995).

Von der vierten Superfamilie der Adhäsionsmoleküle sollen hier noch kurz die Selektine und CD44 besprochen werden.

Selektine vermitteln Interaktionen zwischen Leukozyten und Gefäßwänden. Sie sind von besonderer Bedeutung dafür, dass Leukozyten ihre Bestimmungsort

in spezifischen Geweben finden (homing) (Crockett-Torabi und Fantone, 1995). Sie können auf Leukozyten (L-Selektin), Blutplättchen (P-Selektin) und vaskulären Endothel (E-Selektin) exprimiert werden (Springer und Lasky, 1991). Ihre Bedeutung bei der Ausbreitung von Metastasen liegt darin, dass sie beim Ein- und Austritt von Tumorzellen in und aus dem Blutkreislaufsystem beteiligt sind. Sie vermitteln diesen Vorgang, indem sie bei der Bindung der Metastasen an das Endothelium - über die von den Tumorzellen exprimierten Kohlenhydratantigene beteiligt sind (Shimizu & Shaw, 1993).

Das Adhäsionsmolekül CD44 wurde ursprünglich als sog. lymphocyte homing-Rezeptor beschrieben, der die Adhäsion von spezialisierten Endothelzellen in den HEV (high endothelial venules) vermittelt (Jalkanen et al., 1991; Rudy et al., 1993). Darüber hinaus konnte eine Expression varianter Formen von CD44 in verschiedenen Tumorarten nachgewiesen werden (Übersichtsartikel: Ponta & Herrlich, 1998)

### 1.5.3 Proteolyse

Die Proteolyse ist notwendig, um die extrazelluläre Matrix (ECM) im interstitiellen Stroma und die Basalmembran, welche die Epithelzellen gegen das Bindegewebe abgrenzt, zu durchdringen. Die Bausteine der Basalmembran, die für das Durchdringen abgebaut werden müssen, sind u.a. Glycoproteine, die mit unterschiedlichen Proteinen (v.a. Kollagen IV) kreuzvernetzen und andere Komponenten, wie Laminin, Proteoglycane, Entactin und Osteonektin (Ahmad und Hart, 1996). Diese Prozesse werden zum Teil durch spezifische proteolytische Enzyme vermittelt, wie z.B. Serinproteasen und Matrix Metalloproteinasen.

Serinproteasen sind eine Familie von Endopeptidasen, die einen Serinrest in ihrem aktiven Zentrum besitzen (Duffy, 1993). Mitglieder dieser Familie sind u.a. Trypsin, Thrombin, Plasmin und Plasminogen Aktivatoren. Die Plasminogen Aktivatoren sind am besten charakterisiert, weshalb ich mich auf diese Serinproteasen beschränke. Die Plasminogen Aktivatoren katalysieren die Reaktion vom inaktiven Plasminogen in das aktive Plasmin, was eine Breitspektrum-Protease ist, die für die Degradation von vielen ECM Komponenten verantwortlich ist, wie z.B. Fibrin, Fibronectin, Laminin, und bestimmte Prokollagenasen (Testa, 1990). Es existieren zwei Formen, erstens der Gewebetyp Plasminogen Aktivator (tPA), der für intravaskuläre Fibrinolyse zuständig ist, und zweitens der Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA), der für die zellvermittelte Proteolyse bei der Makrophageninvasion, Wundheilung, Embryogenese, Invasion und Metastasierung verantwortlich ist (Price et al., 1997). Der Plasminogen Aktivator uPA besitzt viele Funktionen, wie die direkte Aktivierung von Prokollagenasen, Abbau von Fibrinogen und Gewebeinhibitoren von Metalloproteinasen (DeClerk und Laug, 1996), und es wirkt auf bestimmte Zelllinien mitogen (Kirchheimer et al., 1989). Diese Aktivitäten lassen darauf schließen, dass uPA zwei Funktionen bei der Metastasierung ausübt, erstens den Abbau von ECM-Komponenten und zweitens die Förderung der Tumorzellmigration und Proliferation. Die Matrix Metalloproteinasen (MMPs) präsentieren eine Gruppe von Proteasen, die bei der Degradierung der ECM beteiligt sind. Es sind 16 Familienmitglieder bekannt, welche folgende Eigenschaften besitzen: Sie werden in einer inaktiven Form sekretiert (zymogen) und anschließend durch andere Proteasen aktiviert. ECM-Komponenten stellen ihr natürliches Substrat dar, und ihre Aktivität wird durch Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen, den

sogenannten TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs) inhibiert. Nach ihrer Substratspezifität lassen sich drei Gruppen von MMPs unterscheiden. Erstens Kollagenasen mit fibrillären Kollagenen als Substrat, zweitens Stromelysine mit Proteoglykanen und Glycoproteinen als Substrat und drittens Gelatinasen mit nicht fibrillären und denaturierten Kollagenen als Substrat. Zusätzlich gibt es noch MMPs, die nicht in die oben genannten Kategorien fallen. Obwohl man berücksichtigen muss, dass Korrelationen zwischen Proteaselevel, Tumorstadium und Metastasierung nicht generalisierbar sind (Duffy, 1987, 1992), unterstreichen die Expressionsmuster der MMPs ihre Rolle bei der Tumorprogression.

#### **1.5.4 Migration**

Zellmotilität ist ein zentraler Punkt im Verlauf der Tumormetastasierung. Lokale Invasion, Intra- und Extravasation von Tumorzellen sind ohne Zellbewegungen nicht zu bewerkstelligen (Price et al., 1997). Zellbewegungen können durch eine Vielzahl von Substanzen ausgelöst werden, wie z.B. ECM-Komponenten oder vom Tumor sekretierte Faktoren (Kantor und Zetter, 1996; Levine et al., 1995). Die Moleküle, die Einfluss auf die Zellmigration haben, können in vier Gruppen eingeteilt werden: Zelloberflächenmoleküle wie z.B. die Integrine, Cytoskelettmoleküle wie z.B. Actin, Signalmoleküle wie FAK und Rho GTPasen und Chemoattraktanten wie Wachstumsfaktoren und Cytokine. Auf einige dieser Faktoren werde ich in Abschnitt 1.6.6 der Einleitung eingehen.

#### **1.5.5 Tumore und Angiogenese**

Ziel der metastatischen Krebszellen ist es, in anderen Organen und Geweben Kolonien zu bilden. Damit sich diese Kolonien auch weiterhin vermehren können, ist die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) zur Versorgung dieser Tumorzellen notwendig (Folkman, 1995). Die schlechte Blutversorgung und der daraus resultierende Mangel an Sauerstoff (hypoxia) initiiert die Angiogenese, indem es über eine Rückkopplungsreaktion zu Neovaskulation (Blutgefäßbildung) führt (Stein et al., 1995). Wie schon oben erwähnt, können metastatische Zellen ohne Angiogenese keine Tumore über 2 mm Durchmesser bilden (Folkman, 1989, 1990). Die Rückkopplungsreaktion zur Initiierung der Angiogenese wird durch den Wachstums- und Permeabilitätsfaktor vascular endothelial growth factor (VEGF = VPF, vascular permeability factor) gesteuert (Shweiki et al., 1992). VEGF ist sehr wirksam bei der Induzierung der Blutgefäßbildung (Senger et al., 1993). Die Expression von VEGF korreliert mit der Blutgefäßbildung, der Metastasierung und der Proliferation von menschlichen und tierischem Krebs (Übersichtsartikel: Claffey und Robinson, 1996). Nach dem Start des Gefäßwachstums werden die weiteren Interaktionen zwischen Wirt und Tumor durch andere Zytokine gesteuert, wie z.B. Fibroblasten Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor, FGF) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ), welche sowohl die Vaskularisation, die Tumorgroße als auch das metastatische Wachstum steigern (Übersichtsartikel:

Norrby, 1997).

### **1.5.6 Lymphangiogenese**

Tumorzellen metastasieren über das lymphatische System zu den regionalen Lymphknoten und schließlich in größere Lymphgefäße, welche in das Blutkreislaufsystem einmünden. Morphologische Studien konnten klar nachweisen, dass die Lymphgefäße in der Peripherie der Tumore zahlreicher auftreten, größer und durchlässiger sind, wogegen die Lymphgefäße im Tumor selbst nicht mehr funktionsfähig sind (Pandera et al., 2002). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass der mechanische Stress durch das Wachstum des Tumors die zahlreichen Lymphgefäße im Tumor zusammenpresst, wogegen die Lymphgefäße in der Peripherie durch die erhöhte Ausschüttung des lymphangiogenen Faktors VEGF-c das Wachstum der Lymphgefäße beschleunigt. In Tumorgewebe führt die beobachtete Hochregulierung von VEGF-c und seinen Rezeptor flt-4 zu einer verstärkten Aussprossung von Lymphgefäßen und damit zu einer erhöhten Metastasierungsrate in die Lymphknoten (Yang et al., 2001)

### **1.6 Zu dieser Arbeit**

Im Rahmen meiner Dissertation soll bestimmt werden, welche der kürzlich durch SSH-Screens als metastasenassoziiert identifizierten Brust- und Pankreaskarzinom-Gene eine funktionelle Rolle bei der Tumormetastasierung spielen.

Durch diese Experimente sollen Zielgene für diagnostische und therapeutische Methoden identifiziert werden.

#### **1.6.1 Zugrunde liegende Hypothese**

Trotz der immensen Bedeutung der Tumormetastasierung in der klinisch-onkologischen Praxis ist die molekulare Biologie dieses pathophysiologischen Vorgangs noch immer unverstanden. Hierfür gibt es mehrere plausible Gründe: Zum einen unterscheiden sich die möglichen Zielorgane verschiedener metastasierender Tumortypen, zum anderen ist der Vorgang der Streuung von Tumorzellen im Körper sehr komplex und erfordert vermutlich Änderungen in der Expression einer Vielzahl von Genen (Fearon und Vogelstein, 1990; Fidler et al., 1978, 1990).

Wie oben in der Einleitung ausführlich geschildert, muss sich eine Tumorzelle für den Prozess der Metastasierung eine große Anzahl von Fähigkeiten aneignen, die ihr erlauben sich vom Primärtumor zu lösen, durch die Basalmembran und extrazelluläre Matrix zu wandern, in Blut- und Lymphgefäße einzudringen und in diesem Mikromilieu zu überleben (Duffy et al., 1992). In den Gefäßsystemen müssen die Metastasen Immunantworten überleben und die Fähigkeit haben durch die Endothelschicht hindurch zu gelangen. Letztendlich müssen dann die Proliferation und die Induktion der Angiogenese im besiedelten Organparenchym stattfinden (Folkmann et al., 1989, 1990, 1995; van Roy et al., 1992; Hart et al., 1989; Ahmad et al., 1996).

Trotz der teilweise unterschiedlichen Zielorgane verschiedener metastasierender Tumortypen sind die Mechanismen, welche zur Dissemination der Tumorzellen führen, die Routen, welche die Metastasen durch den Organismus nehmen und der

Selektionsdruck, den die Tumorzellen überstehen müssen, für viele unterschiedlichen Krebsarten ähnlich. Aus diesen Grund kann man annehmen, dass Tumorzellen aus unterschiedlichen Tumortypen gemeinsame Eigenschaften benötigen und ähnliche Metastasen-fördernde Gene exprimieren (Sleeman, 2000).

Viele fundamentale Fragen müssen auf diesem Gebiet noch beantwortet werden: Wie viele Gene sind an dieser metastatischen Prozess beteiligt und welche Gene werden für die Bildung von Metastasen unbedingt benötigt? Werden die Tumorzellen durch viele unterschiedlichen Gene oder durch bestimmte Gruppen von Genen zur Metastasierung befähigt? Bis zu welchem Ausmaß werden Gene, die keine Rolle bei der Metastasierung spielen, als Folge der genetischen Instabilität während der Entwicklung zum metastatischen Phänotyp, hochreguliert?

Um Antworten auf diese wichtigen Fragen zu finden, ist es notwendig das Repertoire von Genen zu beschreiben und zu vergleichen, welche speziell in den metastasierenden Zellen, aber nicht in ihren nicht-metastasierenden Gegenstücken exprimiert werden.

Die Identifizierung dieser Metastasen-spezifischen Gene wird Erkenntnisse über die Mechanismen der Metastasierung liefern, und das Begreifen dieser Mechanismen, würde eine Vielzahl von diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten zur Behandlung von Krebs eröffnen.

Eine effiziente Methode zur Isolation genau dieser Gene ist die SSH (Diatchenko et al., 1996; Zhang et al., 1997).

### **1.6.2 SSH - Subtraktive Suppressive Hybridisierung**

Diese etablierte Methode erlaubt die Isolation von differenziell exprimierten Genen, welche mit den unterschiedlichen Eigenschaften von Tumorzellen assoziiert sind (Diatchenko et al., 1996; Zhang et al., 1997). Die Methode der Subtraktiven Suppressiven Hybridisierung (SSH, Subtractive Suppression Hybridization) funktioniert folgendermaßen.

Zwei Populationen von mRNAs werden revers transkribiert, so dass doppelsträngige (ds) cDNAs entstehen, welche mit einer Endonuclease geschnitten werden, um ihre durchschnittliche Länge auf 200-800 Basenpaaren zu beschränken, was die spätere Hybridisation der kompatiblen Stränge erleichtert. Die beiden Populationen werden aufgeteilt in „Driver“, welche als die Population von mRNA definiert wird, die bei der Subtraktion eliminiert wird und „Tester“, welche zusätzlich die differentiell exprimierten Gene beinhaltet, die von Interesse sind.

Nach dem Endonukleaseverdau wird die „Tester“-Population in zwei gleiche Aliquots aufgeteilt und an zwei unterschiedliche Adaptoroligonucleotide ligiert, so dass zwei Subpopulationen entstehen, die sich nur durch ihre unterschiedlichen Adapter unterscheiden. Die beiden Subpopulationen werden denaturiert und jede separat an die in 30-fachen Überschuß dazu gegebene „Driver“-cDNA hybridisiert. Dieser Schritt normalisiert die cDNA-Populationen, welche durch die „Driver“ und „Tester“ mRNA entstanden sind und verhindert dadurch eine Überrepräsentation in einer Bibliothek. Auf diese Art wird ein Transkript, dessen Ausgangsmenge hoch in der Relation zum „Driver“ ist, mit hoher Wahrscheinlichkeit an die kompatible „Driver“-Sequenz hybridisiert, so dass die Konzentration der einzelsträngigen cDNA dieses Genes reduziert

wird. Andererseits, wird ein Transkript mit niedriger Ausgangskonzentration, nicht vollständig an die „Driver“-Sequenzen hybridisieren (da die Wahrscheinlichkeit proportional zur Ausgangsmenge ist), so dass die Konzentration der einzelsträngigen cDNA nahezu unverändert bleibt. Im Endeffekt werden differentiell exprimierte cDNAs mit hoher Ausgangskonzentration reduziert und differentiell exprimierte cDNAs mit niedriger Ausgangskonzentration bleiben unverändert.

Nach der Normalisation werden beide Hybridisationsansätze vereinigt und noch einmal an einem in 30-fachen Überschuss dazu gegebenen, denaturierten „Driver“ hybridisiert. Von der ersten Hybridisation können nur die verbliebenen einzelsträngigen cDNAs mit den komplementären „Driver“-Sequenzen Hybride bilden. Die cDNA, die keine komplementären Sequenzen bei der „Driver“-cDNA haben, binden sich statt dessen an die komplementären „Tester“-cDNAs. Es sind exakt diese Hybride (ein Strang von der „Tester“-Subpopulation mit dem einen Adaptor, verbunden mit dem komplementären Strang der anderen „Tester“-Subpopulation mit dem zweiten Adaptor), welche die Basis der Subtraktion bilden, da es die einzigen Hybride sind, die zur exponentialen Amplifikation mit zwei unterschiedlichen Primern – komplementär zu den zwei unterschiedlichen Adaptoren – fähig sind. Die Unterdrückung der PCR Amplifikation passiert bei den Hybriden, welche die selben Adaptoren an beiden Enden der einzelsträngigen cDNA-Moleküle haben (invertierte terminale Wiederholungen). Bei jedem „primer annealing“-Schritt bevorzugt die Hybridisationskinetik die Bildung von hantelartigen Strukturen (Pan-like), welche die erfolgreiche Anlagerung der Primer verhindern und somit die Amplifikation des Stranges unterdrücken. Das Resultat ist eine selektive Amplifikation und Anreicherung von cDNAs, die nur aus „Tester“-Population stammen. Die differentiell exprimierten cDNAs werden dann in einen geeigneten Vektor kloniert, so dass eine Bibliothek erschaffen wird, welche die angereicherten, differenziert exprimierten cDNAs der „Tester“-Population enthält. Mit dieser Technik kann man die exprimierte mRNA nicht-metastatischer Tumorzellen (Driver) von der exprimierten mRNA metastatischer Tumorzellen (Tester) subtrahieren und somit eine Bibliothek mit Metastasen-spezifischen Genen erschaffen.

Auf diese Weise wurden zwei subtraktive Bibliotheken erschaffen (die subtraktive Pankreas-Adenokarzinom-spezifische Bibliothek – PLSSH von Stein, 1997 und die subtraktive Brust-Adenokarzinom-spezifische Bibliothek – MLSSH, Nestl, 2000), deren Gene durch die hier vorliegende Arbeit weiter charakterisiert werden sollen.

### **1.6.3 Tumorprogressionssysteme**

Für die Generation der beiden subtraktiven Bibliotheken, als auch für meine weiterführenden Arbeiten mit diesen Genen, wurden Zelllinien dreier gut charakterisierter Tumorprogressionssysteme herangezogen. Diese Systeme waren das Bsp73-Ratten-Adenokarzinomsystem (Pankreas), das 13762NF-Ratten-Adenokarzinomsystem (Brust)- und das Dunning R3327 Ratten-Adenokarzinomsystem (Prostata). Aus diesen Grund möchte ich hier auf diese drei Systeme genauer eingehen.

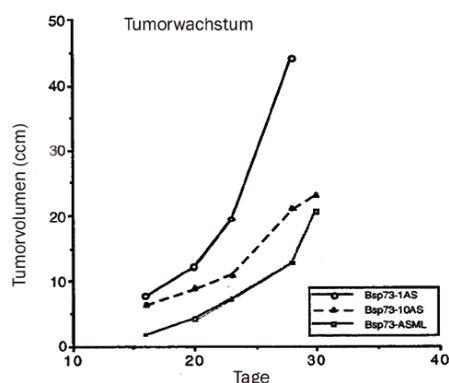
#### **1.6.3.1 Das Bsp73-Rattenadenokarzinomsystem (Pankreas)**

Ausgangsmaterial war ein Rattentumorsystem (Bsp73, Pankreasadenokarzinom-System), welches sich aus verschiedenen genetisch eng verwandten Zelllinien

zusammensetzt. Das Zellsystem besteht aus zwei Subzelllinien mit ansteigender metastatischer Kapazität (Bsp73-10AS und Bsp-73-ASML), deren Ursprung in der nichtmetastatischen, parentalen Zelllinie Bsp73-1AS liegt. Im Vergleich zu 1AS ist die ASML-Zelllinie *in vivo* hochmetastatisch. Bsp73 entstand spontan im Jahre 1979 (Matzku et al. 1983) als intraperitoneale Knoten zusammen mit Aszites. Histologisch wurden die Knoten als Adenokarzinom des Pankreas klassifiziert. Durch serielle subkutane (s.c.) Transplantationen der Asciteszellen entstanden zwei Varianten, die nichtmetastasierenden Bsp73-AS und die metastasierenden Bsp73-ASML. Die AS-Zelllinie bildet solide Tumore nach subkutaner Impfung und die Zellen wandern aktiv in benachbartes normales Gewebe, wobei sie aber keine Metastasen in entfernten Organen bilden. Die ASML-Zelllinie bildet nach der s.c. Impfung nur lockere Anhäufungen von Tumorzellen, welche schnell die ipsilateral gelegenen, regionalen, Lymphknoten kolonisieren und sich anschließend über das Lymphsystem ausbreiten um schließlich zahlreiche Metastasen in der Lunge zu bilden. Intravenös verabreicht bilden beide Zelltypen Knoten in der Lunge, was schließlich in der metastatischen Ausbreitung in andere Organe mündet (Knierim et al., 1986b; Paweletz et al., 1986). Des weiteren unterscheiden sich die beiden Zelllinien in ihrer Morphologie, Adhärenz und in ihrer Sensitivität gegenüber Trypsinisierung (Weling et al., 1985; Knierim et al., 1986a; Paku et al., 1986; Raz et al., 1986). In dem von mir verwendeten System repräsentiert die Zelllinie 1AS die nicht metastatische, parentale Zelllinie, von welcher die beiden anderen Linien (10AS, ASML) als Subklone mit unterschiedlicher metastatischer Kapazität hervorgehen. Aus diesem Grund sind alle drei Zelllinien isogen. Die Linien 1AS und 10AS bilden, wie die Zelllinie ASML (s.o.) nach s.c. Injektion in syngene Ratten lokale Tumore (Paweletz et al., 1982). Wobei 1AS keine Metastasen bildet und 10AS im Vergleich zu ASML nur in geringer Zahl in die Lunge und die Lymphknoten metastasiert.

### 1.6.3.1.1 Bestätigung des metastatischen Potentials der Bsp73-Zelllinien

Vor der Isolation von Genen, deren Überexpression mit dem metastatischen Phänotyp übereinstimmt, wurde getestet, ob das Verhalten des Zellsystems *in vivo*, mit dem in der Literatur beschriebenen Verhalten (Matzku et al., 1983) übereinstimmt. Für diesen Zweck wurden alle Zelllinien in männliche BD 10 Ratten s.c. injiziert und deren Wachstumsrate (relatives Tumolvolumen) aufgezeichnet (von Stein, Dissertation, 1998). Es wurden gezeigt, dass die relative Wachstumsrate des Primärtumors eine inverse Korrelation zur metastatischen Kapazität der Zelllinien aufweist, was mit den originalen Beobachtungen übereinstimmt (Matzku, 1983). Ein



**Abb. 1.3** Relative *in vivo* Wachstumsrate von drei isogenen pankreatischen Adenokarzinom-Zelllinien (von Stein, Dissertation, 1998). Die 1AS-Zelllinie ist nicht metastatisch in syngenen Ratten. 10AS hat eine geringe metastatische Kapazität, und ASML ist hochmetastatisch. Es zeigt sich, dass die relative Wachstumsrate des Primärtumors eine inverse Korrelation zur metastatischen Kapazität der Zelllinien aufweist.

in vivo Charakteristikum dieser Zelllinien ist, dass die nicht metastatischen Zelllinien am schnellsten wachsen (Abb. 1.3). Diese in vivo Daten veranschaulichen, dass die metastatischen Eigenschaften des Bsp73-Zellsystems wie erwartet sind und dass sich die metastatische Kapazität, im Vergleich zu dem Original-Zellsystem nicht verändert hat.

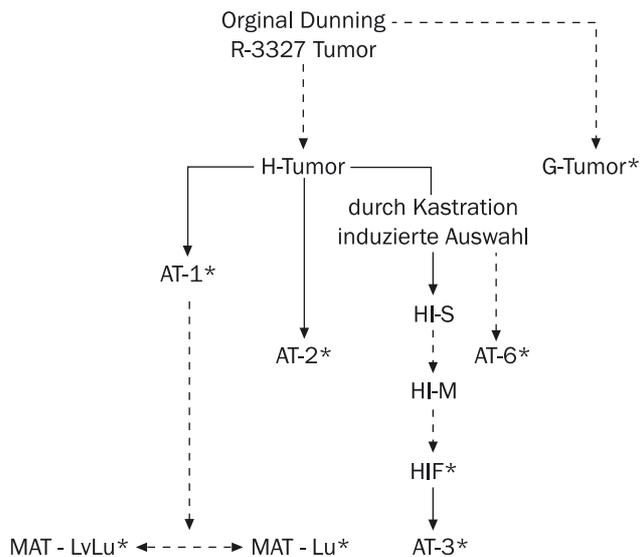
#### **1.6.3.2 Das 13762NF-Rattenadenokarzinomsystem (Brust)**

Das 13762NF-System besteht aus Adenokarzinom-Zelllinien, die aus einem Mammakarzinom und dessen Metastasen von Ratten des Fischer 344-CRBL-Stammes etabliert wurden (Neri et al., 1982). Die Zelllinie war von Segaloff et al. (1966), nach Induktion von Tumoren durch orale Verabreichung von 7,12-Dimethylbenz(a)anthrazin, isoliert worden. Ein induzierter Tumor wurde mehrmals in vivo in syngenen Ratten passagiert. Zur Etablierung unterschiedlicher Zelllinien wurde ein Tumorstück in das Fettgewebe der Brustdrüsen von Ratten implantiert. Nach Entstehung eines Primärtumors und von Sekundärtumoren in den Lymphknoten und der Lunge wurden die entsprechenden Organe entnommen und Zelllinien aus Einzelzellen etabliert (Neri et al., 1981b; Neri et al., 1982). In in vivo-Analysen wurden diese Zellen auf ihre Fähigkeit getestet, Metastasen, ausgehend von s.c. induzierten Tumorzellen, zu bilden. Aus dem Primärtumor wurden sowohl nicht metastatische als auch metastatische Zelllinien gewonnen. Die Zelllinien aus den Metastasen (MTLy, MTLn2, MTLn3) waren alle metastasierend, und alle zeigten stärkeres metastatisches Verhalten als die aus dem Primärtumor klonierten MTPa- und MTC-Linien (Neri et al., 1981a; Neri et al., 1982; North und Nicolson, 1985). Das Metastasierungsverhalten dieser Rattentumor-Zelllinien entspricht dem invasiver menschlicher Karzinome; der Ausbreitung über das lymphatische System in die regionalen Lymphknoten folgt die Streuung der Tumorzellen über die Blutbahn in die Zielorgane, wie Lunge und endet in der Kolonisierung von Knochen und Gehirn (North und Nicolson, 1985).

#### **1.6.3.3 Das Dunning R3327 Rattenadenokarzinomsystem (Prostata)**

Das Dunning-System besteht aus mehreren Zelllinien, die aus einem Prostatakarzinom und dessen Metastasen von Ratten des Kopenhagen-Stammes etabliert wurden (Isaacs et al., 1986). Der parentale Tumor, von dem alle in vivo Sublinien abstammen, ist der originale R3327-Tumor, welcher 1961 durch W. F. Dunning in einer 22 Monate alten männlichen Inzucht-Kopenhagen Ratte entdeckt wurde. Durch serielle in vivo Passagieren des originalen R3327-Tumors in syngenen Ratten, konnten 2 Subzelllinien mit unterschiedlichen biologischen Charakteristiken etabliert werden (Abb. 1.4). Einerseits die Androgen-sensitive, nicht metastasierende G-Sublinie (Block et al., 1977; Claflin et al., 1977), und andererseits die H-Sublinie, welche einen heterogenen Tumor bildet, der aus Androgen-abhängigen und -unabhängigen Klonen besteht (Smolev et al., 1977; Isaacs et al., 1981). Durch s.c. Injektion der H-Sublinie in kastrierte männliche Ratten, wurden die in vivo Androgen-unabhängige Tumorzellen HI-S etabliert (Isaacs et al., 1978), welche durch serielle s.c. Injektionen in kastrierte männliche Ratten zur Sublinie HI-M und diese zur schneller wachsenden Linie HI-F führten. Beim Passagieren dieser Zelllinie entstand schließlich ein komplett anaplastischer Tumor, bestehend aus der Zelllinie AT-3, die hochmetastatisch ist (Isaacs et al., 1982).

Durch s.c. Injektion der H-Sub-Zelllinie in intakte Ratten entstand durch zufällige Tumorprogression, bedingt durch die genetische Instabilität dieser Linie, ein anaplastischer Tumor, welcher als AT-1 bezeichnet wurde und ein geringes metastatisches Potential aufwies (Smoley et al., 1981; Isaacs et al., 1978; Isaacs et al., 1982). Nach weiteren seriellen Passagen dieser Zelllinie entstanden schließlich zwei unterschiedliche, hoch metastatische Sublinien, einerseits die Linie MatLyLu, welche Metastasen in den Lymphknoten und der Lunge bildet (Isaac et al., 1981) und andererseits die Linie MatLu, die nur in der Lunge Metastasen bildet (Lazan et al., 1982). 1981 wurde eine zweite schnell wachsende anaplastische Sublinie, die ihren Ursprung in der H-Linie hat entdeckt, die mit einem niedrigen metastatischen Potential ausgestattete Zelllinie AT-2 (Isaacs et al., 1982). Ebenfalls durch serielle Passagen in kastrierten Ratten entstand spontan die hochmetastatische Zelllinie AT-6, welche in der Lunge Metastasen bildet (Ichikawa et al., 1992). Neben den Unterschieden im metastatischen Potential - nicht metastasierende G-Sublinie, niedriges metastatisches Potential der Linien AT-1 und AT-2, hochmetastatische Linien AT-3, AT-6, MatLu und MatLyLu – bestehen auch Unterschiede zwischen den hochmetastatischen Zelllinien. So bilden die Sublinie AT-3 und MatLyLu zuerst Metastasen in den ipsilateralen regionalen Lymphknoten, gefolgt von Metastasenbildung in der Lunge und den entfernt gelegenen kontralateralen Lymphknoten. Die Zelllinie MatLu metastasiert via Blutbahn, da zuerst



**Abb. 1.4 Zusammenfassung der Entwicklung der Dunning Tumorsublinien.**

— = Progression des Tumors innerhalb einer einzigen Passage.

- - - = Progression des Tumor nach seriellen Passagen

\* = Tumor Sublinie, die als kontinuierliche Zelllinien etabliert wurden. (Isaacs et al, 1986)

Metastasen in der Lunge zu detektieren sind und anschließend, wenn überhaupt, Metastasen in den Lymphknoten (Isaacs et al., 1986)

#### 1.6.4 Hintergrund der beiden zu untersuchenden subtraktiven Bibliotheken

Die beiden subtraktiven Bibliotheken, deren große Anzahl von 268 Metastasen-assoziiierter Gene durch meine Arbeit auf wenige, aber für die Metastasierung essentielle Gene reduziert werden soll, wurden durch zwei unabhängige SSH-Methoden - mit nachfolgenden Screen- und Klonierungsschritten - aus zwei unterschiedlichen Ratten-Tumorprogressionsmodellen generiert. Einerseits wurde die subtraktive Pankreas-Adenokarzinom-spezifische Bibliothek (PLSSH von Stein, 1997) durch Subtraktion der nicht metastatischen Zelllinie 1AS von der hochmetastatischen Zelllinie ASML generiert, wobei 119 unterschiedliche Gene kloniert wurden, andererseits wurde die Brust-Adenokarzinom-spezifische Bibliothek (MLSSH Nestl, 2000) durch die Subtraktion der nicht metastatischen Zelllinie MTPa von der hochmetastatischen Zelllinie MTLy (Abb. 1.5) hergestellt, wobei 160 unterschiedliche Gene isoliert werden konnten. Beide Bibliotheken wiesen nur 11 gemeinsame Gene auf (Abb. 1.6), was auf den ersten Blick der Hypothese eines „metastatischen Programms von Genen“ widersprechen würde. Aus diesem Grund wurde aus jeder subtraktiven Bibliothek eine Anzahl von Genen zufällig gepickt und anhand von Northern Blot Analysen deren Expression im jeweils anderen Tumorprogressionsprogramm überprüft. Das Resultat war, dass über 90% der getesteten Gene auch im anderen Tumormodell differentiell exprimiert werden (Nestl et al., 2001). Die Erklärung für dieses Phänomen ist, dass die SSH keine komplett erfassende Methode darstellt, so dass mit jedem Versuch nur ein kleiner Ausschnitt differentiell exprimierter Gene identifiziert werden kann.

Die ursprüngliche Summe von 279 differentiell exprimierten Genen in bei-

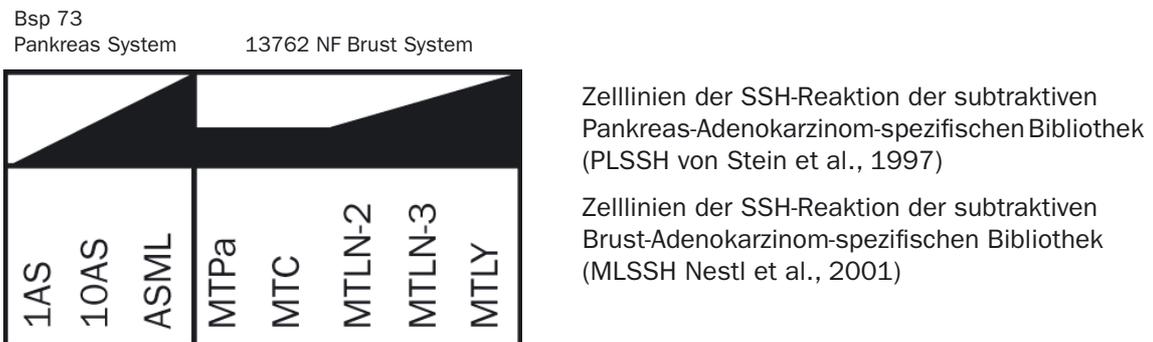
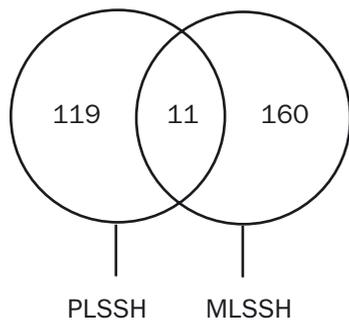


Abb. 1.5 Zwei Ratten-Tumorprogressionssysteme.

Die schwarzen Balken stellen das metastatische Potential der einzelnen Zelllinien dar, welches in jedem Tumorprogressionssystem von links nach rechts ansteigt.



Nach Sequenzanalysen:  
 PLSSH + MLSSH = 268 Gene

**Abb. 1.6 Numerische Verteilung differentiell exprimierter Gene in beiden subtraktiven Bibliotheken.**

In der PLSSH-Bibliothek (Pankreas) wurden 119 differentiell exprimierte Gene identifiziert und in der MLSSH-Bibliothek (Brust) 160 Gene. Beide Bibliotheken wiesen nur 11 gemeinsame Gene auf, jedoch anhand von Northern Blotanalysen konnte festgestellt werden, dass über 90% der getesteten Gene in beiden Tumorprogressionsmodellen differentiell exprimiert werden (Nestl, 2000).

den Bibliotheken konnte durch nachträgliche Sequenzanalysen auf 268 Gene reduziert werden. Diese differentiell exprimierten Gene sind auf der Internetseite <http://itgmv1.fzk.de/itg/sleman/ssh.html> aufgelistet.

### 1.6.5 DNA-Mikroarrays

Die von mir in dieser Arbeit eingesetzte Technik der DNA-Mikroarray-Analyse wird in immer mehr Bereichen der Biologie eingesetzt, unter anderen auch verstärkt in der Krebsforschung, um Expressionsunterschiede zwischen metastasierenden und nicht-metastasierenden Tumorzellen zu identifizieren. Mit Hilfe dieser Technik sollen die Mechanismen der Metastasierung aufgeklärt werden, um mögliche Marker für die Diagnose von Krebs zu finden oder Wege für die Therapie von Krebspatienten zu erschließen.

Mit der DNA-Mikroarray-Technik können global oder ganz spezifisch die differentiellen Genexpressionen zweier Zustände untersucht werden.

Die Mikroarrays bestehen aus Glasträgern, auf welchen zahlreiche DNA-Stücke von allen bekannten offenen Leserastern oder speziell ausgewählte Gene aufgebracht sind. Die zu untersuchenden RNA-Proben werden in cDNA umgeschrieben und dabei jeweils mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die so markierten Proben werden anschließend zu gleichen Teilen gemischt und auf einen Mikroarray hybridisiert. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe eines Scanners, der die gebundenen fluoreszierenden Proben detektieren kann. Somit können Unterschiede in der Fluoreszenz bzw. der jeweils gebundenen, markierten cDNA-Menge ermittelt werden.

Die Vorteile dieser Methode sind, dass man inzwischen Mikroarrays käuflich erwerben kann und somit schnell und einfach reproduzierbare Ergebnisse erzielen bzw. Fragestellungen beantworten kann. Da man mit dieser Technik gleichzeitig Tausende von Genen bearbeiten und Analysieren kann, führt dies allerdings auch zu enormen Ansammlungen von Daten, welche nur sehr schwer vollständig analysiert werden können. Somit kann diese Technik, die Dutzende, Hunderte oder gar Tausende von regulierten Genen identifiziert, nur als ein Einstieg in eine bestimmte biologische bzw. Genexpressions-bezogene Fragestellung angesehen werden, da anschließend einzelne Zielgene für weiterführende Arbeiten herausgefiltert werden müssen.

Beispiele in der Krebsforschung, bei welchen der Einsatz dieser Technik zur Identifikation von Krebs- bzw. Metastasen-assoziierten Genen führte, sind z.B. Analysen, welche von Hedge et al. (2001) durchgeführt wurden. Dabei wurden drei hoch-metastatische und drei gering-metastatische Kolontumorzelllinien anhand eines Mikroarrays mit 19200 DNA-Stücken analysiert. Dabei konnten 176 Metastasen-assoziierte Gene identifiziert werden, die mindestens zweifach hoch- bzw. herunter-reguliert waren. 108 Gene davon waren bereits in der Literatur beschrieben und 68 Gene waren noch unbekannt.

Analysen von 21000 Genen per Mikroarray durch Nishizuka et al. (2002) erbrachten die Identifikation von 350 signifikant hochregulierten Genen in Brusttumoren die Hirnmetastasen bildeten im Vergleich zu nicht-metastasierenden Brusttumoren.

Ein überschaubareres Ergebnis brachte z.B. die Analyse 15 gut differenzierten OSCC (oral squamous cell carcinoma) anhand der Mikroarraytechnik durch Nagata et al. (2003). Dieser Einsatz der Mikroarraytechnik führte durch den Vergleich von metastasierenden mit nicht-metastasierenden Tumoren zur Identifikation von 7 Genen, welche Assoziation zur Bildung von cervikalen Lymphknotenmetastasen zeigten.

### **1.6.6 Charakterisierung eines Metastasen-assoziierten Gens**

Der folgende Teil der Einleitung handelt von dem Gen ASAP1. Dieses Gen wurde in den oben erwähnten SSH-Screen isoliert (von Stein et al., 1997) und befand sich zu Beginn meiner Arbeit noch als unbekanntes Gen (novel) in mehreren Kopien in der subtraktiven Pankreas-Adenokarzinom-spezifischen Bibliothek (PLSSH). Sequenzvergleiche dieser Genfragmente mit öffentlichen Datenbanken führten schließlich zu seiner Identifikation.

Da ein Ziel meiner Arbeit die Isolation und Charakterisierung des Metastasen-assoziierten Genes ASAP1 war, möchte ich an dieser Stelle einen kurzen Überblick der in der Literatur veröffentlichten Erkenntnisse über ASAP1 darstellen.

#### **1.6.6.1 ARF-GAP-Familie (Centaurine)**

Der Name ASAP1 steht für ARF-GAP mit SH3-Domäne, Ankyrin-Wiederholungen und PH-Domäne. Wie man an dem Namen schon ableiten kann, gehört ASAP1 zur Familie der ARF-GAPs (ADP-ribosylating factor GTPase activating proteins = Centaurine), welche zur Hydrolyse von ARF-gebundenen GTP führen und damit zur Inaktivierung der ARF-Proteine. In der Zelle spielen die ARF-GAPs damit eine wichtige Rolle bei der Regulation des Membranverkehrs und der Cytoskelettorganisation.

Zum Verständnis der ARF-GAPs sollen hier erst noch kurz die ARF-Proteine besprochen werden.

#### **1.6.6.2 ARF-Proteine**

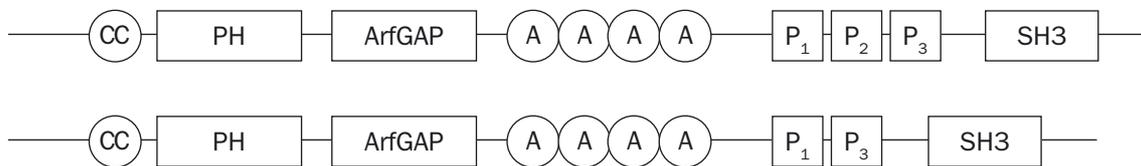
Die hochkonservierten ARF-Proteine (Adenosin-Ribosylating Factors), welche bis zu 1% des Gesamtproteingehaltes einer Zelle ausmachen, sind an wichtigen Vorgängen in der Zelle beteiligt, wie dem Actin-Cytoskelettbau und der Regulation der Membranstruktur z.B. über Vesikelbildung. Die in drei Gruppen eingeteilten sechs identifizierten ARF-Proteine können dabei als Antagonisten auftreten, wie im Falle der Zellmotilität das ARF1 und ARF6.

Die Regulation der ARF-Aktivität erfolgt über die Bindung von GTP (aktiv) bzw. GDP (inaktiv). Diese Bindungszustände werden über Hilfsfaktoren gesteuert, wobei GEFs (Guanine Exchange Factors) GDP gegen GTP austauschen und somit die ARFs aktivieren und GAPs (GTPase-activating Proteins) die intrinsische GTPase-Aktivität der ARFs stimulieren, was zur Hydrolyse des gebundenen GTP führt und damit die ARFs inaktiviert (Donaldson, 2000).

### 1.6.6.3 Aufbau von ASAP1

ASAP1 auch Centaurin 4 und DEF1 (Differentiation Enhancing Factor 1) genannt, besitzt zahlreiche Proteindomänen (siehe Abb. 1.6), die ich hier kurz besprechen will. Wie bei allen ARF-GAPs ist auch bei ASAP1 das Zinkfingermotiv für die GAP-Aktivität zuständig. Für die Funktionalität dieser GAP-Aktivität ist allerdings das minimale Konstrukt (=PZA-Modul) nötig, was sich aus der PH-Domäne, dem Zinkfinger-Motiv, und den Ankyrin-Wiederholungen zusammensetzt. Mit der PH-Domäne kann ASAP1 an das Phospholipid PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) binden, was zu einer Konformationsänderung in der Zinkfinger-Region führt und damit die ARF-GAP-Funktion für die Interaktion mit den Substraten ARF1 und ARF5 aktiviert.

Mit der c-terminalen SH3-Domäne kann ASAP1 an FAK (Fokale Adhäsions Kinase) und an Pyk2 (Phosphotyrosinkinase) binden. In der Prolin-reichen Region, welche für Interaktionen mit Src, Src-ähnliche Kinasen, Crk und CIN85 verantwortlich ist, befindet sich das alternative Exon P2. Anhand dieses alternativen Exons P2 unterscheiden sich die beiden Spleißvarianten ASAP1a und ASAP1b. Das Fehlen dieser P2-Domäne in der Spleißvariante ASAP1b beeinflusst die Bindung zu SH3-Proteindomänen nicht.



**Abb. 1.7 Proteindomänen von ASAP1.**

Oben: ASAP1a, unten: ASAP1b, CC: coiled coils; PH: Plechstrin Homologie, ARF-GAP-Domäne: Zinkfinger, A: Ankyrinwiederholungen, P1-P3: Prolin-reiche Domänen 1-3; SH3: Src-Homologie 3-Domäne.

Des Weiteren besitzt ASAP1 zahlreiche als Phosphorylierungsstellen dienende Serin- und Tyrosinreste (Brown et al., 1998; Kam et al., 2000; Furman et al., 2002; Kondo et al., 2000; Randazzo et al., 2000; Liu et al., 2002; Kowanetz et al., 2004).

### 1.6.6.4 Funktionen von ASAP1 in der Zelle

ASAP1 ist im Cytoplasma lokalisiert, wo es nach Bewegungsstimulation der Zelle mit FA-Markern (Focal Adhesions = Fokalkontakte), wie Vinculin und Paxillin assoziiert und mit der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) in FAs kolokalisiert ist. Somit kann ASAP1 Integrin-abhängige Signalübertragungswege zwischen der extrazellulären Matrix (ECM) und dem Actin-Cytoskelett vermitteln. Des Weiteren wurden Interaktionen von ASAP1 mit Arf1 (Adenosin-Ribosylation-Factor) und Arf5, Mitglieder der Ras-

Superfamilie beschrieben, wobei ASAP1 durch die Bindung seiner PH-Domäne an das Phospholipid PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) und der darauf folgenden Aktivierung seiner ArfGAP-Domäne (Arf-GTPase-activating-protein) zu einer GTP-Hydrolyse der Arfs führt und sie damit inaktiviert. Diese Interaktionen steuern für die Metastasierung wichtige Modifikationen des Membranverkehrs, des Actinskeletts und des Phospholipidmetabolismus (Donaldson, 2000; Brown et al., 1998; Furman et al., 2002; Kam et al., 2000; Randazzo et al., 2000).

Als weitere Interaktionspartner wurden c-Src und das Adapter Protein Crk identifiziert, welche mit ihren SH3-Domänen an die Prolin-reiche Region (P1-P3) von ASAP1 binden und die Tyrosine 308 und 782 phosphorylieren können. Diese Interaktionen können zusammen mit der Arf-Interaktion das Zellwachstum, die Zytoskelettorganisation und den Zellmembranaufbau modulieren (Brown et al., 1998).

Die Interaktion mit den entdeckten Bindungspartnern FAK (Fokale Adhäsions Kinase) und Pyk2 (Phospho-Tyrosin-Kinase2), welche beide über ihre Prolin-reichen Regionen an die SH3-Domäne von ASAP1 binden, können die Zelladhäsion, Motilität, Signaltransduktion (über Integrine) und die Zellstreckung modulieren (Liu et al., 2002; Oda et al., 2002; Randazzo et al., 2000).

Wie in der Literatur beschrieben (Kruljac-Letunic et al., 2003), ist das Tyrosin 308 neben dem Tyrosin 782 die Hauptphosphorylierungsstelle von ASAP1 durch Pyk2. Das Tyrosin 308 befindet sich nahe an der PH-Domäne von ASAP1, welche für die Interaktion mit dem Phospholipid PIP2 verantwortlich ist. Eine Phosphorylierung an dieser Stelle führt also zu einer sterischen Hinderung der Bindung von ASAP1 an PIP2 und damit kann keine Aktivierung der ArfGAP-Domäne in ASAP1 stattfinden, was wiederum verhindert, dass Arf1 (bzw Arf5) durch die Hydrolyse des GTP inaktiviert werden. Pyk2 inhibiert also durch die Phosphorylierung von ASAP1 an der Stelle Y308 die Bindung an PIP2, blockiert die ArfGAP-Funktion und moduliert dadurch wichtige zelluläre Prozesse, wie den Membranverkehr, den Actincytoskelettaufbau und den Phospholipidmetabolismus.

Diese Inhibierung von ASAP1 durch Pyk2 führt u.a. zu einer verringerten Zellmotilität (Furman et al., 2002).

In einer erst kürzlich erschienene Veröffentlichung (Kowanetz et al., 2004) konnte gezeigt werden, dass das Multidomänen-Adapterprotein CIN85 anhand der Bindung zu zahlreichen Proteinen, den EGF-Rezeptor-Verkehr (EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor = Rezeptor-Tyrosinkinase) über die endozytotischen und Recycling-Pfade steuern kann. Eines dieser identifizierten Proteine ist ASAP1. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von ASAP1 zu einer erhöhten Recyclingrate der EGF-Rezeptoren führt. Die Bindung von ASAP1 über das PVPLPR-Motiv der Prolin-reichen Region an die SH3-Domäne von CIN85 ist unabhängig von einer Ligandenstimulierung und die Funktion von ASAP1 nach der Bindung ist unabhängig von dem ASAP1-Phosphorylierungsstatus und dadurch auch von dem ebenfalls in den Multiproteinkomplex befindlichen Pyk2. Ausschlaggebend für die Recycling-Funktion ist die ArfGAP-Domäne in ASAP1, welche das Arf-gebundene GTP hydrolysiert.

All diese biologischen Funktionen sprechen für einen möglichen Einfluss von ASAP1 bei der Tumorprogression bzw. der Metastasierung.

## 1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

1. Analyse der über die SSH-Methode isolierten Gene zweier subtraktiver Bibliotheken (PLSSH, von Stein et al., 1997; MLSSH, Nestl et al., 2001) zur Identifikation von Tumorsystem-übergreifenden Metastasen-assoziierten Genen. Dabei soll die Anzahl von 268 differentiell exprimierten SSH-Genen auf wenige, für den Prozess der Metastasierung essentielle Gene reduziert werden.
2. Isolation der kompletten Länge eines ausgewählten Metastasen-assoziierten Gens, welches möglicherweise eine funktionelle Rolle bei dem Prozess der Metastasierung hat.
3. Funktionelle Charakterisierung des isolierten Gens.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Bezugsquellen der Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

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

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

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

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

## 2.2 Geräte

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

## 2.3 Radiochemikalien

[<sup>3</sup>H]-Thymidin (10 µCi/ml)

[<sup>35</sup>S]-Promix (248 Mbq/ml)

[<sup>32</sup>P]-dCTP (370 Mbq/ml)

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

## 2.4 Antikörper

### 2.4.1 Primärantikörper:

Anti-ASAP1	(Maus Ig) monoklonal, Eigenproduktion
Anti-FLAG-M2	(Maus Ig, Abcam)
Anti-1.1 ASML	(Maus Ig, Eigenproduktion)
Anti-Actin	(Maus Ig) monoklonal (Sigma)

### 2.4.2 Sekundärantikörper:

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

Anti-Maus HRP

Anti-Maus AP

Anti-Maus TRITC

Anti-Maus FITC

## 2.5 Plasmide

pCDNA3.1 (5,4 kb)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pCRII-TOPO (3,9 kb)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pGEX1 (4,9 kb)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pCI (4,0kb)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pRc/CMV (5,5 kb)	Invitrogen, Groningen, Niederlande

## 2.6 Oligonukleotide

### RT-PCR:

NM 001100

Act5': 5'-AGA GGT ATC CTG ACC CTG AAG TAC-3'

Act3': 5'-CCA CCA GAC AAC ACT GTG GCA T-3'

### Amplifizierung der SSH-Klone:

SSH-Kit (Clontech)

Nested primer 1: 5'-TCG AGC GGC CGC CCG GGC AGG T-3'

Nested primer 2: 5'-AGC GTG GTC GCG GCC GAG GT-3'

OAN1: 5'-ACT AGT AAC GGC CGC CAG-3'

OAN2: 5'-CCA GTG TGA TGG ATA TCT GC-3'

### RT-PCR und Amplifizierung humanes ASAP1-Fragment:

huASAP1F: 5'-GCG GAT CCG CTG GCC AAG AAT GTA GGA AAC AAT AG-3'

huASAP1R: 5'-GCG AAT TCG GGA AAG CAG ATC TTC ACA CTG GG-3'

**Amplifizierung rASAP1 (volle Länge):**

rASAP1F: 5'-CTA GCT AGC TAG TGT GAG ACA TGA GAT CTT CAG CCT-3'

rASAP1R: 5'-CTA GCT AGC TAG GAC AGA AGG TTC TGC TTT TTT GCT AGT-3'

**Amplifizierung rASAP1 (volle Länge mit FLAG-tag):**

5FLAGrASAP1:5'-GCA AGC TTC CAC CAT GGA CTA CAA GGA CGA CGA CGA CAA GAT GAG ATC TTC AGC CTC CCG GC-3'

3rASAP1: 5'-CGG ATC CCG TCA CTC TTC TTC AGC AGA AAG C-3'

**Amplifizierung Kontrollgene für DNA-Mikroarray:**

AF106860

GAPDHF: 5'- CGA GAT CCC GCT AAC ATC AAA TGG-3'

GAPDGR: 5'-TGC AGG ATG CAT TGC TGA CAA TCT TGA-3'

S79292

HPRTF: 5' ATA GTG ATA GGT CCA TTC CTA TGA CT-3'

HPRTR: 5'-GCT GTA CTG CTT GAC CAA GGA AAG-3'

NM 031144

bACTINF: 5'-GAT ATG GAG AAG ATT TGG CAC CAC-3'

bACTINR: 5'-CGA CCA GAG GCA TAC AGG GAC A-3'

**2.7 Pro- und eukaryotische Zelllinien****2.7.1 Prokaryotische Zellen:**

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

Elektromax E. coli DH10 (Invitrogen, Groningen)

**2.7.2 Eukaryotische Zellen:**

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

Zelllinie	Herkunft	Kulturbedingungen
1AS	BSP73 Rattenpankreas-Krebszellsystem	RPMI + 10 % FCS
10AS	BSP73 Rattenpankreas-Krebszellsystem	RPMI + 10 % FCS
ASML	BSP73 Rattenpankreas-Krebszellsystem	RPMI + 10 % FCS
G	Dunning Rattenprostata-Krebszellsystem	RPMI + 10 % FCS
AT1	Dunning Rattenprostata-Krebszellsystem	RPMI + 10 % FCS
AT2.1	Dunning Rattenprostata-Krebszellsystem	RPMI + 10 % FCS
AT3.1	Dunning Rattenprostata-Krebszellsystem	RPMI + 10 % FCS
AT6.1	Dunning Rattenprostata-Krebszellsystem	RPMI + 10 % FCS
MatLu	Dunning Rattenprostata-Krebszellsystem	RPMI + 10 % FCS
MatLylu	Dunning Rattenprostata-Krebszellsystem	RPMI + 10 % FCS
Colo320 DM	Humane Kolonkarzinom Zelllinie	RPMI + 10 % FCS
HT29 G+	Humane Kolonkarzinom Zelllinie	DMEM + 10 % FCS
HT29 MTX	Humane Kolonkarzinomlinie	DMEM + 10 % FCS
HCT15	Humane Kolon-Adenokarzinomlinie	RPMI + 10 % FCS
LoVo	Humane Kolon-Adenokarzinomlinie	RPMI + 10 % FCS
LoVo C5	Humane Kolon-Adenokarzinomlinie	RPMI + 10 % FCS
LS174T	Humane Kolon-Adenokarzinomlinie	RPMI + 10 % FCS
SW1116	Humane Kolon-Adenokarzinomlinie	L-15 + 2mM Glut +10% FCS

## 2.8 DNA-Methoden

### 2.8.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

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

### 2.8.2 Phenol/Chloroform Extraktion

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

### 2.8.3 Fällung von Nukleinsäuren

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

### 2.8.4 Agarose-Gelelektrophorese

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

1x TAE: 40 mM Tris pH 8,3; 40 mM NaAcetat; 2 mM EDTA pH 8,0

Glycerin-Probenpuffer: 10 mM EDTA; 10% Glycerin; 0,1% SDS; 0,02% Bromphenolblau

### 2.8.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

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

### 2.8.6 Plasmid DNA Mini-Präparation

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

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

### 2.8.7 Plasmid-DNA Maxi-Präparation

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

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

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

### 2.8.8 PCR – Ansätze

Für die PCR wurde immer das Taq-Polymerase-Kit von Invitrogen verwendet, indem der 10x-PCR-Puffer, die Taq-Polymerase und das MgCl<sub>2</sub> enthalten sind. Wenn nicht anders angegeben wurden folgende Mengen pro PCR-Reaktion benutzt:

5 µl	cDNA-Vorlage
0,5 µl	dNTPs (10 mg/ml)
0,75 µl	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)
2,5 µl	10x-PCR-Puffer
0,25 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
1 µl	Primer A (20 pM)
1 µl	Primer B (20 pM)
ad 25 µl H <sub>2</sub> O dest.	

Oligonukleotide	Tm1	Tm2	Ta	Ts	Zyklen
Aktin-RT-PCRs	94°C für 1min	94°C für 15s	70°C für 15s	72°C für 30s	27
huASAP1-RT-PCR:	94°C für 1min	94°C für 15s	70°C für 15s	72°C für 30s	27
huASAP1	-	94°C für 15s	58°C für 30s	72°C für 4min	30
rASAP1	94°C für 3min	94°C für 15s	68°C für 30s	72°C für 4min	32
FLAGrASAP1/3rASAP1	94°C für 3min	94°C für 15s	68°C für 30s	72°C für 4min	32
HPRT	94°C für 1min	94°C für 30s	60°C für 30s	72°C für 30s	32
GAPDH	94°C für 1min	94°C für 30s	60°C für 30s	72°C für 30s	32
Actin	94°C für 1min	94°C für 30s	60°C für 30s	72°C für 30s	32
Nested primer	94°C für 3min	94°C für 30s	60°C für 30s	72°C für 30s	32
oAN	94°C für 3min	94°C für 30s	60°C für 30s	72°C für 30s	32

Tm1: Initiale Schmelztemperatur, Tm2: Schmelztemperatur (Primer),  
Ta: annealing Temperatur, Ts: Synthesetemperatur

### 2.8.9 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

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

### 2.8.10 Dephosphorylierung von DNA

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

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

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

CIP-Puffer: 50 mM Tris pH 9,0; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>; 1 mM Spermidin

1x TNE: 100 mM NaCl; 10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0

### 2.8.11 Ligation von DNA-Fragmenten

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

Ligationspuffer: 50 mM Tris pH 7,4; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT; 1 mM Spermidin; 1 mM ATP

### **2.8.12 TOPO-Klonierung**

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

### **2.8.13 Radioaktive Markierung von cDNA**

Die Radioaktive Markierung erfolgte mittels des Prime It Kit (Stratagene, Inc), wobei 60-100 ng Gelaufgereinigter Plasmid-DNA oder 25 ng frisch synthetisierter cDNA exakt nach der Vorschrift des Herstellers gehandhabt wurden. Für die Entfernung nicht inkorporierter Nukleotide wurden Sepharose ready columns (Chroma Spin STE-100, Clontech) exakt nach der Vorschrift des Herstellers benutzt. Die Sonden wurden vor dem Gebrauch für 5 min bei 100°C hitzedenaturiert.

### **2.9 Gebrauch eines Matched Tumor/Normal Expression Array**

Radioaktiv markierte huASAP1-cDNA wurde herangezogen um exakt nach der Vorschrift des Herstellers (Clontech) den Matched Tumor/Normal Expression Array zu hybridisieren. Die Auswertung erfolgte mit einer Phosphoimager-Platte (Fuji) welche nach der Exposition für 1 h bei -20°C anhand eines Phosphoimager-Readers (Fuji FLA-3000) ausgewertet wurde.

### **2.10 Präparation elektrokompetenter Bakterien**

Eine einzelne Kolonie des E. coli Stammes DH5 wurde verwendet, um 1 ml SOB-Medium anzupflanzen. Die Kultur wurde im Schüttler bei 37°C über Nacht wachsen gelassen. Dies wurde benutzt, um wiederum 300 ml SOB-Medium anzupflanzen. Die Bakterien wurden bei 18-20°C wachsen gelassen, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 erreicht war. Wenn dies erreicht war, wurde die ganze Kultur für 5 min bei 37°C inkubiert („Hitzeschock“), bevor die Bakterien für weitere 20 min 18-20°C ausgesetzt wurden. Zur Salzentfernung wurde die folgende Prozedur 4-5 mal wiederholt: Sedimentation bei 3.600 g für 10 min, Resuspension des Pellets in 50 ml eiskaltem Wasser. Schließlich wurden die Zellen in 800 µl eiskaltem Wasser aufgenommen, welches 7 % DMSO enthielt. Aliquots von je 40 µl wurden bei 80°C gelagert.

### **2.11 Transformation durch Elektroporation:**

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

## 2.12 RNA Methoden

### 2.12.1 Präparation von gesamt-RNA aus Zellen und Gewebe

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

### 2.12.2 Präparation von PolyA<sup>+</sup>-RNA aus Zellen

Zur Präparation von PolyA<sup>+</sup>-RNA aus Zellen wurden  $3 \times 10^6$  Zellen auf einer 15 cm Kulturschale ausgesät und für 24 h mit ihrem entsprechenden Medium im Brutschrank bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur Ernte der Zellen wurden sie zweimal mit eiskaltem, sterilem PBS gewaschen und mit 10 ml sterilem STE abgeschabt, wobei die Zellen lysierten. Die genomische DNA wurde mit Hilfe eines Ultra-Turax<sup>TM</sup>-Homogenisators (Janke und Kunker GmbH & CoKG, Staufen) für 30 s geschert und die Suspension für 30 min bei 37°C inkubiert. Nachdem die NaCl-Endkonzentration auf 0,5 M eingestellt wurde, wurden pro Ansatz 100 mg Oligo-dT-Zellulose 1:1 in HSB zugegeben.

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

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

PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,7 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,6 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

STE: 20 mM Tris-HCl, pH7,4; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0,5% SDS; 300 µg/ml Proteinase K

HSB: 10 mM Tris-HCl, pH7,4, 300 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,1% SDS

Es wurden ebenfalls mRNA-Isolationen mit Hilfe des Purist mRNA Kits (Ambion) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte laut dem Protokoll von Ambion.

### 2.12.3 RNA – Agarose – Gelelektrophorese

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

#### **2.12.4 Northern Blot: Transfer von RNA auf Nylonmembran**

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

#### **2.12.5 Northern-Hybridisierung**

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

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

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

#### **2.12.6 Herstellung von cDNA aus PolyA+ -RNA**

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

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

5x Erststrang Synthese Puffer: 250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 8,3

5x Zweitstrang Synthese Puffer: 100 mM Tris-HCl; 250 mM KCl; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 8,4

### **2.12.7 In situ Hybridisation**

Für die In situ Hybridisationen (ISH) wurden die huASAP1-DNA linearisiert. Hierfür wurde die sich im pCRII-TOPO-Vector befindliche huASAP1-DNA einerseits mit SpeI verdaut (Sense-Konstrukt, T7-primer) andererseits mit EcoRV (antisense Konstrukt, Sp6-primer). Die über ein Agarosegel aufgereinigten DNAs wurden nun für die ISH herangezogen.

Alle Lösungen, Puffer und Antikörper waren in dem RNA-Colour-Kit (Amersham) enthalten. Die Durchführung der ISH wurde komplett nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt.

### **2.13 Methoden für die Herstellung und Benutzung von DNA-Mikroarrays**

#### **2.13.1 Reinigung des Amplikons und Kontrolle der PCR-Reaktion**

Die PCR-Produkte wurden über Millipore Multiscreen Platten nach Herstellerangaben gereinigt. Die PCR-Produkte wurden anschließend in 100 µl Wasser aufgenommen. Je 5 µl wurden auf ein 1% TBE-Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanter Spannung von 5-10 V/cm. Die DNA-Banden konnten in einem UV-Durchlicht (304 nm) mit einer e.a.s.y.WIN40-Apparatur detektiert und auf Thermopapier dokumentiert werden.

#### **2.13.2 Vorlage in 384-well Mikrotiterplatten für den Kontaktpotter**

Es wurden jeweils 42µl der PCR-Produkte mithilfe des Biomek-Roboters (Beckman Coulter) von 96 well Platten in eine 384 well Platte umpipettiert. Diese Platte wurde in einer SpeedVac (Savant) Vakuumzentrifuge eingetrocknet und anschließend in 10 µl Spottingpuffer aufgenommen. Die mit Klebefolie verschlossene Mikrotiterplatte wurde für 12 h auf einem Titramax 1000 Rütteltisch (Heidolph, Nürnberg) geschüttelt um die DNA zu lösen. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Platte bei -80°C gelagert.

Spottingpuffer: 150 mM Natriumphosphat, 1,5 M Betain in ddH<sub>2</sub>O.

#### **2.13.3 Fluoreszenzmarkierung von DNA und Hybridisierung**

Für die Herstellung der Fluoreszenz-markierter Proben, wurde das CyScribe First strand cDNA Kit (Amersham) verwendet. Dabei wurden 1,5 µg mRNA mit dem CyScribe Enzym in cDNA umgeschrieben. Der Reaktion wurden Cy3-dUTP bzw. Cy5-dUTP nach Herstellerangaben zugegeben. Das Protokoll wurde bis zum Neutralisierungsschritt nach erfolgter Markierung und RNA-Degradation befolgt. Die Aufreinigung erfolgte in folgender Abwandlung: Die Proben wurden mit 1x TE pH 7 auf 500 µl gebracht und mit Centricon 30 Säulchen (Amicon, Millipore) durch 15-minütige Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (Biofuge, Pico, Heraeus) bei 8000 U/min auf weniger als 50 µl eingeeengt. Nach diesem Schritt wurden die Probe, die zusammen untersucht werden sollten vereinigt und nochmals auf ein Volumen von 500 µl mit 1 x TE pH7 aufgefüllt. Es folgte eine neuerliche Einengung mit Centricon-30 Säulchen (Millipore) bei 8000 U/min in einer Tischzentrifuge (Biofuge, Pico, Heraeus) auf weniger als 15 µl. Dies war der Fall, wenn der Flüssigkeitsfilm nicht mehr die gesamte Fläche des Filters bedeckte.

#### 2.13.4 Hybridisierung

Die Proben wurden dann mit 1x TE pH 7 auf exakt 15 µl gebracht und eine Minute bei 95°C in einem Heizblock denaturiert und anschließend sofort für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben fünf Minuten bei RT belassen, bevor sie mit 15 µl 2x DIG-Easy Hyb (Roche) Hybridisierungspuffer versetzt wurden. Die auf diese Weise hergestellte Probe wurde zunächst zusammen mit den Hybridisierungskammern, den zu hybridisierenden Mikroarrays und den Deckgläschen auf 42°C gebracht. Dann wurde die Probe auf den Objektträger pipettiert und anschließend das Deckgläschen vorsichtig aufgesetzt. Die Mikroarrays wurden dann in die Hybridisierungskammer gegeben die ein mit 120 µl ddH<sub>2</sub>O benetztes Whatmanpapier enthielten und für mindestens 12 h bei 42°C inkubiert.

DIG-Easy Hyb: Der Puffer ist als Pulver erhältlich, für einen 2x-Puffer wurde das Granulat in 42 statt 84ml ddH<sub>2</sub>O bei 42°C gelöst. Bei Temperaturen unter 25°C wird dieser 2x Ansatz fest, er wurde daher vor Verwendung immer vorgewärmt.

#### 2.13.5 Waschen der Mikroarrays

Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Mikroarrays aus den Hybridisierungskammern genommen und in Objektträgerhalterungen in rechteckigen Glaskammern mit 250 ml 42°C warmem Waschpuffer 1 gegeben. Es wurde vorsichtig auf- und ab bewegt, bis sich das Deckgläschen löste und die Arrays dann in eine Kammer mit frischem 42°C warmem Waschpuffer 1 gegeben. Nach 10 minütigem leichtem Schütteln auf einem Schwenktisch (Heidolph, Nürnberg) wurden die Arrays in frische Kammern mit Waschpuffer 2 überführt und für fünf Minuten weitergeschüttelt. Daraufhin folgten vier einminütige Waschschriffe in je frischem Waschpuffer 3 bevor die Arrays nach kurzem untertauchen in Waschpuffer 4 mit Pressluft getrocknet wurden, wobei darauf geachtet wurde Pufferreste möglichst schnell von der Oberfläche zu entfernen. Bis zum Auslesen mit dem Scanner wurden die Arrays bei RT in Dunkelheit gelagert, wobei möglichst sofort mit dem Scannen begonnen wurde um ein Ausbleichen der Fluorophore zu verhindern.

Waschpuffer 1: 2x SSC ; 0,1%SDS

Waschpuffer 2: 0,1x SSC; 0,1%SDS

Waschpuffer 3: 0,1x SSC

Waschpuffer 4: 0,01x SSC

#### 2.13.6 Auslesen mit dem Axon 4000B

Der Axon GenePix 4000B liest beide Wellenlängen parallel aus, diese werden als TIFF-Dateien mit 16 bit Graustufen gespeichert, die Intensität reicht von 0 bis 65535. Die Auslesung erfolgte in einer Auflösung von 10 µm, für jeden DNA-Punkt (Spot) auf dem Array wurden ca. 100 Daten- und ca. 400 Hintergrundpunkte errechnet. Jeder Mikroarray wurde zweimal (low, high) mit unterschiedlichen Signalamplifizierungen (Volteinstellung der Foto Multiplizier Tuben) ausgelesen. Die Stärke des Lasers war bei allen Scans unverändert. Der „high“ Scan wurde so gewählt, dass die Amplifikation des Cy5-Signals (635 nm) maximal gewählt wurde, das Cy3-Signal (532nm) wurde angeglichen dass beide Kanäle möglichst gleiche Signale lieferten. Bei diesen Einstellungen waren je nach Effizienz der Markierungsreaktion zwischen

15 und 30% aller Spots in der Sättigung und konnten daher nicht in die Auswertung mit einbezogen werden. Daher wurde ein Scan mit geringen Verstärkungseinstellung en (low-Scan) gemacht, bei dem kein Signal die Sättigung erreichte.

### 2.13.7 Statistische Auswertung

Die Ausgelesenen Daten wurden mit Hilfe des Programms GenePix Pro (Axon Instruments, Inc.) bearbeitet. Dieses Programm liefert eine Textdatei, die mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel geöffnet werden kann. Folgende Auswertungen wird durch GenePix Pro angegeben, wobei die Zahlenwerte einerseits für das Cy5-Signal (635 nm) und andererseits für das Cy3-Signal (532 nm) stehen.

ID	X	Y	Di.	F635 Median
F635 Mean	F635 SD	B635 Median	B635 Mean	B635 SD
% > B635+1SD	% > B635+2SD	F635 % Sat.	F532 Median	F532 Mean
F532 SD	B532 Median	B532 Mean	B532 SD	% > B532+1SD
% > B532+2SD	F532 % Sat.	Ratio of Medians (635/532)	Ratio of Means (635/532)	Median of Ratios (635/532)
Mean of Ratios (635/532)	Ratios SD (635/532)	Rgn Ratio (635/532)	Rgn R <sup>2</sup> (635/532)	F Pixels
B Pixels	Sum of Medians	Sum of Means	Log Ratio (635/532)	F635 Median - B635
F532 Median - B532	F635 Mean - B635	F532 Mean - B532	F635 Total Intensity	F532 Total Intensity
SNR 635	SNR 532	Flags		

Die Auswertung und Normalisierung wurde wie folgt vorgenommen:

1. Alle Daten bei denen FLAG nicht gleich 0 ist wurden gelöscht. Falls Fehler bei der Auswertung auftraten, wurde dies als FLAG angezeigt z.B. ein unauswertbarer Spot.
2. F532%Sat und F635%Sat: Alle Werte über 10% wurden gelöscht. Dies gibt die Sättigung der beiden Kanäle an, welche pro Kanal 10% nicht übersteigen sollte.
3. Alle Werte deren Faktor F Median/B Median (= Spot Intensitätsmedian/Hintergrundintensitätsmedian) kleiner 2 waren wurden gelöscht. Dies heißt, dass die Signalstärke der zu analysierenden Spots mindestens doppelt so groß wie die Hintergrundintensität sein muss.
4. Es sollte erfüllt werden: % > B532 + 1SD bzw. % > B635 + 1SD > 75%. Diese Formeln geben den Anteil der Vordergrundpixel (Spotpixel) an, deren Intensität (Median) größer als der Median (+ eine Standardabweichung) der Hintergrundpixel ist. Falls dies 75% unterschritt wurden die Daten gelöscht. Mit Hilfe dieser Vorgehensweise wurden Hintergrundbereinigte Mediane erschaffen, mit welchen die DNA-Arrays ausgewertet werden konnten.

Nun wurden mit Hilfe der Kontrollgene HPRT, -Actin und GAPDH, der Faktor für die Normalisierung ermittelt:

$$\text{Normalisierungsfaktor} = \text{F635 Median} / \text{F532 Median}$$

Die Werte für die Expressionsunterschiede zwischen metastasierenden Zellen und nicht metastasierenden Zellen wurden somit wie folgt ermittelt:

$$\text{Wert} = \text{Median of Ratios (635/532)} / \text{Normalisierungsfaktor.}$$

Aufgrund dieser Werte wurden nun die Gene anhand ihres Expressionsanstieges in metastatischen Zellen in Vergleich zu nicht-metastatischen Zellen sortiert.

## 2.14 Proteinmethoden

### 2.14.1 Präparation von Zellen und Gewebe für Proteingele

Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen und dann in Protein-Probenpuffer aufgenommen. Es wurden ca.  $1 \times 10^5$  Zellen / cm Geltasche geladen. Gewebe wurde nach der Präparation in flüssigen Stickstoff schockgefroren, anschließend im Mörser zerkleinert und ebenfalls in Protein-Probenpuffer aufgenommen. Dann wurden die DNS in den Proben mit Hilfe eines Sonifiziergerätes zerkleinert. Die Proben konnten nun für die Proteingele verwendet werden.

### 2.14.2 Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)

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

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

Sammelgel-Lösung: 4% Acrylamid; 0,1% N,N-Methylenbisacrylamid; 125 mM Tris-HCl pH 6,8  
0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED

Elektrophorese-Puffer: 25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 0,1% SDS

2x Probenpuffer: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau;  
2% 2-Mercaptoethanol

### 2.14.3 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE

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

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

Entfärbelösung 1: 50% Methanol; 10% Essigsäure

Entfärbelösung 2: 5% Methanol; 7% Essigsäure

#### **2.14.4 Analyse von Proteinen durch Transfer auf Membranen und Detektion durch spezifische Antikörper (Western Blot)**

Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen wurden durch Elektrotransfer mit Hilfe einer Naßtransferkammer (Trans-Blot, BioRad Laboratories GmbH, München) auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) übertragen. Zuvor wurde die Membran 1 min in Methanol aktiviert, 5 min in ddH<sub>2</sub>O gewässert und für mindestens 5 min in Transferpuffer (48 mM Tris-Base, 39 mM Glycin, 10 % Methanol) äquilibriert. Mit Hilfe eines Trägers wurde die Membran zusammen mit dem Gel luftblasenfrei zwischen je 3 Lagen Whatman 3MM-Papier feucht in Transferpuffer zusammengebaut. Der Träger wurde dann senkrecht in die mit Transferpuffer gefüllte Kammer so eingesetzt, dass die Membran zur Anode hin orientiert war. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte bei 4°C für mindestens 4 h mit 300 mA.

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

Das Detektionsverfahren richtet sich nach dem verwendeten Sekundär-Antikörper. Bei den hier verwendeten Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundär-Antikörpern wurde die Membran 1 min mit einer 1:1-Mischung der beiden ECL-Lösungen (engl.: enhanced-cheminoluminescence) überschichtet (2ml/dm<sup>2</sup> Membranfläche). Nach Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit wurde schließlich in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm auf die sich in einer Kassette befindliche Membran aufgelegt und entwickelt z.B. nach 10 s, 30 s und 1 min.

#### **2.14.5 Radioaktive Immunpräzipitation von Proteinen (hot-IP)**

Bei der radioaktiven IP wurden die Zellen zuerst in Methionin-freiem Medium für eine halbe Stunde gehungert und dann wurde pro große Zellkulturplatte 100 µl Promix (Amersham) hinzugegeben. Nach 16 h Inkubation wurden die Zellen in PBS gewaschen und mittels des Lysepuffers von den Platten abgelöst. Nach vollständiger Lyse wurden die Zellreste bei 13000 U/min für 15 min abzentrifugiert. Nach Überführung in ein neues Eppendorfgefäß wurde 1/10 des Volumens 50%-ige Protein G oder Protein L-Agarose (je nach verwendetem Erstantikörper: Protein G bei IgG-Ak, Protein L bei IgM-Ak) hinzugegeben und Übernacht inkubiert um alle unspezifisch an die Agarose bindenden Proteine loszuwerden („preclear“).

Am nächsten Tag wurde die Agarose abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, in dem sich der Erstantikörper (Konz.: 10 µg/ml) und Protein G oder Protein L – Agarose befand. Nach einer Inkubationszeit von 1-2 Std. bei 4°C unter ständigem Rotieren wurde die Agarose mit den gebundenen Proteinen mehrfach mit dem Lysepuffer gewaschen. Nach kompletter Entfernung des Puffers von der Agarose wurde 50 µl Protein-Ladepuffer hinzugegeben und die Proben auf

ein SDS-Protein Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Um die radioaktiven Signale sichtbar zu machen wurde das Signal zunächst verstärkt. Dazu wurde das Gel mittels DMSO entwässert und anschliessend mit DMSO-PPI behandelt. Das PPI lagert sich ins Gel ein und verstärkt die radioaktiven Signale. Nach anschließender Wässerung des Gels wurde es auf einem Gelrockner getrocknet. Dann wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und nach entsprechender Belichtungszeit entwickelt, um die radioaktiv markierten Proteinbanden sichtbar zu machen.

#### **2.14.6 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)**

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

#### **2.14.7 Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen**

Für die Immunofluoreszenz wurden die entsprechenden Zellen verwendet.  $2,5 \times 10^5$  Zellen wurden am Vortag auf 8-well-Chamber-Slides ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht auf den Chamber-Slides kultiviert. Am nächsten Morgen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann mit einer 3% Paraformaldehyd-Lösung für 20 min fixiert. Um überschüssiges Paraformaldehyd abreagieren zu lassen, wurden die Zellen 15 min in 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (in PBS) inkubiert und anschließend mit 0,1% Triton-X100 (in PBS) für 5 min permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in PBS mit 10% FCS (PBS-10% FCS) für 1 h geblockt.

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

#### **2.14.8 Immunhistochemie**

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

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

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

Es folgte die Farbentwicklung mit AEC, das vorher in 1 ml DMF gelöst, mit 20 ml NaAc (50 mM, pH 4,9) versetzt und anschließend filtriert und 6,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugegeben wurde. Die Entwicklungszeit betrug etwa 10 min. Nachdem kurz in H<sub>2</sub>O bidest gewaschen wurde, folgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Nach mehreren Waschschritten mit normalem Leitungswasser wurden die Schnitte getrocknet und gedeckelt.

## **2.15 Antikörperproduktion und Aufreinigung**

### **2.15.1 Aufreinigung des huASAP1-GST-Fusionsproteins**

Für die Generation von huASAP1 Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsprotein, wurde ein 650 Basen langes Fragment der humanen ASAP1-cDNA an das 3'-Ende in den Leseraster des GST-Gens im pGEX-Expressionsvector kloniert. Nach dem die Sequenzierung die Richtigkeit der Sequenz bestätigte, wurde das Konstrukt in den Expressions-E. coli Stamm BL-21 (Stratagen) transformiert. Eine einzelne Kolonie wurde über Nacht in 50 ml LB-Medium mit 100 µl Ampicillin (Selektion der Plasmid enthaltenen Bakterien) und 34 µl/ml Chloramphenicol (zur Selektion der BL21-Bakterien) inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Bakterienkultur 1:10 mit frischem LB-Medium verdünnt und für weitere 2 h, bis zum Erreichen der stationären Phase der Bakterien bei 37°C inkubiert. Die Induktion der GST-Fusionsprotein-Expression wurde durch die Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM erreicht. Die so behandelte Bakterienkultur wurde daraufhin für 4 h bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden dann pelletiert und in Lysispuffer resuspendiert, welchen vor der Resuspension 1 ml 1 mM DTT, 1 mg/ml Lysozym und Proteaseinhibitoren (Complete Mini, Roche) zugesetzt wurden. Zum Aufbrechen der Bakterien wurden diese 5 min in flüssigen Stickstoff und anschließend bei 37°C für 5 min inkubiert. Im Anschluss wurde das Lysat sonifiziert (Branson cell disruptor B15) um die Viskosität zu vermindern. Die Zelldebris wurde mit einer 30 minütigen Zentrifugation bei 11000 U/min entfernt. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde für 1 h bei 4°C unter Rotation mit Glutathion-Agarose (Sigma) inkubiert. Im Anschluss wurde die Agarose drei mal mit kaltem PBS gewaschen. Die GST-Fusionsproteine wurden mit 50 mM

NaHCO<sub>3</sub> pH 10,8 in 10 Fraktionen zu je 1 ml eluiert. Der pH wurde durch die Vorlage von 87 µl 1M Natriumcitrat pH 5,0 neutralisiert. Die Menge und Reinheit der isolierten Proteine wurde anhand SDS-PAGE und anschließender Coomassifärbung bestimmt.

LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g/l NaCl und ein Pellet NaOH

Lysispuffer: 0,05 M HEPES, pH 7,9, 0,015 M KCl, 0,005 M MgCl, 0,01 M EDTA; 1 ml/100 ml Kultur

### **2.15.2 Immunisierung von Mäusen zur Herstellung monoklonaler ASAP1-Antikörper**

Für die Immunisierung wurden Balb/C-Mäuse genommen, welche nach der Methode von Niebuhr et al., 1998, mit dem huASAP1-GST-Fusionsprotein immunisiert wurden. Am Ende der Immunisierung wurden die Mäuse getötet, die poplitealen Lymphknoten (aus den Kniekehlen) entnommen und zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern mittels einer Hybridom-Bildung verwendet.

### **2.15.3 Vorbereitung der Hybridom-Bildung**

Diese Durchführung der Methode wurde Niebuhr et al., 1998 entnommen. Als erstes wurden SP2/0-Maus-Myelomzellen in Kultur genommen und in ausreichender Menge produziert (etwa  $5 \times 10^8$ ). Am Tag vor der eigentlichen Hybridom-Bildung wurden die sogenannten „Feeder“-Zellen aus dem Peritoneum von Mäusen mittels einer 0,34 molaren Sucrose-Ausspülung isoliert. Die Zellen wurden in Hybridom-Medium aufgenommen und auf zehn 96-well-Platten verteilt.

Hybridom-Medium: RPMI-Medium + 20% FCS

1 Fl. OPI (Oxaloacetat, Pyruvat, Insulin) Medienzusatz

1 Fl. Azaserin-Hypoxanthin 50x

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

### **2.15.4 Hybridom-Bildung**

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

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

### **2.15.5 Testen der Klone**

Die 96-well-Platten wurden ab dem siebten Tag nach der Hybridom-Bildung fast täglich auf wachsende Klone hin untersucht. Bei Klonen die etwa ein Drittel des wells ausfüllten, wurde das Medium fast ganz abgezogen und neues Medium zugegeben. Am nächsten Tag wurde bei diesen wells etwa 100 µl Medium abgenommen und dieses Medium mit den enthaltenen Antikörpern mittels eines ELISA getestet. Erwünscht war eine Bindung an das ASAP1-Protein und keine Bindung an das GST-Protein.

### **2.15.6 Aufreinigung der Antikörper**

Die Aufreinigung der Antikörper erfolgte exakt nach dem Protokoll von Harlow und Lane, 1998.

### **2.16 Benutzung eines SH3 TransSignal SH3 Domain Array**

Der Versuch wurde komplett nach den Vorschriften des Herstellers (BioCat) durchgeführt, mit einer Modifikation: Es wurden anstelle von Bakterienextrakten Zelllysate eingesetzt. Zur Detektion wurde der monoklonale anti-ASAP1-Antikörper 7B12 eingesetzt.

### **2.17 Zellkulturmethoden**

Alle eukaryotischen Zelllinien wurden in einem Brutschrank (Heraeus, Stuttgart) in befeuchteter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Zellkulturflaschen kultiviert. Die Arbeitsschritte mit Zelllinien erfolgten soweit möglich an einer Sterilbank (Glatt AG, Schweiz). Medien, Puffer, Glaswaren und sonstiges Verbrauchsmaterial für die Zellkultur wurde vor Gebrauch sterilisiert (120 °C, 1,4 bar, 20 min).

#### **2.17.1 Passagieren von Zellen**

Bei allen adhären wachsende Zellen wurde die Zellen vor Erreichen der Konfluenz von der Zellkulturschale abgelöst und in geringerer Dichte erneut ausgesät. Hierzu wurden alle Lösungen auf 37 °C vorgewärmt. Das Medium wurde abgesaugt und die Kulturflasche mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,6 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gespült. Je nach verwendeter Zelllinie wurde 0,05 bzw. 0,25 % Trypsinlösung (0,1 ml/cm Durchmesser der Kulturschale) auf die Zellen gegeben. Bis zum Ablösen der Zellen von der Kulturschale wurde diese in den Brutschrank gestellt (1-5 min). Anschließend wurden die Zellen je nach Größe der Kulturflasche in 5-10 ml Kulturmedium aufgenommen und vor dem Ausplattieren aus dem trypsinhaltigen Medium für 3 min bei 300 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und in der jeweils gewünschten Verdünnung auf neue Kulturflaschen verteilt. Für ein Experiment wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Anzahl an Zellen ausgesät.

#### **2.17.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

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

Logarithmisch wachsende Zellen wurden trypsinisiert und die erhaltene Zellsuspension

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

### **2.17.3 Stabile und transiente Transfektionen mit GenePORTER**

Vierundzwanzig Stunden vor der Transfektion wurden die dafür vorgesehenen Zellen gesplittet und neu ausgesät. Die stabile Transfektionen wurden in 6-well Petrischalen mit  $3-4 \times 10^5$  Zellen, bei einer Konfluenz von 60-80% durchgeführt. Die Transfektionen wurden mit dem liposomalen Transfektionsreagenz GenePORTER (PeqLab) genau nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt. 2 µl Maxi-Präp.-Plasmid-DNA und 10 µl Transfektionsreagenz wurden für 4 h Transfektion eingesetzt. Die Zellen wurden nach 48 h neu ausgesät und mit dem entsprechenden Antibiotikum selektioniert. Nach 1-2 Wochen wurden sichtbare Klone gepickt und in 24 well Petrischalen überführt. Die Zellen wurden weiterhin mit Antibiotikum selektioniert und bei entsprechender Zellzahl in 10 cm Petrischalen überführt und expandiert.

Die transient transfizierten Zellen 24-72 h nach der Transfektion für Versuche eingesetzt, somit entfiel die Selektion.

### **2.17.4 Ermittlung der Transfektionseffizienz**

Bei durchgeführten Transfektionen wurde die Transfektionseffizienz durch Cotransfektion mit GFP (green fluorescence protein, 2 µg/10 cm bzw 0,5 µg/6 cm Petrischale) bestimmt. 24 h nach der Transfektion konnte dann per Durchflusszytometer (FACS-can, BD-Bioscience) die Transfektionseffizienz, durch den Vergleich mit untransfizierten Zellen bestimmt werden.

## **2.18 Funktionelle in vitro Methoden**

### **2.18.1 Wundheilungsexperiment (Kratzassay)**

Zellen wurden in Fibronectin (10 µg/ml in 3 ml) beschichteten 6 cm Petrischalen ausgesät und wie oben beschrieben transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde mit einer sterilen 1 ml Pipettenspitze eine Bahn in die konfluenten Zellen geritzt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gespült, anschließend wurde RPMI/10% FCS-Medium zugegeben.

Unter dem Mikroskop wurde eine Stelle in der Bahn von unten markiert. Diese Markierung diente der Orientierung bei der Beobachtung der Zellmigration. Der Spalt im Zellrasen wurde alle 24 h an der markierten Stelle mit Hilfe eines Binokulars (Zeiss) und einer AxioCam (Zeiss) fotografiert. Der ebenfalls mit der gleichen Vergrößerung fotografierte Mikrometerraststab diente bei der anschließenden Auswertung, mit Hilfe des Programms Photoshop (Adobe) zur Vermessung der zurückgelegten Wegstrecke der in den Spalt einwandernden Zellen. Zellen die sich von dem Zellrasen lösten und in den Spalt absetzten wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Vor dem Fotografieren wurden die Zellen dreimal mit PBS gespült um freischwimmende Zellen zu entfernen, anschließend wurde das adäquate Kulturmedium zugegeben.

### **2.18.2 Adhäsionsexperimente**

96 well Suspensionszellplatten wurden über Nacht bei 4°C mit 75 µl (10 µg/ml) Fibronectin beschichtet. Vor der Aussaat der transient transfizierten Zellen in Triplikaten ( $4 \times 10^4/100 \mu\text{l/well}$ ) wurden die Platten dreimal mit PBS gespült und anschließend abgesaugt. Nach 15 min bzw. 1 h Inkubation bei 37°C wurden die gebundenen Zellen mit serumfreien Medium zweimal gespült und in 70% Ethanol für 30 min bei 4°C fixiert. Nach dreimaligen spülen mit dest. Wasser, wurden die Zellen mit 100 µl/well Kristallviolett (0,1%), für 25 min bei Raumtemperatur gefärbt. Nach zweimaligen waschen in dest. Wasser und 10 min trocknen bei Raumtemperatur, wurden die Zellen mit 50 µl Essigsäure (10%) unter leichten Schütteln für 10 min bei Raumtemperatur entfärbt. Diese gefärbte Essigsäurelösung wurde in neue 96 well-Platten umpipettiert und bei einer optischen Dichte von 595 nm mit einem ELISA-Reader ELx808-I (Dibiotech) gemessen. Die Extinktionswerte sind proportional zur Zellzahl.

### **2.18.3 Proliferationsexperimente**

Transient transfizierte Zellen wurden 24 h nach der Transfektion in Triplikaten zu je 2 bzw.  $4 \times 10^4$  Zellen (in 100 µl bzw. 200 µl Kulturmedium mit 10% FCS) in Flachboden-96 well-Platten ausgesät und für 6 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl/well 1:5 in serumfreien Medium verdünnten [<sup>3</sup>H]-Thymidin wurden die Zellen über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für eine Stunde mit Trypsin inkubiert und mit Hilfe eines Zellerntegerätes (Tomtec) auf Filtermatten TypA (Wallac, Turku, Finnland) überführt. Nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit und dem Einschweißen in Folie, konnte die Radioaktivität anhand eines 1450 - Zählautomaten (Wallac Oy 1450 MicroBeta) bestimmt werden. Je höher der ermittelte Wert, desto mehr DNA wurde synthetisiert, desto höher ist die Proliferationsrate der getesteten Zellen.

### **2.18.4 Ermittlung der Apoptoserate**

Transient transfizierte Zellen wurden mit 0,02% Trypsin von den Kulturplatten gelöst und 1 x mit PBS gewaschen. Nach dem Abzentrifugieren (1300 U/min, 3 min) wurden Zellen mit 70%igen Ethanol für 1 h bei 4°C fixiert, erneut mit PBS gewaschen und abzentrifugiert (1300 U/min, 3 min). Die Zellen wurden nun in PBS resuspendiert ( $1 \times 10^5$  Zellen/ml PBS) und unter Zugabe von Propidiumjodid (PI, 50 µg/ml, Anfärbung der DNA) und RNase (50 µg/ml, zum Abbau der RNA, welche ebenfalls durch PI angefärbt wird) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit diesen Ansatz konnte nun per Durchflusszytometer (FACS-can, BD-Bioscience) die Apoptoserate anhand des sub-G1-Peaks bestimmt werden, wodurch fragmentierte DNA detektiert wird.

### **2.19 Tiermethoden**

Die beschriebenen Tierversuche wurden gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Experimente sind alle vom Regierungspräsidium genehmigt worden. Alle hier beschriebenen Rattenstämme sind aus den Tierhaus des ITG.

### **2.19.1 Tumorwachstum und Metastasierungsexperimente in Ratten**

Um das Tumorwachstum und das Metastasierungsverhalten der Dunning-Zelllinien zu testen, wurden  $1 \times 10^6$  Zellen/PBS subcutan in Kopenhagen-Ratten injiziert. Bei Erreichen des Größenlimits des Tumors wurden die Ratten getötet und einer Autopsie unterzogen. Dabei wurden die Ratten auf Metastasen untersucht. Die Durchmesser der Tumore und herauspräparierter Lymphknoten wurden vermessen. Die Tumor- und Lymphknotenvolumina wurden anhand der Formel  $V = 4/3 \cdot r^3$  berechnet.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung zweier subtraktiver Bibliotheken

Durch die Identifizierung Metastasen-spezifischer Gene erwarten wir Erkenntnisse über die Mechanismen der Metastasierung, damit würden sich eine Vielzahl von diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten zur Behandlung von Krebs eröffnen. Aus diesem Grund ist es notwendig das Repertoire von Genen zu beschreiben und zu vergleichen, welche speziell in den metastasierenden Zellen, aber nicht in ihren nicht-metastasierenden Gegenstücken exprimiert werden.

Um nun Gene zu finden, die bei den grundlegenden Mechanismen dieser Tumorzellmetastasierung beteiligt sind und um die große Anzahl von Genen, die bereits anhand der in der Einleitung beschriebenen SSH-Methode isoliert wurden, auf wenige bei der Metastasierung essentielle Gene zu reduzieren, wurden die Klone der subtraktiven Pankreas-Adenokarzinom-spezifischen Bibliothek (PLSSH von Stein et al., 1997) und der Brust-Adenokarzinom-spezifische Bibliothek (MLSSH Nestl et al., 2001) anhand der DNA-Mikroarray-Technologie analysiert.

Der Vorteil der DNA-Mikroarray-Technologie besteht darin, dass alle SSH-Klone mit einem Versuch hinsichtlich ihrer Expression in einem weiteren Tumorprogressionsmodell untersucht werden können. Mit herkömmlichen Northern-Blot-Analysen könnten dieselben Ergebnisse nur mit einem großen Mehraufwand an Zeit und Arbeit erzielt werden.

Das Ziel dieser DNA-Mikroarray-Analysen besteht also darin, mit einer schnellen und dennoch zuverlässigen Methode die für ein Labor nicht zu bewältigende Anzahl von 268 SSH-Klonen auf wenige, essentielle „Metastasengene“ zu reduzieren, die anschließend weitercharakterisiert werden können.

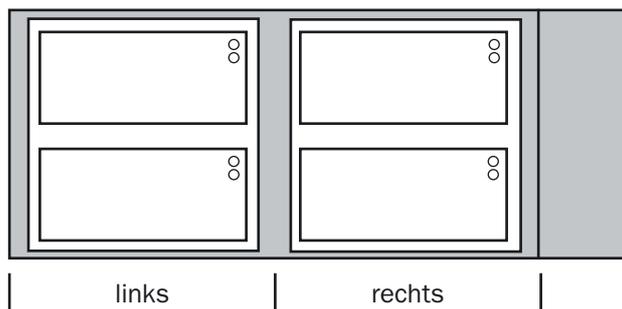
##### 3.1.1 DNA-Mikroarray-Design

Da in den Mikroarray-Experimenten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zwei Zustände miteinander verglichen wurden (metastasierend/nicht-metastasierend), musste der DNA-Mikroarray-Design auf sog. Typ I Experimente (DeRisi et al., 1997) abgestimmt werden. Dies definiert, dass die zu untersuchenden RNAs mit Cy3 und Cy5 markiert und jeweils gegeneinander hybridisiert werden.

Folgende Punkte wurden beim Mikroarrayentwurf beachtet:

1. Jedes der 268 SSH-Klone sollte mehrmals auf den Glaschip aufgebracht werden, um möglichst viele Daten für die Validation zur Verfügung zu haben.
2. Der DNA-Array sollte zweigeteilt sein, um auf ein und denselben Mikroarray ein Dye-swap durchführen zu können. Dies bedeutet, dass auf einer Hälfte des Chips Cy3-markierte cDNA aus nicht-metastasierenden Zellen zusammen mit Cy5-markierter cDNA aus metastasierenden Zellen hybridisiert wird und auf der anderen Hälfte des Glasträgers genau entgegengesetzt markierte cDNA hybridisiert wird.

Die folgend Abbildung veranschaulicht den zu Grunde liegenden Design der DNA-Mikroarrays .



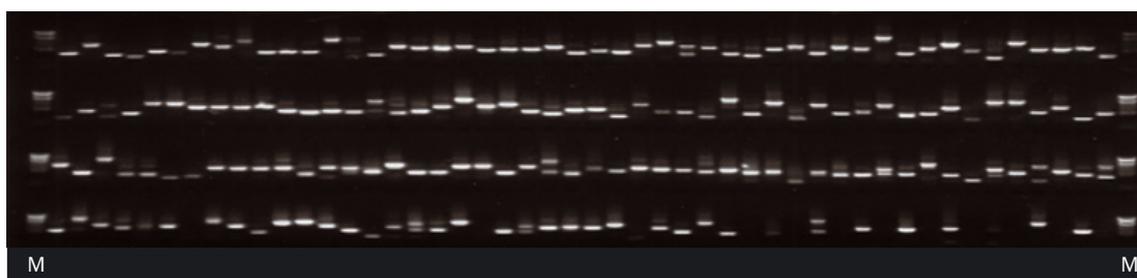
**Abb.3.1 Design des DNA-Mikroarrays.**

Diese schematische Draufsicht zeigt, dass der Array zweigeteilt ist (links und rechts dasselbe Aufbringungsmuster). Auf beiden Seiten wird jedes der 268 SSH-Klone (Kreise) in Quadruplikaten aufgebracht. Jedes der 268 SSH-Klone befindet sich also insgesamt achtmal auf einem DNA-Mikroarray .

### 3.1.2 Amplifizierung und Aufreinigung der SSH-Klone

Nachdem das Design des Arrays festgelegt wurde, mussten alle SSH-Klone der subtraktiven Pankreas-Adenokarzinom-spezifischen Bibliothek (PLSSH) und der Brust-Adenokarzinom-spezifischen Bibliothek (MLSSH) anhand spezifischer Oligonukleotide amplifiziert und aufgereinigt werden, um anschließend auf die Glaschips gespottet zu werden.

Hierzu wurden die PCR-Produkte nach der Vervielfältigung gereinigt und in Wasser gelöst (siehe „2. Material und Methoden“). Anschließend wurde 1/20 des Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen, um den Erfolg der Vervielfältigung zu überprüfen. In Abb. 3.2 ist exemplarisch ein Agarosegel gezeigt, auf das jeweils 5 µl der PCR-Reaktionen der Brust-Adenokarzinom-spezifischen Klone aufgetragen wurden. Alle Produkte wurden visuell überprüft und entsprachen den bei der Generierung der subtraktiven Bibliotheken festgestellten Größen.



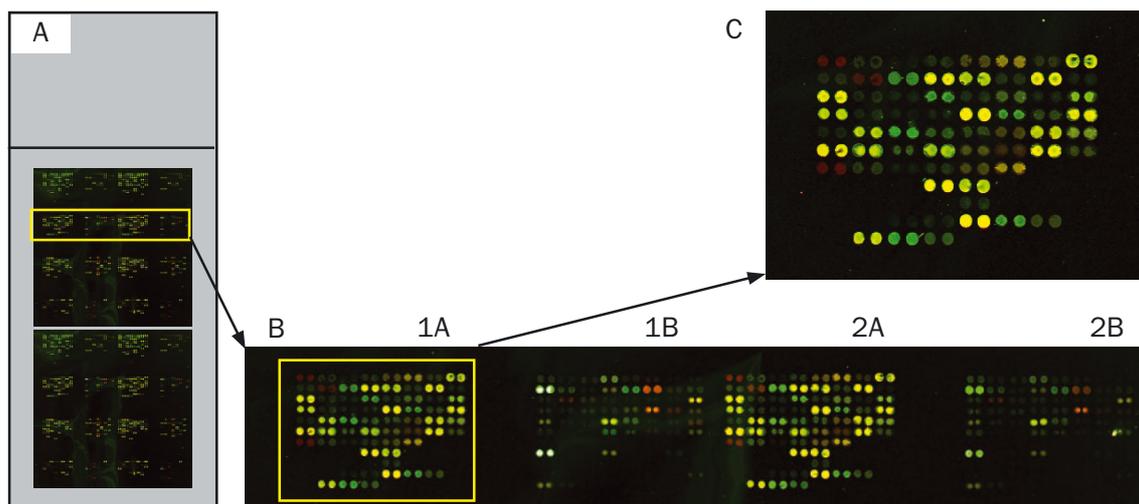
**Abb 3.2 Exemplarisches Agarosegel mit den PCR-Produkten.**

Agarosegel mit PCR-Produkten der Brust-Adenokarzinom-spezifischen subtraktiven Bibliothek, die als Sonden für die Mikroarrayproduktion verwendet wurden. Jeweils 5 µl der verschiedenen PCR-Reaktionen wurden auf ein TBE-Agarosegel geladen, um die Reaktion zu überprüfen. (M: Marker, 100 bp-Leiter der Firma GIBCO).

### 3.1.3 Spotten der SSH-Klone auf die Glaschips

Für die Herstellung der DNA-Mikroarrays wurden Glasträger mit dem Substrat CMT-GAPS (Corning Lifesciences) herangezogen. Die Aufbringung der amplifizierten subtraktiven Bibliotheken erfolgte mit dem Spotter Omnigrad 100 (GeneMachines, Santa Barbara, CA, USA). Es wurden Nadeln verwendet, die Spots mit einem mittleren Durchmesser von 100 µm produzieren. Bei diesen Drucknadeln handelt es sich um SMP3-Pins (TeleChem), die in der Spitze einen Spalt besitzen, der die DNA-Lösung beim Druckvorgang über Kapillarkräfte aufnimmt und beim anschließenden Absetzen der Nadel auf dem Substrat einen Tropfen DNA-Lösung zurücklässt.

Wie in Abb. 3.3 dargestellt, wurden die Spotts blockweise aufgebracht, so dass sich auf beiden Seiten des zweigeteilten Arrays die Quadruplikate jeden Klon auf zwei Blöcke mit je einem Duplikat verteilen. Jeder der 268 SSH-Klone befindet sich also insgesamt achtmal auf einem DNA-Mikroarray. Pro Array konnten also 2144 Spots ausgewertet werden ( $268 \text{ Gene} \times 8 = 2144$ ). Für die Validation der Ergebnisse wurden zusätzlich Kontrollen mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert (siehe „2. Material und Methoden“). Bei diesen Kontrollen handelt es sich um Gene, die in den für die Versuche vorgesehenen Zelllinien äquivalent exprimiert werden. Anhand dieser Kontrollgene können differentiell exprimierte Gene aus den subtraktiven Bibliotheken normalisiert werden, was bewirkt, dass die Werte der Hoch- bzw. Herunterregulierung der einzelnen differentiell exprimierten Gene genau ermittelt werden können. Die ausgewählten Kontrollgene sind HPRT, GAPDH und -Actin, welche auf 24 Klone (8 pro Kontrollgen) verteilt wurden. Diese Kontrollgene wurden ebenfalls 8-mal auf jeden DNA-Array gespottet, so dass anhand von 192 Kontrollgenen ( $24 \text{ Kontrollgene} \times 8 = 192$ ) pro Array normalisiert werden konnte. Für die Auswertung eines DNA-Mikroarrays standen also insgesamt 2336 Spots zur Verfügung, zusammengesetzt aus 2144 SSH-Klonen und 192 Kontrollgenen.



**Abb. 3.3** Hybridisierter DNA-Mikroarray zur Veranschaulichung des Designs.

**A:** Überblick über den gesamten Array. **B:** Ausschnitt über die gesamte Breite des Arrays. Es ist zu erkennen, dass die Spots blockweise aufgebracht sind. Die Quadruplikate jeden Klon sind in zwei Blöcke aufgeteilt (1A/2A bzw. 1B/2B). **C:** Nahaufnahme eines Blockes. Deutlich zu erkennen die in der gleichen Intensität fluoreszierenden Gen-Duplikate.

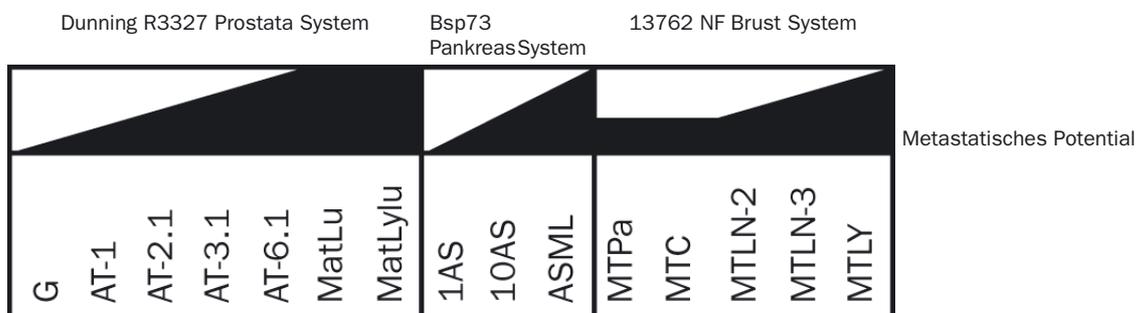
### 3.1.4 Auswahl der Zelllinien für die Hybridisation der DNA-Mikroarrays

Die Grundüberlegung bei diesem Versuchsansatz war, dass Gene, die essentiell für Tumormetastasierung sind, eine Assoziation ihrer Expression zum metastatischen Phänotyp nicht nur in einer Tumorart aufzeigen durften. So sollten mit dieser Arbeit Gene identifiziert werden, die nicht nur beim metastasierenden Bauchspeicheldrüsenkrebs differentiell exprimiert sind oder beim metastasierenden Brustdrüsenkrebs, vielmehr sollte sich bei diesen Zielgenen die differentielle Expression mit Assoziation zum metastatischen Zustand über mehrere Tumorarten erstrecken.

Aus diesem Grund wurden die differentiell exprimierten Gene der subtraktiven Pankreas-Adenokarzinom-spezifischen Bibliothek (PLSSH) und der Brust-Adenokarzinom-spezifischen Bibliothek (MLSSH), welche sich auf dem DNA-Mikroarray befanden, mit RNA aus Zellen hybridisiert, die aus einem dritten uns verfügbaren Tumorprogressionsmodell entstammen: dem Dunning 3327 Prostata-System.

Das Dunning 3327 Prostata-System setzt sich aus sieben Zelllinien zusammen (siehe „1. Einleitung“), die, angefangen bei der nicht-metastatischen Zelllinie G über die leicht metastatische Zelllinie AT-1, über AT-2.1, AT-3.1, AT-6.1 bis zu den hochmetastatischen Zelllinien MatLu und MatLylu, ein immer größer werdendes metastatisches Potential aufweisen (siehe Abb. 3.4).

Für die RNA- Isolation, die reverse Transkription in Fluoreszenz-markierte cDNA und die anschließende Hybridisation wurden die von metastatischen Potential am weitesten auseinander liegenden Zelllinien G (nicht metastatisch) und MatLylu (hoch metastatisch) ausgewählt.



**Abb. 3.4** Drei unterschiedliche Rattentumorprogressionssysteme.

Die schwarzen Balken stellen das metastatische Potential der einzelnen Zelllinien dar, welches in jedem Tumorprogressionssystem von links nach rechts ansteigt.

Zelllinien der SSH-Reaktion der subtraktiven Pankreas-Adenokarzinom-spezifischen Bibliothek (PLSSH von Stein et al., 1997)

Zelllinien der SSH-Reaktion der subtraktiven Brust-Adenokarzinom-spezifischen Bibliothek (MLSSH Nestl et al., 2000)

Zelllinien für die RNA-Isolation, die reverse Transkription in Fluoreszenz-markierte cDNA und die anschließende Hybridisation auf dem DNA-Array

### 3.1.5 Hybridisation und Auswertung der DNA-Arrays

Die Zelllinien G bzw. MatLylu aus dem Dunning R3327 Prostata-System wurden auf 15 cm-Kulturschalen ausgesät und bei einer Konfluenz von über 90% geerntet. Die RNA aus diesen Zelllinien wurde mit einem RNA-Extraktionskit der Firma Macherey&Nagel gewonnen und anschließend durch eine reverse Transkription die Fluoreszenz-markierte cDNA hergestellt (siehe „2. Material und Methoden“). Diese wurde anschließend auf den DNA-Mikroarray hybridisiert.

Es wurden drei Wiederholungen der Hybridisierung durchgeführt und eine globale Normalisierung der Rohdaten vorgenommen (siehe „2. Material und Methoden“). Tabelle 3.1 zeigt die differentiell exprimierten Gene, welche in der hochmetastatischen Zelllinie MatLylu, im Vergleich zu der nicht-metastatischen Zelllinie G, hochreguliert sind.

Wie in der Tabelle 3.1 sichtbar, konnten die 268 Gene der SSH-Bibliotheken auf 40 Gene reduziert werden, welche nun durch weiterführende Studien auf ihre Funktionalität bei der Metastasierung hin untersucht werden können.

Name des SSH-Klons	x-fach hochreguliert in MatLylu
HMGI	16,2
Thrombospondin	15,3
CD24	11,0
CINC-2-alpha	10,2
novel 143	8,2
novel 32	8,0
Caveolin 1 alpha	8,0
Hai2-Spint2	7,6
Klon 185	7,5
Calcyclin	7,1
novel 164	7,0
novel 132	7,0
Klon 225	6,2
novel 101	5,2
GPR2	4,3
Caveolin 2	4,2
Cytokeratin 8	4,2
Annexin I	3,9
Supervillin	3,5
metastases-asso. factor	3,5
UPA	3,3
human novel protein AHNAK	3,1
Claudin 6	3,0
ovarian Cathepsin B ampl.	2,9
Calgizzarin	2,8
Pyruvatkinase	2,7
IAP	2,6
Ezrin	2,6
novel 137	2,4
ribosomales Protein L36	2,3
Calpactin II	2,3
BSK-J4-RA3 RA-MO-III	2,3
TGF alpha	2,3
ASAP1	2,2
novel 71	2,2
ALEX3	2,1
novel 29	2,0
Parathyroid Hormon Rezeptor	2,0
novel 95	2,0
novel 14	2,0

**Tab. 3.1 Prostata-Adenokarzinom-System (G/MatLylu) auf PLSSH/MLSSH-DNA-Array.**

In dieser Tabelle sind die Gene dargestellt, die in der hochmetastatischen Zelllinie MatLylu eine x-mal höhere Expression aufweisen als in der nicht-metastatischen Zelllinie G. Da diese Gene sowohl in dem Bauchspeicheldrüsen-Adenokarzinom-System als auch in dem Brust-Adenokarzinom-System differentiell exprimiert werden, sind dies die gesuchten Zielgene, die in mehreren unterschiedlichen Tumorprogressions-Systemen der Ratte eine Assoziation mit dem metastatischen Phänotyp aufweisen. Die ursprünglich in Betracht kommenden 268 Gene wurden somit auf 40 Gene reduziert, welche nun durch weiterführende Studien auf ihre Funktionalität bei der Metastasierung hin untersucht werden können.

### 3.2 Charakterisierung von ASAP1

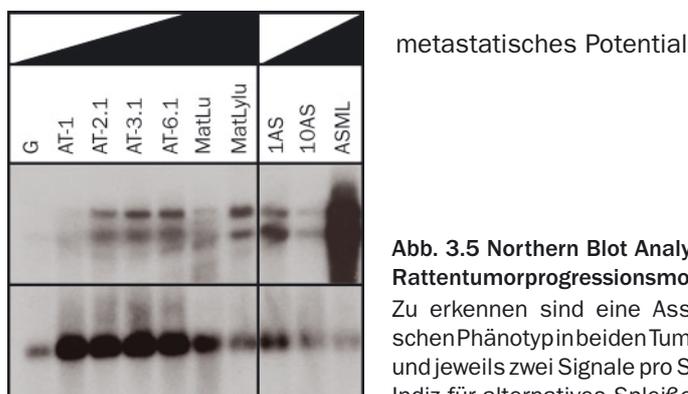
Anhand der Mikroarray-Analysen der beiden SSH-Bibliotheken, bei der das Ziel war, die 268 SSH-Klone auf wenige, essentielle „Metastasengene“ zu reduzieren, konnte ASAP1 als Kandidat für weiterführende Studien identifiziert werden. Es befand sich unter den 40 identifizierten Zielgenen, die nun auf ihre Funktionalität bei der Metastasierung hinuntersucht werden können. Durch eigene Vorarbeiten während meiner Diplomarbeit, bei der ich Klone der subtraktiven Pankreas-Adenokarzinom-spezifischen Bibliothek (PLSSH von Stein et al., 1997) und der Brust-Adenokarzinom-spezifische Bibliothek (MLSSH Nestl et al., 2000) analysierte, konnte ich bereits zeigen, dass die Expression von ASAP1 auf Northern Blot-Ebene eng mit dem metastatischen Phänotyp korreliert. Obwohl diese Korrelation noch nicht in der Literatur beschrieben wurde, deuteten auch die biologischen Funktionen von ASAP1 (siehe „1. Einleitung“) darauf hin, dass es eine wichtige Funktion bei dem Prozess der Metastasierung ausüben könnte.

Da ASAP1 bis jetzt noch nicht im Zusammenhang mit Tumorprogression oder Metastasierung in der Literatur erwähnt wurde und aufgrund der oben angeführten Sachverhalte, wurde dieses Gen ausgewählt, um seine Rolle bei der Tumorprogression und der Metastasierung zu charakterisieren.

#### 3.2.1 Differentielle Expression von ASAP1 in Rattentumorprogressionsmodellen

Nachdem mehrere Kopien von ASAP1 in der subtraktiven PLSSH-Bibliothek identifiziert wurden, war der erste Schritt der Analyse dieses Gens, seine Expression in unterschiedlichen Tumorprogressionsmodellen festzustellen. Hierzu wurden während meiner Diplomarbeit Northern Blot Analysen durchgeführt (Abb. 3.5).

Für die Durchführung des Northern Blots wurden 100 ng des ASAP-1-cDNA-Fragmentes aus der subtraktiven PLSSH-Bibliothek mit [<sup>32</sup>P]-dCTP markiert (Prime-it II, Radom Primer Labeling Kit, Stratagene) und mit der an eine Nylonmembran gebundenen RNA aus Zelllinien zweier Rattentumorprogressionsmodelle hybridisiert. Die Auswertung des damit exponierten Röntgenfilms zeigt, dass ASAP1 in beiden Tumorprogressionsmodellen eine Assoziation zum metastatischen Phänotyp aufweist. Sowohl in der hochmetastatischen Zelllinie MatLylu (Prostata) als auch in der hochmetastatischen Zelllinie ASML (Pankreas) ist eine Hochregulierung der ASAP1-mRNA im Vergleich zu den jeweiligen nicht metastatischen Gegenstücken G (Prostata) und 1AS (Pankreas) festzustellen. Ebenfalls erkennbar sind zwei Signale



**Abb. 3.5 Northern Blot Analyse von ASAP1 auf zwei Rattentumorprogressionsmodellen.**

Zu erkennen sind eine Assoziation zum metastatischen Phänotyp in beiden Tumorprogressionsmodellen und jeweils zwei Signale pro Spur bzw. Zelllinie, was ein Indiz für alternatives Spleißen ist.

pro Spurbzw. Zelllinie, was auf alternatives Spleißen von ASAP1 im Rattensystem hindeutet. Die differentielle ASAP1-Expression, die im Northern Blot festgestellt wurde bestätigt also die Ergebnisse der DNA-Mikroarray-Analysen.

### 3.2.2 ASAP1-Expressionsstudien in humanen Tumoren im Vergleich zu Normalgeweben

Um die Frage zu klären, ob die ASAP1-Expression mit der humanen Tumorprogression korreliert, wurden Southern Hybridisationsanalysen durchgeführt. Ein cDNA-Array, welcher Proben unterschiedlicher Tumortypen und deren korrespondierende Normalgewebe enthielt, wurde für die Hybridisation von einem  $^{33}\text{P}$ -markierten Fragment der menschlichen ASAP1-cDNA herangezogen.

Da die Sequenz des humanen ASAP1 noch nicht in der Literatur beschrieben war, musste zuerst menschliche ASAP1-cDNA isoliert werden. Hierfür wurden anhand von cDNA-Sequenzhomologien zwischen *bos taurus*- und *mus musculus*-ASAP1 Oligonukleotide entworfen, welche über eine PCR-Reaktion mit menschlicher Milz-cDNA-Bibliothek, ein 560 bp-langes, humanes ASAP1-cDNA-Fragment vervielfältigen sollten (siehe Abb. 3.6).

Nach erfolgreicher Amplifizierung und Klonierung der menschlichen ASAP1-cDNA wurde dieses Konstrukt sequenziert. Durch wiederholte Sequenzvergleiche im Internet (NCBI blast), konnten inzwischen die humanen ASAP1 Homologe DDEF1 bzw. KIAA1249 identifiziert werden.

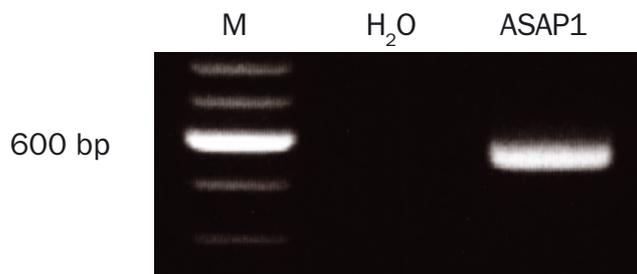
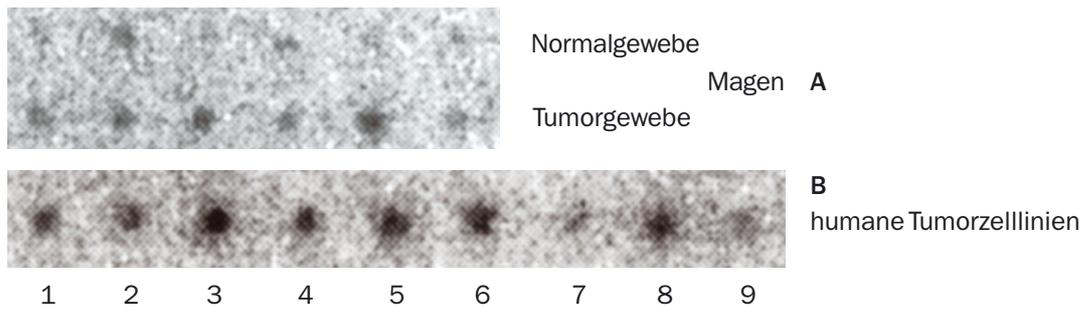


Abb. 3.6 Agarosegel mit PCR-Produkt des menschlichen ASAP1-Fragmentes.

Über Sequenzhomologien zu *bos taurus*- und *mus musculus* ASAP1, konnte ein 560 bp langes menschliches ASAP1-cDNA-Fragment vervielfältigt werden. M:100bp Marker, H<sub>2</sub>O: Wasserkontrolle, ASAP1: 560bp langes humanes ASAP1-cDNA-Fragment.

Dieses menschliche ASAP1-Fragment wurde nun radioaktiv markiert um anschließend durch Hybridisierung auf dem cDNA-Array Expressionsstudien durchzuführen.

Wie in Abbildung 3.7 dargestellt und in Tabelle 3.2 zusammengefasst, korreliert die Expression von ASAP1 mit dem Tumorphänotyp in zahlreichen Organen. ASAP1 ist hochreguliert in Tumoren der Organe: Niere, Brust, Prostata, Uterus, Ovar, Dickdarm, Magen, Rektum und in allen getesteten menschlichen Krebszelllinien.



1. HeLa
2. Burkitt's Lymphom, Daudi
3. Chronische myeloische Leukämie K562
4. Promyeloische Leukämie HL-60
5. Melanom G361
6. Lungenkarzinom A549
7. Lymphoblastische Leukämie MOLT-4
8. Kolorektales Adenokarziom SW480
9. Burkitt's Lymphom, Raji

**Abb. 3.7 ASAP1 Expressionsstudien auf cDNA-Array.**  
Exemplarische Darstellung zweier Regionen des cDNA-Arrays, welche mit dem <sup>33</sup>P-markierten Fragment der menschlichen ASAP1-cDNA hybridisiert wurden. **A:** ASAP1 Signale in Tumorgeweben des Magens im Vergleich mit Normalgeweben des Magens. **B:** ASAP1 Signale in allen getesteten humanen Tumorzelllinien. Die zu den Nummern gehörenden humanen Tumorzelllinien stehen in der Liste links. Die zusammengefassten Ergebnisse der ASAP1-Expression dieses Versuches sind der Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Gewebe	Zusätzliche Informationen	ASAP1 Signal
Niere	renales Zellkarzinom, Grad:II-III,1B (Koordinaten auf cDNA-Array)	+
	Transitionelles Zellkarzinom, III-IV, 2B	+
	renales Zellkarzinom, invasiv, 6B	+
	renales Zellkarzinom, II/III, metastasierend, 7B	+
	renales Zellkarzinom, III, metastasierend, 8B	+
	renales Zellkarzinom, 12B	++
	renales Zellkarzinom, 13B	++
	renales Zellkarzinom, 14B	++
Brust	Karzinom (infiltrating duct carcinoma), metastasierend 6E	++
	Karzinom (infiltrating duct carcinoma), metastasierend, 7E	+
	Adenokarzinom (mucinous adenocarcinoma), metastasierend, 8E	+
	Karzinom (infiltrating duct carcinoma), metastasierend, 9E	+
Prostata	Adenokarzinom, VII, 11E	++
	Adenokarzinom, VIII, 12E	++
	Adenokarzinom, VII, 13E	++
Uterus	Karzinom (keratinizing squamous cell carcinoma), 2H	+
	Benigner Tumor, 4H	+
	Benigner Tumor, 5H	+
Ovar	Adenokarzinom, metastasierend, 11H	+
	Adenokarzinom (papillary adenocarcinoma), metastasierend, 12H	+
Dickdarm	Benigner Tumor, 1K	++
	Adenokarzinom, metastasierend, 2K	+
	Adenokarzinom, 4K	++
	Adenokarzinom, metastasierend, 6K	++
	Adenokarzinom, metastasierend, 8K	+
Magen	Zystadenokarzinom, 1N	++
	Adenokarzinom, metastasierend, 2N	++
	Adenokarzinom, 3N	++
	Karzinom (signet ring cell carcinoma), metastasierend, 4N	++
	Adenokarzinom, 5N	++
	Adenokarzinom, 6N	+
	Karzinom (carcinoma simplex), metastasierend, 7N	+
	Adenokarzinom, metastasierend, 8N	+
Rektum	Adenokarzinom, metastasierend, 10N	+
	Adenokarzinom, 11N	+
	Adenokarzinom, 12N	+
	Adenokarzinom, 13N	+
	Adenokarzinom, metastasierend, 14N	+
	Adenokarzinom, metastasierend, 15N	+
	Adenokarzinom, 16N	+
Zelllinien	HeLa	++
	Burkitt's Lymphom, Daudi	++
	Chronische myeloische Leukämie K562	++
	Promyeloische Leukämie HL-60	++
	Melanom G361	++
	Lungenkarzinom A549	++
	Lymphoblastische Leukämie MOLT-4	+
	Kolorektales Adenokarziom SW480	++
Burkitt's Lymphom, Raji	+	

Tab. 3.2 Zusammenfassung der ASAP1 Expressionsstudien auf cDNA-Array

### 3.2.3 In situ Hybridisation von menschlichen Tumorschnitten mit Fluoreszenz-markierter ASAP1-mRNA

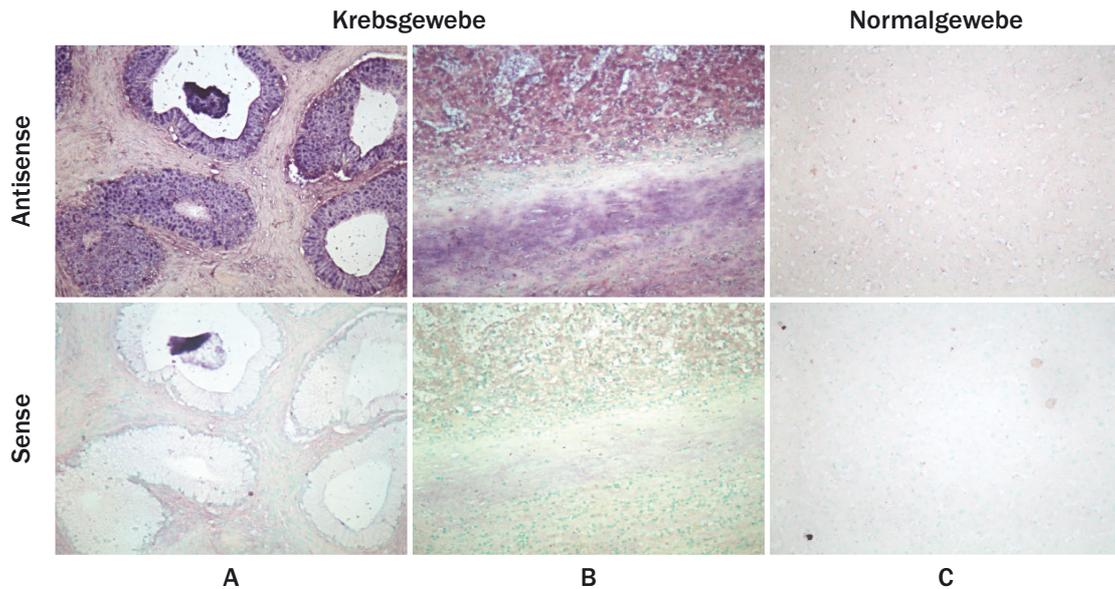
Das wichtigste Ziel meiner Arbeit mit ASAP1 ist, abzuklären, ob die im Rattentumorprogressionsmodell gezeigte Assoziation von ASAP1 zum metastatischen Zustand auch auf die menschliche in vivo Situation zutrifft. Eine Möglichkeit dies zu überprüfen ist immunhistologische Analysen von Tumorgewebe durchzuführen, die menschlichen Krebspatienten entnommen wurden.

Da es aber noch keine erwerblichen anti-human-ASAP1-Antikörper gab, standen zu Beginn die Analysen von menschlichen Tumorgewebe in situ Hybridisationen (ISH) mit Hilfe des humanen ASAP1-Fragmentes an. Falls diese ISH-Studien auf eine Beteiligung von ASAP1 bei der Tumorprogression oder der Tumormetastasierung hindeuteten, sollte mit der Generation von anti-human-ASAP1-Antikörpern begonnen werden, um damit immunhistologische Analysen von Tumorgewebe durchzuführen.

So wurde nach Amplifizierung und Klonierung der menschlichen ASAP1-cDNA, dieses Konstrukt herangezogen, um durch reverse Transkription Fluoreszenz-markierte anti-sense-RNA herzustellen. Diese wurde als Sonde für die in situ Hybridisation (RNA-FISH) mit menschlichen Tumor-/Normalgewebe eingesetzt. Hybridisationen mit der Fluoreszenz-markierten sense-RNA desselben Konstruktes wurden als Negativkontrolle benutzt.

Wie in Abbildung 3.8 und in der Zusammenfassung der ISH-Ergebnisse in Tabelle 3.3 dargestellt, konnte eine starke Expression von ASAP1-mRNA in unterschiedlichen menschlichen invasiven Tumoren festgestellt werden und nur eine sehr geringe bis keine Expression in den korrespondierenden Normalgewebe.

ASAP1, dessen Expression in Rattentumorprogressionsmodellen als Metastasen-assoziiert identifiziert wurde, zeigt auch eine verstärkte Expression in menschlichen Tumoren. Um diese Ergebnisse auch auf der Proteinebene zu bestätigen, wurde als nächster Schritt monoklonale anti-ASAP1-Antikörper generiert, um damit immunohistochemische Färbungen von menschlichen Tumorschnitten durchzuführen. Diese Antikörper sollten auch bei späteren funktionellen Studien und bei der Detektion von ASAP1 in zahlreichen Versuchen zum Einsatz kommen.



**Abb. 3.8 ASAP1 Expression in menschlichen Tumorgeweben (RNA-FISH).**

Fluoreszenz-markierte ASAP1-antisense RNA wurde als Sonde für in situ Hybridisationen (RNA-FISH) von menschlichen Tumor-/Normalgeweben eingesetzt. Hybridisationen mit der Fluoreszenz-markierten sense RNA desselben Konstruktes wurden als Negativkontrolle benutzt. **A:** Ovar, mukosales Zystadenokarzinom **B:** Leber, hepatozelluläres Karzinom **C:** Leber, Normalgewebe

Organ	Diagnose	Stadium	Färbung
Esophagus	Zellkarzinom	III	++
Lunge	großes Zellkarzinom	IB	+++
Kolon	Adenokarzinom	I	++
Schilddrüse	Papillenkarzinom	I	++
Niere	Nierenzellkarzinom	I	++
Brust	Infiltrierendes ductales Karzinom	IIIA	+++
Leber	Hepatozelluläres Karzinom	IIIA	+++
Blase	Transitionelles Zellkarzinom	IV	+++
Ovar	Zystadenokarzinom	IIIc	++
Pankreas	Ductales Adenokarzinom	II	+
Pankreas	Ductales Adenokarzinom	III	+++
Prostata	Adenokarzinom	IV	++
Prostata	Adenokarzinom	I	+
Endometrium	Adenokarzinom	IIIA	++
Endometrium	Adenokarzinom	IB	++
Gallenblase	Adenokarzinom	IVB	+
Larynx	Zellkarzinom	IVA	+++
Uterus Cervix	Zellkarzinom	IIIB,IIA	+++
Bauch	Malignes Lymphom	IIEA	++
Kopfhaut	Malignes Melanom	III	+++

**Tab. 3.3 Zusammenfassung der ASAP1-Expression in menschlichen Tumorgeweben (RNA-FISH).**

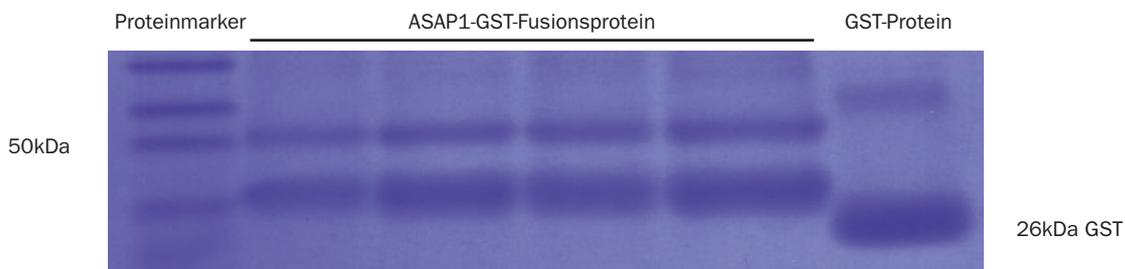
Diese Tabelle enthält die unterschiedlichen Organe, die Diagnose und das Stadium des Tumors, sowie die Stärke der Färbung durch die ISH-Reaktion. Alle Tumore zeigten eine erhöhte ASAP1-Expression im Vergleich zu korrespondierenden Normalgeweben, welche eine sehr geringe bis keine ASAP1-Expression zeigten.

### 3.2.4 Herstellung monoklonaler anti-ASAP1-Antikörper

Rekombinantes ASAP1-Fusionsprotein wurde präpariert um damit Mäuse zu immunisieren. Über eine Hybridomformation konnten dann monoklonale anti-human-ASAP1-Antikörper isoliert werden, die anschließend noch zu charakterisieren waren.

#### 3.2.4.1 Präparation eines ASAP1-GST-Fusionsproteins

Um ein Antigen für die Herstellung von Antikörpern gegen das ASAP1-Protein zu präparieren, wurde das 560 bp-lange humane ASAP1-Fragment an ein Glutathion-S-Transferase-Gen (GST) im pGEX-1 Vector fusioniert. Dieses Konstrukt führt zu einer induzierbaren Synthese des ASAP1-GST-Fusionsproteins. Das ASAP1-GST-Expressionskonstrukt wurde in LB21-Codon-Plus-E.coli-Bakterien (Invitrogen) transformiert. Nach vier Stunden Induktion der Proteinsynthese wurde das Fusionsprotein mit Glutathion-gekoppelter Agarose (Sigma) aufgereinigt (siehe Abb. 3.9). Mit diesem aufgereinigten Fusionsprotein wurden Mäuse immunisiert, um anschließend eine Hybridomformation durchzuführen (siehe „2. Material und Methoden“).



**Abb. 3.9 Coomassie gefärbtes Proteingel (SDS-PAGE) mit ASAP1-GST-Fusionsprotein**

Ein 560bp langes ASAP1-Fragment wurde an ein GST-Protein fusioniert, um es nach der induzierbaren Synthese des ASAP1-GST-Fusionsproteins einfacher isolieren zu können. Die Aufreinigung erfolgte anhand Glutathion-gekoppelter Agarose. Ein Aliquot von ca. 0,5% jeder aufgereinigten Fraktion wurde in separate Spuren eines SDS-PAGE geladen. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie Blau eingefärbt. Die vier Spuren, in welchen das ASAP1-GST-Fusionsprotein geladen wurde, enthalten je zwei Banden, wobei es sich bei der oberen Bande um das vollständige ASAP1-GST-Fusionsprotein handelt und bei der unteren Bande um Degradationsprodukte des Fusionsproteins. Die rechte Spur des SDS-PAGE enthält als Kontrolle reines GST-Protein.

#### 3.2.4.2 Testen der in den Hybridomüberständen enthaltenen Antikörper

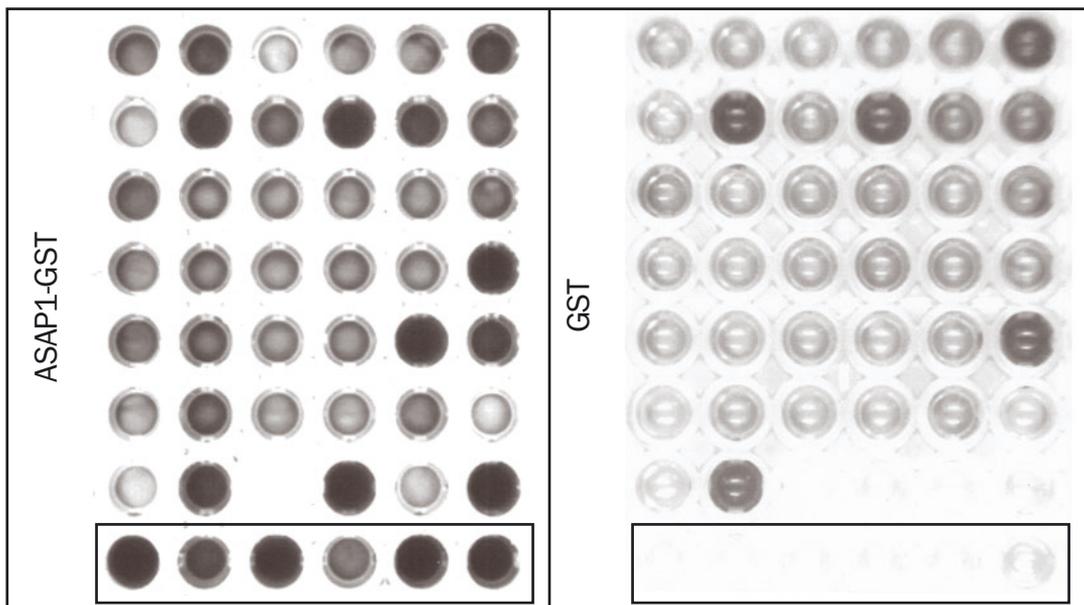
Nach erfolgreicher Immunisation von Mäusen mit dem ASAP1-GST-Fusionsprotein und Hybridomformation mussten die von den Hybridomen in die Überstände sezernierten Antikörper auf ihre Spezifität gegenüber ASAP1 überprüft werden.

Da für die Immunisierung der Mäuse ein ASAP1-GST-Fusionsprotein benutzt wurde, sollte es sowohl Hybridomklone, die monoklonale Antikörper gegen den ASAP1-Proteinanteil des Fusionsproteins sezernieren, als auch Hybridome, die monoklonale Antikörper gegen den GST-Proteinanteil des Fusionsproteins bilden, geben. Nur Hybridome, die monoklonale Antikörper produzieren, die ausschließlich das ASAP1-Protein erkennen, wurden weiter kultiviert.

Die Antikörperspezifität wurde mit der Technik des Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt. Hierzu wurden die beiden Antigene GST-Protein bzw. ASAP1-GST-Fusionprotein an 96well-ELISA-Platten gebunden (coaten). Von jedem Hybridomklon wurden dann je 100 µl des Überstandes auf die beiden

Antigen tragenden Platten pipettiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit und mehreren Waschschrritten wurden die an das Antigen gebundenen Antikörper mit Hilfe von HRP-konjugierten sekundären Antikörpern detektiert.

Falls eine Bindung des primären Antikörpers an das Antigen erfolgte, konnte dies nun durch eine Farbreaktion visualisiert werden, welche durch das an den sekundären Antikörper gebundene Enzym HRP in einer ABTS-Substratlösung katalysiert wird (siehe Abb. 3.10). Von jedem Hybridomklon wurde der Überstand auf beide Platten gegeben und nur Antikörper, die auf der ASAP1-GST-Protein-Platte eine Farbreaktion verursachten, aber nicht auf der GST-Protein-Platte, wurden als anti-ASAP-1-Antikörper klassifiziert und für spätere Charakterisierungen herangezogen.



**Abb. 3.10 ELISA-Platten mit Farbreaktionen, welche die Erkennung des Antigens durch die primären Antikörper visualisieren.**

Links, die ASAP1-GST-Protein beschichtete Platte, rechts die GST-Protein beschichtete Platte. Nur Antikörper, die ausschließlich ASAP1-GST erkennen, aber kein GST-Protein, wurden als monoklonale anti-ASAP1-Antikörper klassifiziert. Bei dem Umsatz von ABTS-Substrat durch das an den Sekundärantikörper gebundene HRP erfolgt eine Farbreaktion, welche die Spezifität des Primärantikörpers visualisiert. Die Überstände in den sechs eingerahmten Wells auf jeder Platte zeigen nur bei der ASAP1-GST-Platte Farbreaktionen und nicht auf der GST-Platte, somit produzieren diese sechs getesteten Hybridome monoklonale anti-ASAP1-Antikörper.

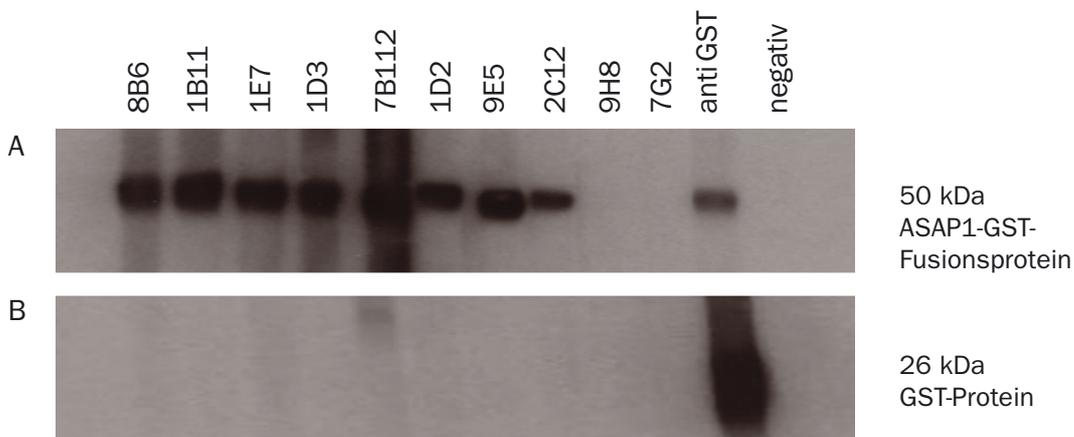
### 3.2.5. Charakterisierung der monoklonalen anti-ASAP1-Antikörper

Nachdem über den ELISA-Test 11 Hybridomklone identifiziert wurden, die monoklonale anti-ASAP1-Antikörper produzieren, wurden diese weiter kultiviert. Mit den Antikörper enthaltenden Überständen wurden weitere Tests durchgeführt, um die Einsatzmöglichkeiten jedes Antikörpers zu determinieren. Ziel bei diesen Untersuchungen war es, erstens die Antikörper genau zu charakterisieren und zweitens den oder die Antikörper mit dem weitesten Einsatzspektrum aufzureinigen, um mit diesen dann das ASAP1-Protein in unterschiedlichsten Versuchen zu detektieren.

### 3.2.5.1 Strip Westerns mit aufgereinigtem Protein zum Testen der anti-ASAP1-Antikörper

Um herauszufinden, welche der zu testenden Antikörper das ASAP1-Protein auf Westernebene detektieren, wurden Strip Westerns durchgeführt. Diese Art des Western Blots funktioniert exakt wie ein herkömmlicher Western, mit dem Unterschied, dass die proteintragende Membran nach dem Blotten in kleine, 3-4 mm breite Streifen geschnitten wird, mit welchen jeder Antikörper getestet wird. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass sehr geringe Antikörpermengen (0,5 ml konditioniertes Hyridommedium) eingesetzt werden können.

Um erneut zu testen, ob die Antikörperklone spezifisch ASAP1 binden und nicht mit dem GST-Protein kreuzreagieren, wurden die ersten beiden Strip Blots mit Proteinsuspensionen aus GST-Protein bzw. ASAP1-GST-Fusionsprotein beladen (siehe Abb. 3.11).



**Abb. 3.11 Monoklonale anti-ASAP1-Antikörper auf Strip Blots.**

Die Strip Blots **A** wurden mit ASAP1-GST-Fusionsprotein beladen und die Strip Blots **B** mit GST-Protein. Die erwartete Größe des ASAP1-GST-Fusionsproteins liegt bei ca. 50 kDa; bis auf zwei Antikörper zeigen alle eine Bande auf dieser Höhe. Die Größe des GST-Proteins liegt bei ca. 26 kDa und wird durch keinen der getesteten Antikörper detektiert. Somit sind alle Antikörper, die im ASAP1-GST-Fusionsprotein Blot A ein Signal zeigen, monoklonale anti-ASAP1-Antikörper. negativ = nur Sekundärantikörper

### 3.2.5.2 Expression von ASAP1 in menschlichen Kolonkarzinomzellen

Mit den anti-ASAP1-Antikörpern wurde nun die Expression von ASAP1 in den menschlichen Kolonkarzinom-Zelllinien MTX HT29 und MDA MB231 getestet. Wiederum wurden mit den Zelllysaten Strip Blots hergestellt, die mit den anti-ASAP1-Antikörpern und als Negativkontrolle nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden. Die Antikörper 1E7 und 7B12 konnten in beiden Zelllinien das endogene ASAP1-Protein detektieren (siehe Abb. 3.12).

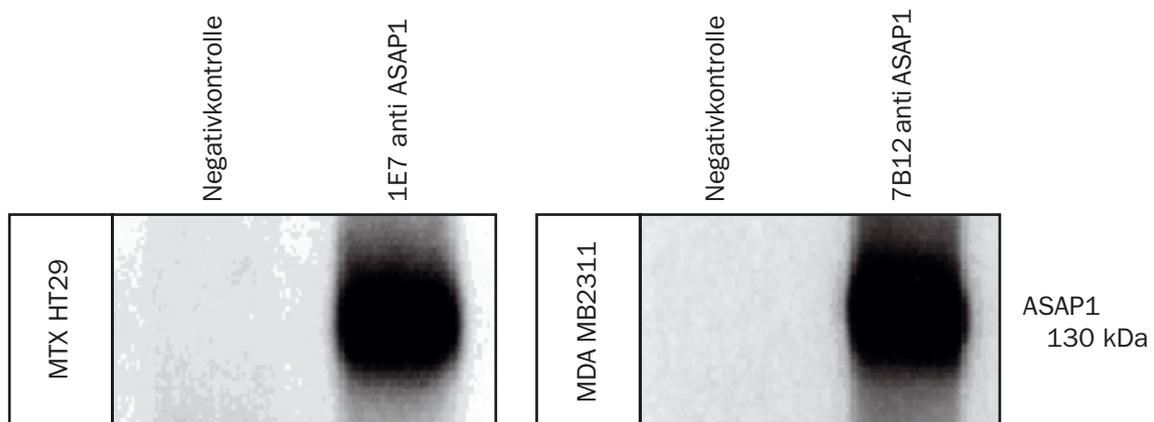


Abb. 3.12 Strip Blots mit ASAP1 Signal in menschlichen Kolonkarzinomzelllinien.

Strip Blots die mit den anti-ASAP1-Antikörpern 1E7 bzw. 7B12 inkubiert wurden. In beiden humanen Kolonkarzinomzelllinien konnte eine Expression von ASAP1 detektiert werden. Sowohl 1E7 also auch 7B12 erkennen ASAP1 in beiden Zelllinien, obwohl hier nur je eine Zelllinie mit einem Antikörper dargestellt wird. Als Negativkontrolle wurde nur der Sekundärantikörper eingesetzt.

### 3.2.5.3 Monoklonale anti-human-ASAP1-Antikörper kreuzreagieren mit Ratten-ASAP1

Da nun bestätigt war, dass die anti-ASAP1-Antikörper das humane ASAP1 auf Westernebene detektieren können, wurden Strip Blots mit Zelllysaten der hoch metastatischen Rattenzelllinie ASML hergestellt, um festzustellen, ob das endogene ASAP1-Protein durch die Antikörper erkannt wird (siehe Abb. 3.13). Die starken Signale auf den ASML-Strip Blots beweisen, dass die anti-human-ASAP1-Antikörper 7B12, 1E7 und 1B11 nicht nur das Fusionsprotein ASAP1-GST erkennen, sondern auch das endogene ASAP1-Protein. Da es sich bei den ASML-Zellen um eine Rattenzelllinie handelt, wurde mit diesem Test auch bestätigt, dass der anti-human ASAP1-Antikörper mit Ratten-ASAP1 kreuzreagiert.



Abb. 3.13 anti-ASAP1 auf ASML Strip Blot.

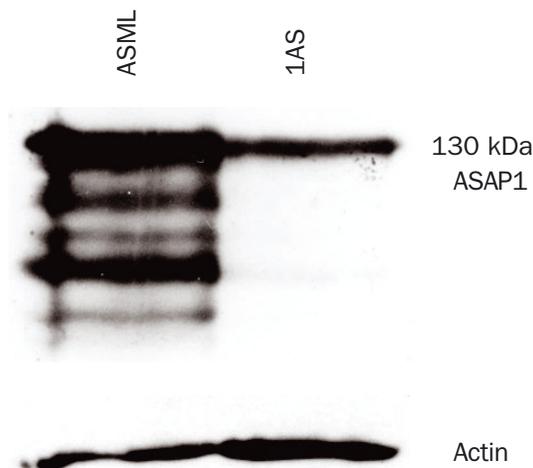
In der hochmetastatischen Rattenzelllinie ASML konnte das endogene ASAP1-Protein durch die Antikörper 7B12, 1B11 und 1E7 detektiert werden. Die Bande liegt, der Literatur entsprechend, bei 130 kDa.

#### 3.2.5.4 Differentielle Expression von ASAP1 im Bsp73 Pankreassystem der Ratte

Die optische Qualität der mit Hybridomüberständen inkubierten Strip Blots ist nur suboptimal, da es sich bei dieser Technik um ein schnelles aber zuverlässiges Testverfahren handelt, um positive Antikörperreaktionen zu ermitteln. Aus diesem Grund wurde der anti-ASAP1-Antikörper 7B12 aufgereinigt (siehe „2. Material und Methoden“) und auf einem herkömmlichen Western Blot getestet. Hierfür wurden Lysate der nicht metastatischen Zelllinie 1AS und der hochmetastatischen Zelllinie ASML auf ein SDS-PAGE aufgetragen, nach dem Lauf auf eine Membran übertragen und diese mit dem aufgereinigten Antikörper inkubiert.

Wie schon auf RNA-Ebene konnte auch auf der Protein-Ebene eine differentielle Expression von ASAP1 im Bsp73 Pankreassystem der Ratte nachgewiesen werden. Die Expression von ASAP1 wird in der hochmetastatischen Zelllinie ASML im Vergleich zur nicht metastatischen Zelllinie 1AS stark hochreguliert.

Zusätzlich zu dem einzelnen 130 kDa-Signal, welches auch schwächer in der 1AS-Zelllinie detektierbar ist, erscheinen bei der ASML Zelllinie mehrere Banden mit einem Molekulargewicht unterhalb von 130 kDa (siehe Abb. 3.14). Dieses Bandenverteilungsmuster entspricht den bereits in der Literatur veröffentlichten Western Blots, welche mit anti-ASAP1-Antikörpern behandelt wurden (Brown et al., 1998). Diese Banden könnten auf posttranslationelle Modifikationen oder alternatives Spleißen zurückzuführen sein.



**Abb. 3.14 anti-ASAP1 auf Western Blot.**

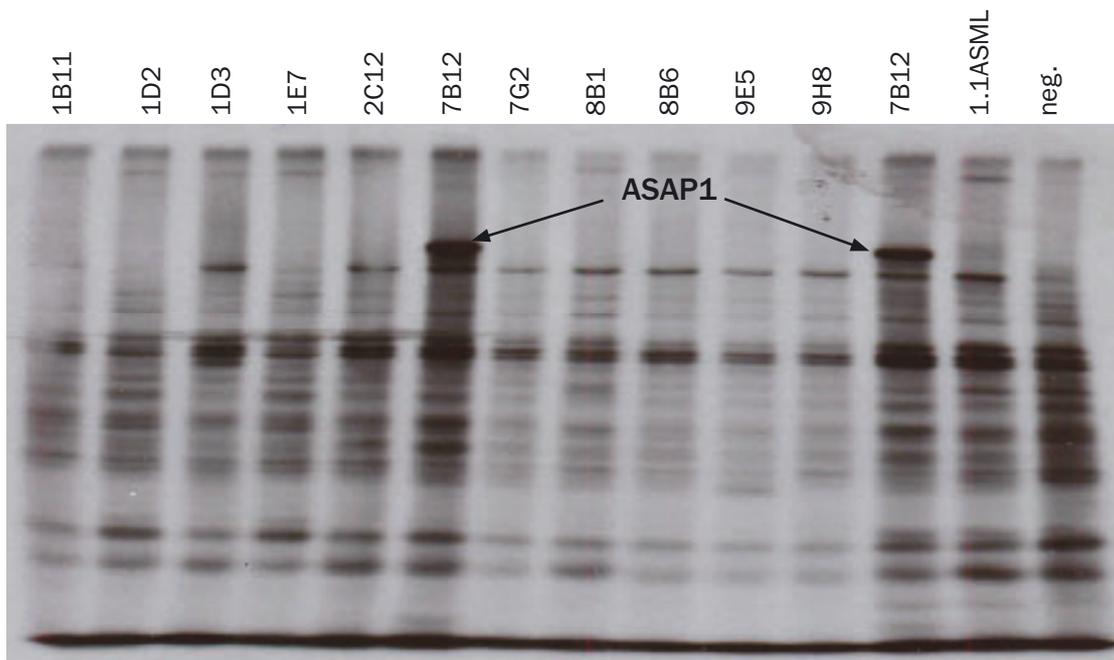
Wie auf der RNA-Ebene zeigt ASAP1 auch auf der Proteinebene eine differentielle Expression im Bsp73 Pankreas System. Die hochmetastatische Zelllinie ASML zeigt ein viel stärkeres Signal als die nicht metastatische Zelllinie 1AS. Auch werden mehrere Banden detektiert, was durch posttranslationelle Modifikationen oder alternatives Spleißen hervorgerufen werden kann. Actin wurde als Ladekontrolle herangezogen.

#### 3.2.5.5 Immunpräzipitation von ASAP1

Um zu testen, ob einer der monoklonalen anti-ASAP1-Antikörper die Fähigkeit besitzt das ASAP1-Protein zu präzipitieren, wurden die hochmetastatischen Rattenzellen ASML zwei Stunden lang mit radioaktiven <sup>35</sup>S-Methionin inkubiert. Dies führt zum Einbau der Radioaktivität und damit zur Markierung der in dieser Zeit produzierten Proteine. Nach Lyse der Zellen, Zugabe der unterschiedlichen Antikörper und dem darauf folgenden Fischen der Antikörper und den daran gebundenen Antigenen mit Protein-G- bzw. -A-Sepharose, sollte nach weiteren Schritten (siehe „2. Material und Methoden“) eine ASAP1-Proteinbande auf dem mit dem radioaktiven SDS-PAGE belichteten Röntgenfilm sichtbar sein.

Als diese ASAP1-Proteinbande weder nach 2 h, noch nach 4 h bzw. 8 h Inkubation der ASML-Zellen mit radioaktiven <sup>35</sup>S-Methionin sichtbar wurde, wurde die Inkubationszeit auf 16 h erhöht. Dies führte zum gewünschten Ergebnis. Der monoklonale Antikörper anti ASAP1 7B12 war nach 16 h Einbau von Radioaktivität in die zellulären Proteine, fähig, das zelluläre ASAP1-Protein zu präzipitieren (siehe Abb. 3.15).

Diese lange Markierungszeit lässt Rückschlüsse auf die Halbwertszeit des zellulären ASAP1-Proteins zu. Da bei Proteinen mit schneller bis mittlerer Umsatzrate 2-4 h radioaktives Labeln genügen, um durch den Einbau dieser Radioaktivität in das entsprechende Protein ein Signal zu erzielen, kann man davon ausgehen, dass ASAP1 eine sehr hohe Halbwertszeit hat bzw. eine sehr geringe Umsatzrate.



**Abb. 3.15 Immunpräzipitation von ASAP1-Protein aus ASML-Zellen mit den anti-ASAP1-Antikörper 7B12.** Die hochmetastatischen Rattenzellen wurden für 16 h mit radioaktiven <sup>35</sup>S-Methionin inkubiert. Der monoklonale Antikörper anti ASAP1 7B12 war nach 16 h Einbau von Radioaktivität in die zellulären Proteine fähig das zelluläre ASAP1-Protein zu präzipitieren. Da bei Proteinen mit schneller bis mittlerer Umsatzrate 2-4 h radioaktives Labeln genügen, um durch den Einbau dieser Radioaktivität in das entsprechende Protein ein Signal zu erzielen, kann man davon ausgehen, dass ASAP1 eine sehr hohe Halbwertszeit hat bzw. eine sehr geringe Umsatzrate. Positivkontrolle: 1.1 ASML, Negativkontrolle: kein Antikörper.

### 3.2.5.6 Bestimmung der Lokalisation von ASAP1-Protein in der Zelle über Immunfluoreszenz

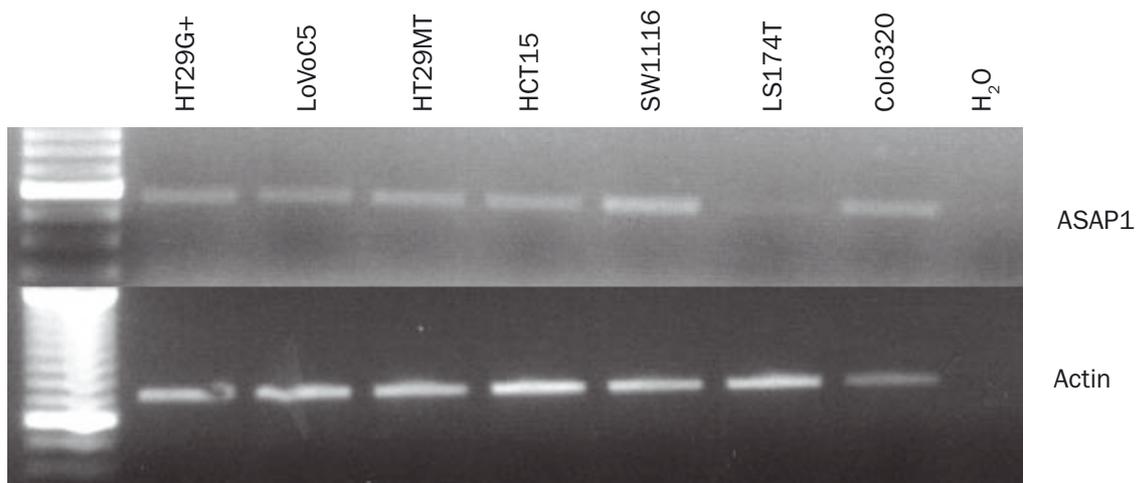
Da ASAP1 mit FA-Proteinen (FA = focal adhesions = Fokalkontakte) wie Vinculin und Paxillin assoziiert und auch mit FAK (FAK = focal adhesion kinase) und c-Src kolokalisiert ist (Randazzo, 2000), sollte es anhand der Immunfluoreszenz cytoplasmatisch in der Zelle zu finden sein.

Um die subzelluläre Lokalisation von ASAP1 zu analysieren, sollten adhärenente Zellen zum Einsatz kommen, da diese eine Analyse mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes erleichtern. Aus diesem Grund schied die Suspensionszelllinie ASML, die sich durch eine sehr hohe ASAP1-Expression auszeichnet, aus. Um nun adhärenente Zellen mit

einer relativ hohen ASAP1-Expression zu identifizieren, wurde eine Reihe adhärenter humaner Kolonkarzinomzellen mit Hilfe der semiquantitativen PCR-Amplifikation analysiert (siehe Abb. 3.16).

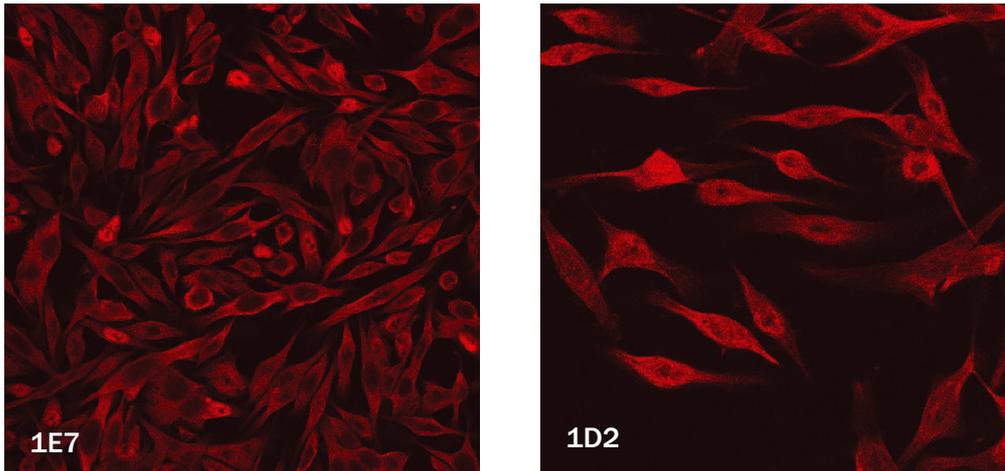
Hierfür wurde die RNA aus den humanen Tumorzellen isoliert, über eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und dann wurde mit den Oligonukleotiden, welche für die Isolation des humanen ASAP1-Fragmentes eingesetzt wurden, die semiquantitative PCR-Reaktion durchgeführt.

Für die Immunfluoreszenzen wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie SW1116 ausgewählt, da sie in dieser Reihe von Tumorzellen die höchste ASAP1-Expression zeigt. Da das ASAP1-Protein eine zytoplasmatische Lokalisation zeigen sollte, wurden die Zellen vor dem Einsatz der anti-ASAP1-Antikörper permeabilisiert. Die Immunfärbung der Zelle mit den anti-ASAP1-Antikörpern erfolgte genau wie in „2. Material und Methoden“ beschrieben. Die subzelluläre Lokalisation des ASAP1-Proteins wurde unter Verwendung Fluoreszenz-markierter sekundärer anti-Maus-Ig-Antikörper visualisiert und mit einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert (siehe Abb 3.17).



**Abb. 3.16 Semiquantitative PCR-Amplifikation von ASAP1 in humanen Kolonkarzinomzellen.**

Um adhärenente Zellen mit einer relativ hohen ASAP1-Expression zu identifizieren, wurde eine Reihe adhärenter humaner Kolonkarzinomzellen mit Hilfe der semiquantitativen PCR-Amplifikation analysiert . Hierfür wurde die RNA aus den humanen Tumorzellen isoliert, über eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und dann wurde mit den Oligonukleotiden, welche für die Isolation des humanen ASAP1-Fragmentes eingesetzt wurden, die semiquantitative PCR-Reaktion durchgeführt. Für die Immunfluoreszenzen wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie SW1116 ausgewählt, da sie in dieser Reihe von Tumorzellen die höchste ASAP1-Expression zeigt. Actin wurde als Ladekontrolle eingesetzt und als Negativkontrolle wurde Wasser statt cDNA benutzt.



**Abb. 3.17 Cytoplasmatische Lokalisation von ASAP1-Protein in humanen Kolonkarzinomzellen.**

Die adhärennten Zellen SW1116 wurden permeabilisiert und mit den anti-ASAP1-Antikörpern inkubiert. Die subzelluläre Lokalisation des ASAP1-Proteins wurde unter Verwendung Fluoreszenz-markierter sekundärer anti-Maus-Ig-Antikörper visualisiert und mit einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Für die Immunfärbung im linken Bild wurde der anti-ASAP1-Antikörper 1E7 eingesetzt und für die Färbung im rechten Bild der anti-ASAP1-Antikörper 1D2.

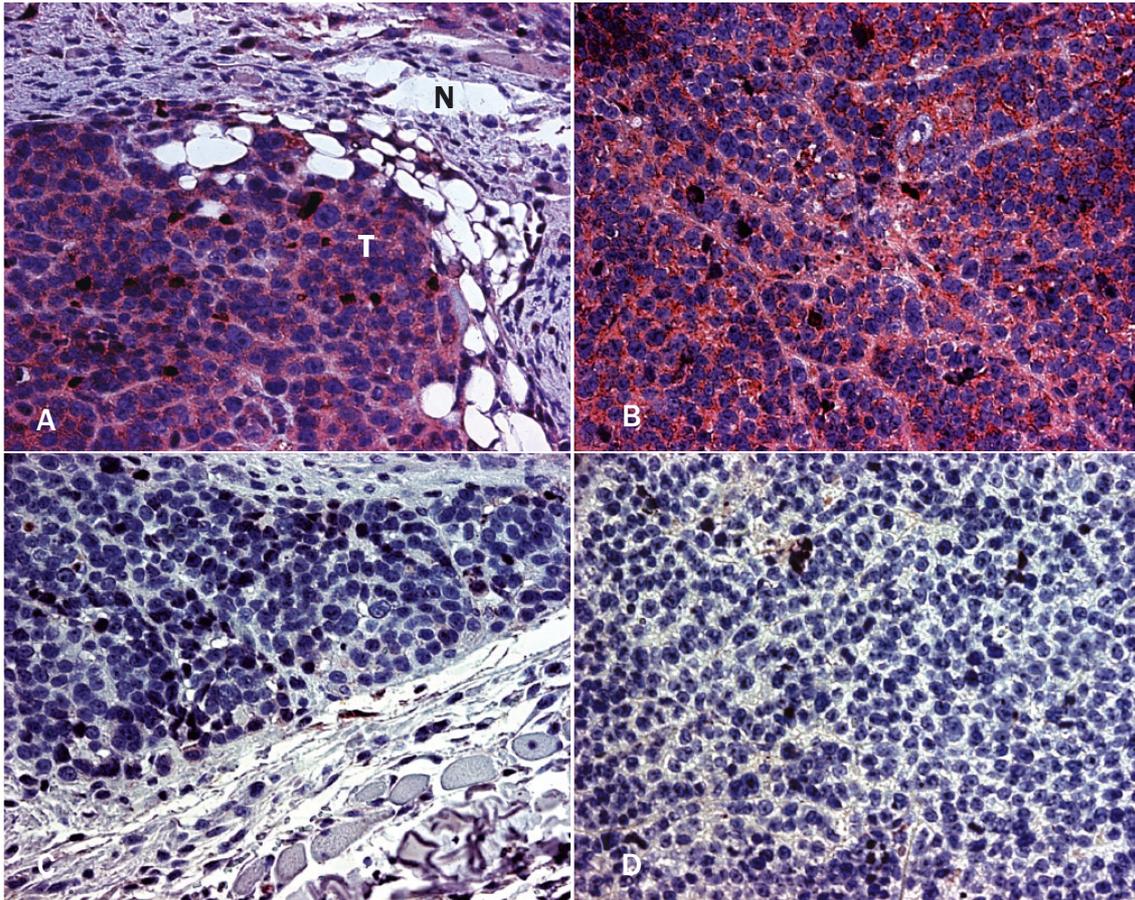
### **3.2.5.7 Immunohistochemie (IHC) mit monoklonalen anti-ASAP1-Antikörpern auf humanen SW1116-Kolonkarzinom-Tumorschnitten**

Da ein wichtiges Ziel bei der Charakterisierung von ASAP1-Expressionsstudien in menschlichen Tumorschnitten sind, war es wichtig unter den generierten monoklonalen Antikörpern gegen ASAP1 mindestens einen zu finden, der das ASAP1-Protein in IHC-Studien von Tumorschnitten detektiert.

Um die Bedingungen zu bestimmen, unter welchen die anti-ASAP1-Antikörper in den immunhistologischen Analysen von Tumorgewebe eingesetzt werden können, bedarf es zuerst eines Tumortyps, bei dem die Expression von ASAP1 hochreguliert ist. Für meine Experimente wurde dafür ein Humantumor gewählt, der durch subkutane Injektion von SW1116-Zellen in Ratten entstand. Da die SW1116-Zellen sowohl auf der RNA-Ebene (siehe Abb. 3.16), als auch auf Proteinebene (siehe Abb. 3.17) einen hohen Level von ASAP1 zeigen, war es naheliegend, die Bedingungen für eine erfolgreiche immunhistologische Färbung an diesem Tumortyp zu etablieren.

Schnitte von Formaldehyd-fixierten und Paraffin-eingebetteten SW1116-Tumoren wurden mit den monoklonalen anti-ASAP1-Antikörpern 7B12 gefärbt (siehe Abb. 3.18). Positive Färbungen wurden nur in Tumorzellen festgestellt, aber nicht in den Tumor-umgebenden nicht-neoplastischen Zellen (Abb. 3.18 A). Wie man gut an den Bildern A und B erkennen kann, wurde nur das Zytoplasma der Zellen gefärbt, was wiederum die subzelluläre Lokalisation von ASAP1 bestätigt. Zur genauen histologischen Beurteilung wurden die Zellkerne mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Die Validation dieses Versuches zeigt deutlich, dass ASAP1 in SW1116-Tumorgewebe hochreguliert ist und in nicht-neoplastischen Geweben eine sehr geringe Expression aufweist.



**Abb. 3.18** Monoklonale anti-ASAP1-Antikörper zeigen immunhistologisch eine hohe Expression von ASAP1 in humanen SW1116-Tumorzellen an.

Schnitte von Formaldehyd-fixierten und Paraffin-eingebetteten SW1116-Tumoren wurden mit dem monoklonalen anti-ASAP1-Antikörper 7B12 gefärbt. **A:** Positive rote Färbungen wurden nur in Tumorzellen (T) festgestellt (**B:** nur Tumorzellen) aber nicht in den Tumor-umgebenden nicht-neoplastischen Zellen (N). Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt (blau) und als Negativkontrolle wurden SW111-Tumorschnitte nur mit dem Sekundärantikörper behandelt (**C, D**). Alle Bilder sind 400-fach vergrößert dargestellt.

### 3.2.5.8 Immunohistochemie (IHC) mit monoklonalen anti-ASAP1-Antikörpern auf ASML-Rattentumorschnitten

Nach der erfolgreichen Detektion von ASAP1-Protein auf menschlichen Tumorschnitten wurden Schnitte von Formaldehyd-fixierten und Paraffin-eingebetteten ASML-Tumoren der Ratte mit demselben Antikörper behandelt, um zu testen ob die Kreuzreaktivität, die sich auf der Westernebene zeigte, sich auch in der Immunohistochemie bestätigen lässt. Diese Kreuzreaktivität wäre für spätere in vivo Experimente, welche mit Rattentumorzellen durchgeführt werden sollen, wichtig, um rASAP1-Expressionen in diesem System detektieren zu können.

Da die ASML-Zellen sowohl auf der RNA-Ebene (siehe Abb. 3.5), als auch auf Proteinebene (siehe Abb. 3.14) einen hohen Level von ASAP1 zeigen, wurde dieser Rattentumor für die IHC-Färbungen gewählt. Die durch subkutane Injektion von ASML-Zellen in Ratten entstandenen ASML-Tumore wurden isoliert, fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach der Herstellung von Paraffinschnitten dieser ASML-Tumore wurden diese mit den monoklonalen anti-ASAP1-Antikörpern 7B12 gefärbt (siehe Abb. 3.19).

Mit diesem Versuch konnte die Kreuzreaktivität der anti-human-ASAP1-Antikörper mit dem ASAP1 aus der Ratte, immunohistochemisch nachgewiesen werden. Die ASAP1-Expression in diesen ASML-Tumorschnitten zeigt die gleiche Verteilung wie

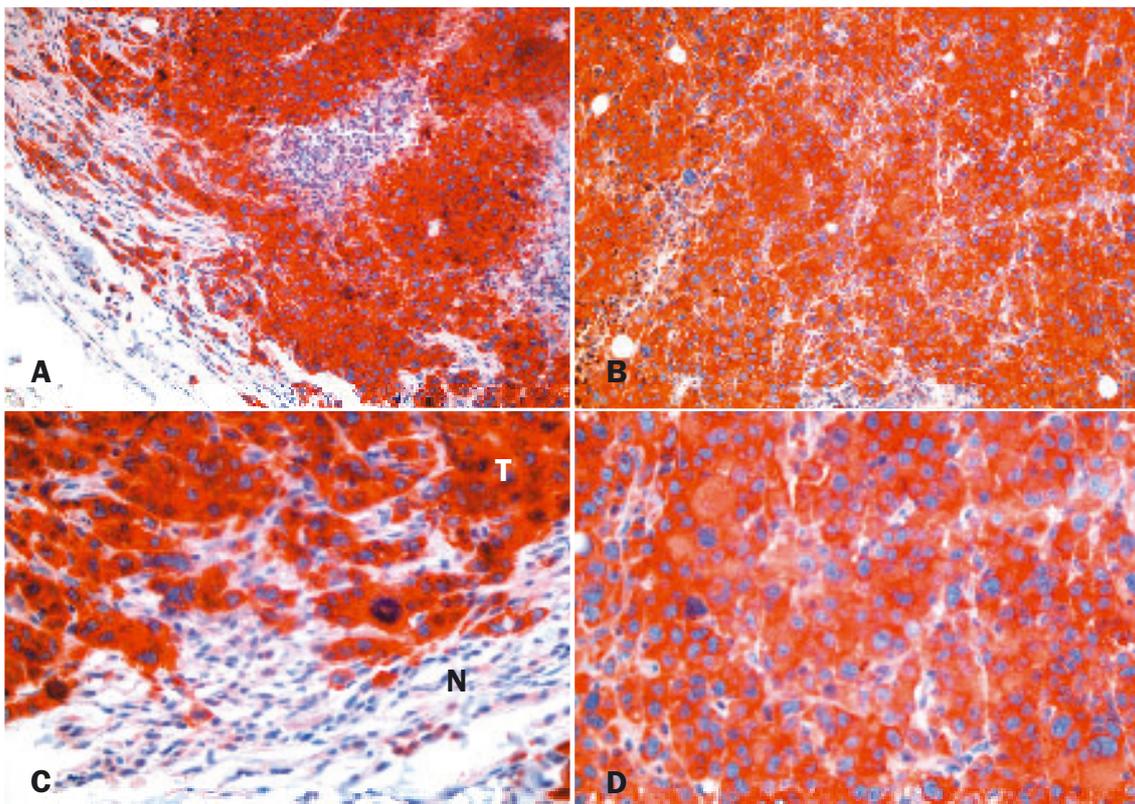


Abb. 3.19 Monoklonale anti-ASAP1-Antikörper färben immunhistologisch ASML-Tumorzellen an.

Schnitte von Formaldehyd-fixierten und Paraffin-eingebetteten ASML-Tumoren wurden mit dem monoklonalen anti-ASAP1-Antikörper 7B12 gefärbt. **A, C:** Positive orange-rote Färbungen wurden nur in Tumorzellen (**T**) festgestellt, aber nicht in den Tumor-umgebenden nicht-neoplastischen Zellen (**N**). **B, D:** Die cytoplasmatische Färbung spiegelt die subzelluläre Lokalisation von ASAP1 wider. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt (blau) und als Negativkontrolle wurden ASML-Tumorschnitte nur mit den Sekundärantikörper behandelt. Bei den Negativkontrollen war keine Färbung zu detektieren (Daten nicht gezeigt). **A, B:** 200x, **C, D:** 400-fach vergrößert.

in den zuvor getesteten SW1116-Tumorschnitten. Positive Färbungen wurden nur in Tumorzellen festgestellt, aber nicht in den Tumor-umgebenden nicht-neoplastischen Zellen (Abb. 3.19 A, C). Zur genauen histologischen Beurteilung wurden die Zellkerne mit Hämatoxylin gegengefärbt.

### 3.2.5.9 Zusammenfassung der anti-ASAP1-Antikörper-Charakterisierung

Die in meiner Arbeit generierten monoklonalen anti-ASAP1-Antikörper, die durch Immunisierung von Mäusen mit einem humanen ASAP1-Fragment entstanden und nach Hybridomformation, Selektion und ELISA-Tests durch 11 identifizierte Hybridomklone in der Zellkultur exprimiert und sezerniert werden können, durchliefen zahlreiche Tests, um sie genau zu charakterisieren. Die Ergebnisse dieser Charakterisierung sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

#	Klon	Isotyp	ELISA		Western blot				IF		IHC			IP	
			GST-Protein	ASAP1-GST-Protein	GST-Protein	ASAP1-GST-Protein	MTX HT29	MDA MB231	ASML	SW1116	Colo320DM	ASML	LS174T		SW1116
1.	1B11	IgG2a		+		+			+						
2.	1D2	IgM		+		+			+	+	+	+	+		
3.	1D3	IgG2a		+		+			+	+					
4.	1E7	IgM		+		+	+	+	+	+					
5.	2C12	IgG3		+		+									
6.	7B12	IgG2b		+		+	+	+	+		+	+	+	+	+
7.	7G2	IgG2a		+											
8.	8B1	IgG2a		+		+									
9.	8B6	IgG1		+		+									
10.	9E5	IgG2a		+		+			+	+	+	+	+		
11.	9H8	IgG2a		+											

Tab. 3.4 Zusammenfassung der Charakterisierung der monoklonalen anti-ASAP1-Antikörper.

Insgesamt wurden 11 Antikörperklone in zahlreichen Tests charakterisiert, hier zusammengefasst sind die Ergebnisse folgender Analysen: ELISA, Western Blot, Immunfluoreszenz (IF), Immunohistochemie (IHC) und Immunpräzipitation (IP). Rattenzelllinie: ASML. Humane Tumorzelllinien: MTX HT29, MDA MB231, SW1116, Colo320DM, LS174T. Die Ergebnisse zu IF (Colo320DM), IHC (LS174T) sind nicht bildlich dargestellt.

### 3.2.6 Immunohistochemische Analysen menschlicher Tumor-/Normalgewebe zeigen, dass ASAP1 in Tumoren hochreguliert ist.

Um einen Überblick über die ASAP1-Expression in unterschiedlichen menschlichen Tumoren im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe zu erlangen, wurden Gewebe-Microarrays der Firma Biocat analysiert. Die Gewebe-Microarrays enthalten 59 Tumorgewebe bzw. die entsprechenden Normalgewebe aus dem gleichen Patienten, welche als runde Paraffinschnitte auf Objektträgern angeordnet sind.

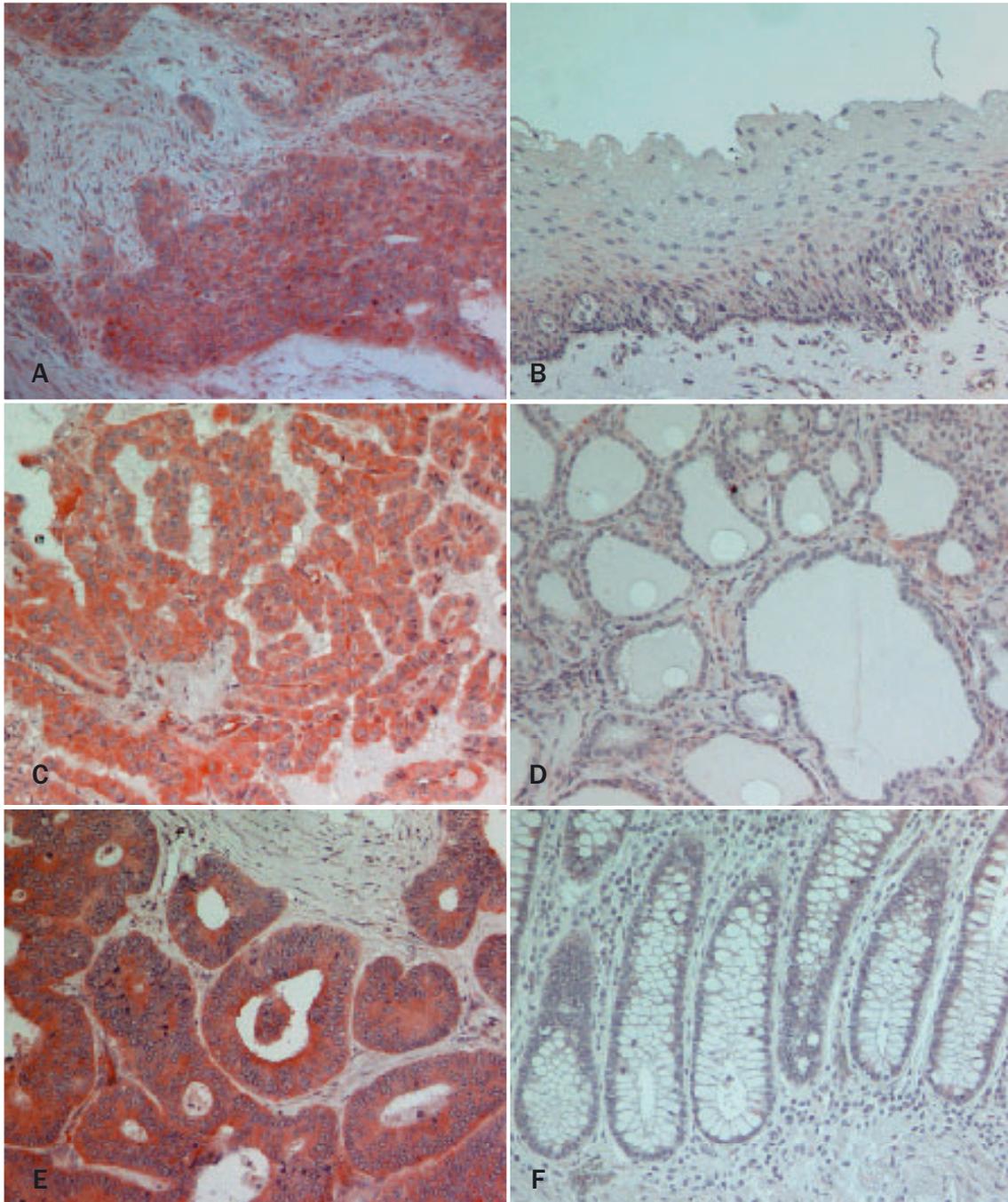
Diese Tumor-/Normalgewebe wurden mit dem monoklonalen anti-ASAP1-Antikörper 7B12 analysiert. Wie die Tabelle 3.5 und Abb. 3.20 zeigen, ist ASAP1 in zahlreichen Tumoren hochreguliert im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe. Das ASAP1-Signal ist in den Normalgeweben sehr schwach bis nicht vorhanden, nur in Epithelzellen unterschiedlicher Organe sind ASAP1-Expressionen detektierbar. Stärkere Färbungen in Normalgeweben wurden in der Epidermis der Haut und in den Parietalzellen des Magens festgestellt.

Drei Beispiele signifikant erhöhter ASAP1-Expression in Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe sind in Abb. 3.20 dargestellt. Sowohl im Esophagustumor, im Thyroidkarzinom und im Kolorektalkarzinom sind sehr starke zytoplasmatische ASAP1-Färbungen in den Tumorzellen sichtbar, die in den entsprechenden Normalgeweben abwesend sind.

Organ	Normalgewebe	Krebsgewebe	positiv
Magen	Starke Färbung in Parietalzellen	schwach diff. ad-ca. +	2/9
Esophagus	Schwach +/-	SCC +++	6/9
Lunge	Alveolen -, Bronchien schwach +/-	SCC +/-	2/7
Colon	Einige Luminalepitheleien ++, -	Ad-ca. +++	7/10
Schilddrüse	Negativ	Papillen ca. +++	9/10
Niere	Proximal konvolvierte Röhren +	RCC ++	3/8
Endometrium	Epithelium stark +	Ad-ca. +++	9/10
Gallenblase	Epithelium +	Ad-ca. gut diff. ++	5/10
Larynx	Negativ	SCC ++	8/10
Cervix	Epithelium stark + speziell basal	SCC + (hoher Hintergrund)	6/10
Lymphknoten	Heterogen +	Malignes Lymphom ++	8/10
Haut	Starke Färbung in Epidermis	Malignes Melanom ++	7/10
Brust	Epithelium + oder +/-	Infiltrierendes Gefäß ca. ++	10/10
Leber	(+)+	Hepatozell. ca. (+)+	6/10
Blase	Epithelium +	Pap. Trans. Zell ca. +/-	3/8
Ovarien	keine normalen Zysten	Serosa Zystadeno ca. +	8/10
Pankreas	(+)/-	Ductales ad-ca. (+)	2/10
Prostata	Epithelium von - bis ++	Ad-ca. -/+	6/9

**Tab. 3.5 IHC-Analyse der ASAP1-Expression in Tumor-/Normalgeweben.**

Für jedes Organ ist im Normalgewebe die Färbung und deren Lokalisation angegeben. Für die Krebsgewebe sind die Stärke der Färbung und die Diagnose angegeben. Unter „positiv“ sind die Anzahl der Tumorschnitte mit ASAP1-Signal im Vergleich mit der Gesamtzahl von Tumorschnitten dieser Krebsart dargestellt. +/- = schwache bis keine Färbung, + = mittlere Färbung, ++ = starke Färbung, +++ = sehr starke Färbung. Ad-ca.: Adenokarzinom, Ca.: Karzinom, diff.: differenziert, SCC: schuppiges Zellkarzinom [squamous cell carcinoma].



**Abb. 3.20 Immunohistochemische Färbung von menschlichen Tumor-/Normalgewebeparaffinschnitten mit monoklonalen anti-ASAP1-Antikörpern.**

Alle Tumorgewebe (A, C, E) zeigen eine starke ASAP1-Expression (rote Färbung) im Vergleich mit den negativen Normalgeweben (B, D, F). Die rote Farbe entspricht der Expression von ASAP1. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin (blau) gegengefärbt. A: Esophagus SSC, B: Esophagus normal, C: Thyroid Papillarkarzinom, D: Thyroid, normal, E: Kolorektalkarzinom, F: Kolorektum, normal. SCC: schuppiges Zellkarzinom [squamous cell carcinoma].

### **3.2.7. Isolation der kompletten Länge der Ratten-ASAP1-cDNA**

Damit dieser Arbeit geklärt werden soll, ob ASAP1 funktionell bei der Tumorprogression und Metastasierung beteiligt ist, ist es notwendig adäquate *in vitro* und *in vivo* Modelle auszusuchen, um funktionelle Studien durchführen zu können.

Alle bisher in der Literatur veröffentlichten Arbeiten bezüglich ASAP1 wurden mit Mauskonstrukten durchgeführt, welche im Falle von Funktionsanalysen in Fibroblasten transfiziert wurden. Ziel dieser Arbeit ist aber, den Einfluss von ASAP1 bei der Tumorprogression und der Metastasierung festzustellen. Aus diesem Grund war es naheliegend, auf die bereits etablierten Rattentumorprogressionsmodelle zurückzugreifen (siehe „1. Einleitung“) und deren Zelllinien durch Transfektionen von ASAP1-Konstrukten zu manipulieren, um z.B. eine Änderung im metastatischen Potential festzustellen.

Da es sich bei den drei Tumorprogressionsmodellen (Dunning R3327 Prostata, Bsp73 Pankreas und 13672 NF Brust) um Rattenzelllinien handelt, war es von Vorteil mit ASAP1-Konstrukten aus der Ratte zu arbeiten.

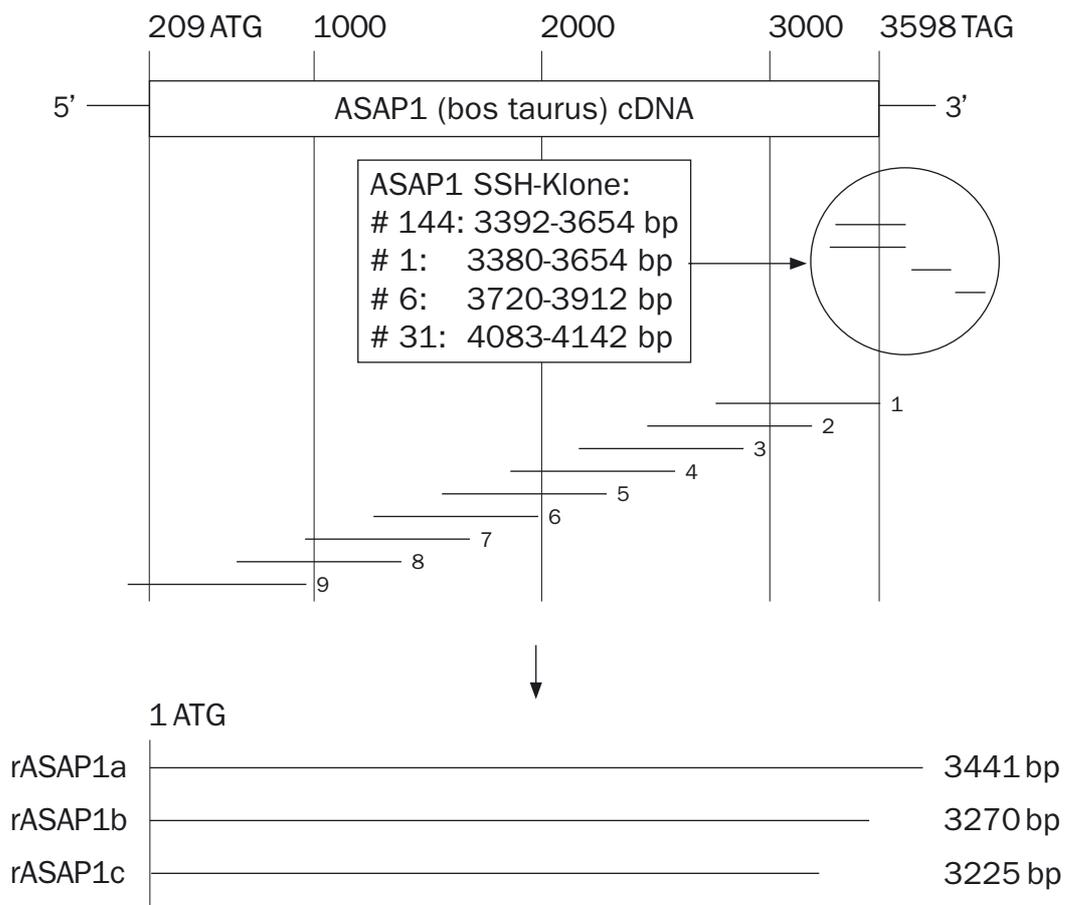
Da komplette ASAP1-cDNAs der Ratte weder erhältlich noch die Sequenzen in Datenbanken oder der Literatur veröffentlicht waren, bestand der erste Schritt in der Isolation kompletter cDNA-Längen von Ratten-ASAP1.

#### **3.2.7.1. 5` - RACE**

Da es keine Sequenzinformationen von rASAP1 (Ratten-ASAP1) gab, wurden die rASAP1-Klone der PLSSH-Bibliothek (subtraktive Pankreas-Adenokarzinom-spezifische Bibliothek, von Stein et al., 1997) sequenziert. Mit dieser Sequenzinformation wurden Oligonukleotide entworfen, um damit die Sequenzierung der kompletten cDNA-Länge von rASAP1 zu beginnen.

Unter Verwendung der 5`-RACE-PCR-Technik (5`-RACE: Rapid Amplification of 5` cDNA Ends), bei welcher modifizierte Ratten Marathon Milz cDNA (Clontech) als Matritze diente, konnte Schritt für Schritt die komplette Sequenz von rASAP1 identifiziert werden. Als Sequenzvorgabe zur Orientierung diente hierbei die *bos taurus* ASAP1 Sequenz (siehe Abb.3.21)

Nach mehreren Runden 5`-RACE-PCR, Klonierung der PCR-Produkte, Sequenzierung der klonierten Produkte, konnten schließlich drei unterschiedlich lange Varianten rASAP1-cDNAs kloniert und sequenziert werden (Abb.3.22).



**Abb. 3.21 Schematische Darstellung der 5' RACE Technik.**

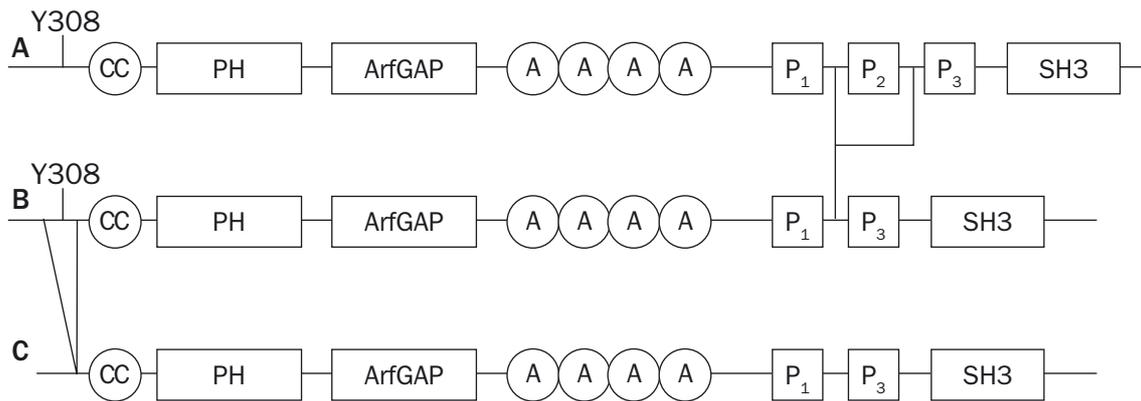
Dargestellt ist die ASAP1-cDNA von *bos taurus*, an welcher sich bei der Sequenzanalyse orientiert wurde. Die Zahlenangaben über der ASAP1-cDNA entsprechen den Basenpaaren dieses Konstruktes. Anhand der Sequenzen der ASAP1-SSH-Klone konnten primer für den 3' Bereich von ASAP1 generiert werden, mit deren Hilfe das 5' RACE-PCR-Verfahren begonnen werden konnte (eingekreiste Fragmente). Die amplifizierten ASAP1-Fragmente wurden anschließend sequenziert und mit der ASAP1-Sequenz von *bos taurus* verglichen, um sich im kompletten Konstrukt zu orientieren. Mit Hilfe der neu sequenzierten Fragmente wurden wiederum neue Oligonukleotide für weitere PCR-Reaktionen bestimmt. Auf diese Weise konnte sich Schritt für Schritt dem 5' Ende der Rattensequenz von ASAP1 genähert werden (siehe sequenzierte Fragmente 1-9). Abschließend konnten Oligonukleotide entworfen werden, welche die Start- bzw. Stopsequenz (ATG bzw. TAG) von rASAP1 definierten. Mit diesen Konstrukten konnten schließlich alle drei Spleißvarianten von rASAP1(a, b, c) amplifiziert werden.

### 3.2.7.2. Identifikation dreier Spleißvarianten von rASAP1

Es wurden folgende drei Ratten-ASAP1-Varianten identifiziert:

1. Die komplette cDNA-Sequenz von rASAP1, welche ca. 94% Homologie zu der bereits veröffentlichten Maus ASAP1-cDNA besitzt. Diese lange Form von rASAP1 (rASAP1a) besteht aus 3441 bp, was auf der Protein-Ebene 1147 Aminosäuren entspricht.
2. Das zweitgrößte rASAP1-Produkt (rASAP1b) bei dem es sich um die bereits veröffentlichte Spleißvariante von ASAP1 handelt. Diesem Konstrukt fehlt wie in der Mausequenz das P2-Modul aus der prolinreichen Region. Es besteht aus 3270 bp, was in der Protein-Sequenz 1090 Aminosäuren entspricht.
3. Die kleinste Variante von rASAP1 (rASAP1c), die noch kein veröffentlichtes ASAP1-Homolog in anderen Spezies besitzt. Ihm fehlt ebenfalls das P2-Modul und zusätzlich fehlt noch eine Spleißregion im 5'-Bereich, wodurch eine Phosphorylierungsstelle von rASAP1 herausgespleißt wurde, nämlich das Tyrosin 308 (Y308, siehe Abb 3.22 und Einleitung). Da die Funktion von ASAP1 durch die Phosphorylierung an dieser Stelle (Y308) unterdrückt wird, ist dieses Konstrukt konstitutiv aktiv. Die kleinste Spleißvariante von ASAP1 wurde bis jetzt weder isoliert oder sequenziert, noch wurden funktionelle Studien mit ihr durchgeführt. Sie findet nur in einer Veröffentlichung Erwähnung, wo ihre mRNA als dritte und kleinste Bande auf einen, mit einer radioaktiv markierten ASAP1-cDNA-Sonde inkubierten Northern Blot, erscheint (Brown et al., 1998). Die kleinste Form von rASAP1 besteht aus 3225 bp oder 1075 Aminosäuren auf der Protein-Ebene.

Bezüglich des Einflusses von ASAP1 auf die Metastasierung erschien mir dieses konstitutiv aktive rASAP1c-Konstrukt als sehr interessant, weshalb es für in vitro und in vivo Experimente herangezogen wurde.



**Abb. 3.22 Graphische Darstellung der drei isolierten rASAP1-Spleißvarianten.**

Dargestellt sind die rASAP1-Proteine in den drei isolierten Spleißvarianten. **A:** rASAP1a, lange Form von ASAP1 mit 1147 Aminosäuren (cDNA: 3441bp). **B:** rASAP1b mit 1090 Aminosäuren (cDNA: 3270bp), mittlere Form von ASAP1, bei welcher im Vergleich zu rASAP1a die prolinreiche Region (P2) rausgespleißt ist. **C:** ASAP1c: 1075 Aminosäuren (cDNA: 3225bp), kurze Form von ASAP1, bei welcher im Vergleich zu rASAP1a die Prolin-reiche Region (P2) und die Region um das funktionelle Tyrosin 308 (Y308) rausgespleißt sind.

Die Proteindomänen im Einzelnen sind: CC: coiled-coil, PH: PIP<sub>2</sub> bindende Pleckstrin Homologie, ArfGAP: ArfGAP Homologie, A: Ankyrin Wiederholungen, P: Prolinreiche Regionen, SH3: Src Homologie 3.

Die Abkürzungen im Einzelnen: PIP2: Phosphatidyl-Inositol-Diphosphat, Arf: ADP ribosylation factor, GAP: GTPase activating factor.

#### Proteinsequenzen der ASAP1-Spleißstellen:

Alternatives Exon I (57 Aminosäuren), fehlt in rASAP1b und rASAP1c:

P2  
 ..PTGPPSTLPLGTQTSSGSSTLSKKRPPPPPPGHKRTLLSDPPSPLPHGPPNKGAIPWG..

Alternatives Exon II (15 Aminosäuren), fehlt in rASAP1c:

Y308  
 ..VGGLYVASRANSSRR..

**Abb. 3.23 Proteinsequenzen der Spleißregionen (alternative Exons).**

Aufgelistet ist das alternative Exon I, das bei den beiden rASAP1-Varianten ASAP1b und ASAP1c fehlt. Die unterstrichenen Aminosäuren kennzeichnen das P2-Modul der prolinreichen Region von ASAP1a, was bei der Interaktion mit SH3-Regionen anderer Proteine zusammen mit P1 und P3 beteiligt ist. Der Verlust der P2-Domäne ändert aber nicht die Bindungseigenschaften der prolinreichen Region an SH3-Proteine, P2 ist also nicht essentiell für die Bindung an SH3-Domänen. Die zweite aufgelistete Spleißregion fehlt zusätzlich in der ASAP1c-Spleißvariante. Mit dem Verlust dieses alternativen Exons verliert ASAP1c auch eine Phosphorylierungsstelle, nämlich das Tyrosin 308 (Y308), welches im phosphorylierten Zustand die ASAP1 Funktion blockiert.

### 3.2.8 Funktionelle Analysen von ASAP1

Für die funktionellen Analysen *in vitro* wurden ASAP1-Konstrukte zuerst transient in Tumorzellen transfiziert. Durch zahlreiche Versuche wurde ein möglicher Einfluss der ASAP1-Überexpression auf die Proliferation, Adhäsion, Motilität und weitere, für den Prozess der Metastasierung wichtige Eigenschaften getestet.

Damit der Einfluss von ASAP1 auch *in vivo* getestet werden konnte, wurden Tumorzellen stabil mit ASAP1-Konstrukten transfiziert, selektioniert und anschließend Ratten subkutan injiziert, um Tumorzellwachstum und Metastasierung unter dem Einfluss der stabilen Überexpression von ASAP1 zu validieren.

#### 3.2.8.1 Hintergrund zu den ASAP1-Konstrukten

Um den Einfluss von ASAP1 in einem möglichst breiten Spektrum zu ermitteln, wurde sowohl die Überexpression von wildtyp ASAP1 als auch die Überexpression von dominant negativen ASAP1-Konstrukten überprüft.

Als erster Schritt wurde zur eindeutigen Unterscheidung von endogenen und exogenen ASAP1 an den N-terminalen Bereich des bis jetzt noch nicht untersuchten konstitutiv aktiven rASAP1c (kleinste ASAP1-Form) ein FLAG-Tag kloniert.

Dieses kleine Proteinanhängsel beeinflusst nicht die Funktion von ASAP1 in der Zelle, lässt sich aber anhand kommerziell erhältlicher anti-FLAG Antikörper sehr gut detektieren.

Das mittelgroße wildtyp (w.t.) ASAP1b-Konstrukt (S45), welches ebenfalls ein FLAG-Tag besitzt, war ein Geschenk von Paul Randazzo (Bethesda, Maryland, USA). Mit diesen beiden Konstrukten wurden die Einflüsse der Überexpression von w.t. ASAP1 in Tumorzellen analysiert.

Um festzustellen, ob die Unterdrückung der ASAP1-Proteinfunktion einen Phänotyp in Tumorzellen hat, wurden ebenfalls dominant negative ASAP1-Konstrukte transfiziert und deren Auswirkungen auf die Zellen analysiert. Diese dominant negativen ASAP1-Konstrukte waren Gaben von Margaret C. Frame (University of Glasgow). Es handelt sich dabei um zwei Konstrukte, welche jeweils manipulierte essentielle Proteindomänen besitzen. Bei dem dominant negativen ASAP1 (S46) fehlt die c-terminale SH3-Domäne, dadurch kann es weder mit FAK noch mit Pyk interagieren. Bei dem dominant negativen ASAP1 (R14) wurde eine Punktmutation (R811A) in die P1-Proteindomäne der prolinreichen Region von ASAP1 eingeführt, was die Bindung von ASAP1 an Src bzw. Crk unterdrückt (siehe „1. Einleitung“).

Es wurden mit den folgenden Konstrukten transiente und stabile Transfektionen für funktionelle Analysen durchgeführt:

- ASAP1 (w. t. Ratte rASAP1c, konstitutiv aktiv)
- R14 (dominant negatives Mauskonstrukt, R811A Punktmutation in P1)
- pcDNA3.1 (Leervektor von ASAP1 und R14, Negativkontrolle)
- S45 (w. t. Maus ASAP1b)
- S46 (dominant negatives Mauskonstrukt, ohne SH3-Domäne)
- pCI (Leervektor von S45 und S46, Negativkontrolle)

### 3.2.8.2. Adhäsion

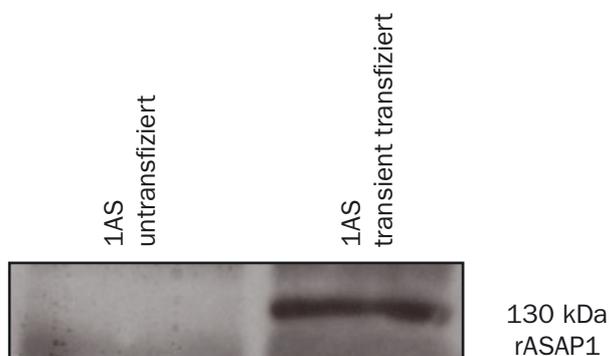
Um einen Einblick in die Funktion von ASAP1 im Kontext der Zelladhäsion zu bekommen, wurden 1AS-Ratten-Tumorzellen aus dem Pankreassystem transient mit den unterschiedlichen ASAP1-Konstrukten transfiziert. Ob die Überexpression des jeweiligen ASAP1-Konstruktes zu einer Änderung der Zelladhäsion führt, wurde an einem Substrat der extrazellulären Matrix getestet, mit welchem 96-well-Platten beschichtet wurden. Auf die so behandelten Platten wurden die transient transfizierten Tumorzellen in gleicher Anzahl ausgesät und nach dem gleichen Zeitraum wurde die Zellanheftung an das Substrat ermittelt (siehe „2. Material und Methoden“).

Um ein geeignetes Substrat für die Zelladhäsion zu ermitteln, wurde zuerst an unterschiedlichen Komponenten der extrazellulären Matrix getestet, ob sich transfizierte 1AS-Tumorzellen an diese binden können.

Eine 10 cm-Kulturschale mit 70-80% konfluenten Zellen wurden mit 10 µg rASAP1 transfiziert und nach 24 h wurde die Adhäsion dieser Zellen auf den extrazellulären Matrixkomponenten getestet. Hierfür wurden je 4 x 10<sup>5</sup> Zellen für eine Stunde auf den folgenden Matrixkomponenten inkubiert: Rinderserumalbumin (BSA als Negativkontrolle), Fibronectin (FN), Gelatine, Hyaluronsäure (HA), Kollagen, Laminin und Kollagen Typ IV.

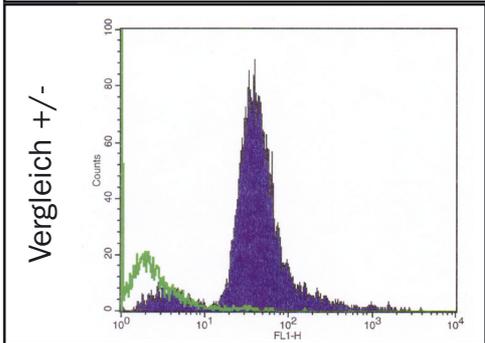
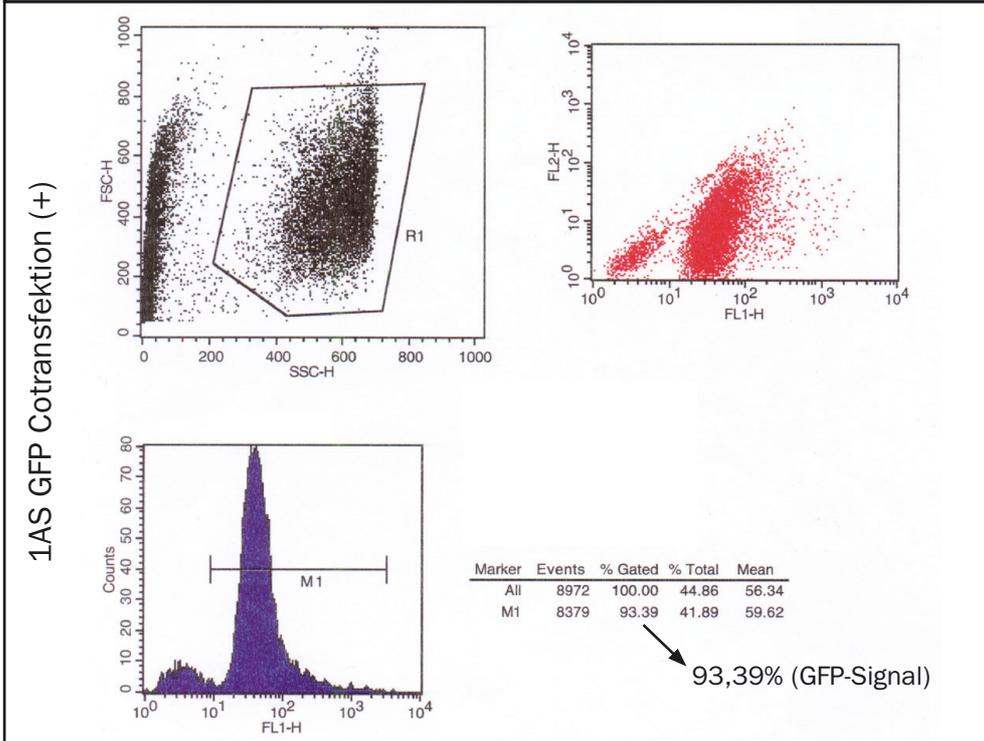
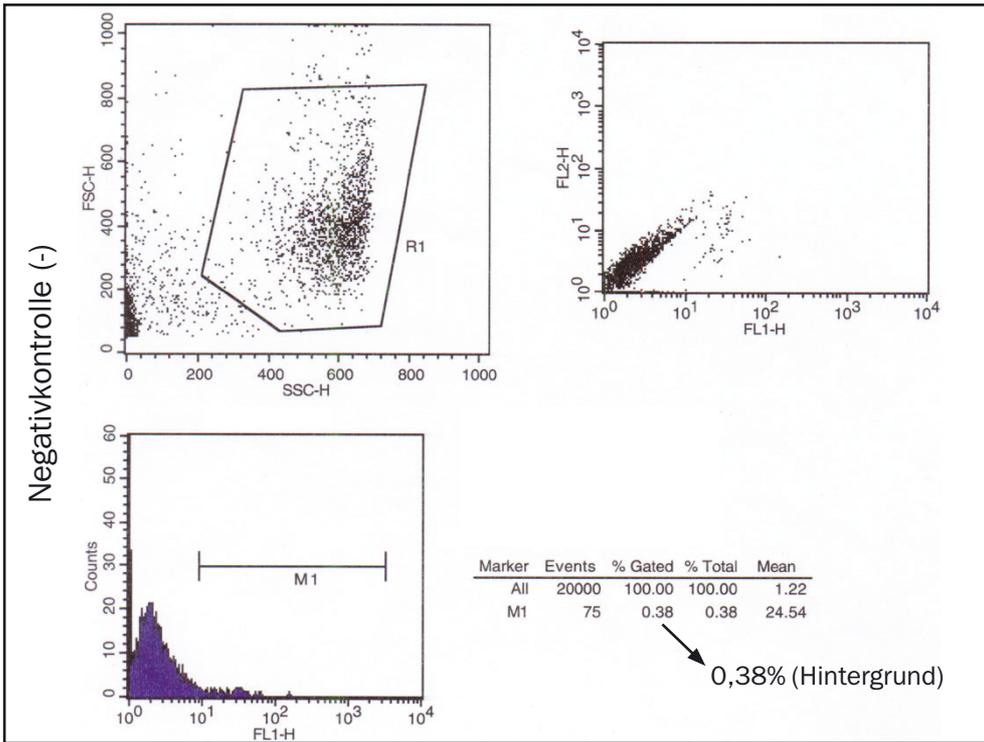
Zur Kontrolle der transienten Expression wurden Zelllysate präpariert und diese Western Blot Analysen mit anti-FLAG-Tag-Antikörpern unterzogen (siehe Abb. 3.24). Die Transfektionseffizienz wurde durch Cotransfektion von GFP-Protein und anschließender FACS-Auswertung bestimmt und lag bei > 90% (Abb. 3.25).

Wie in Abbildung 3.26 zu sehen ist, binden die transient transfizierten 1AS-Zellen nur an Fibronectin (FN) und Laminin (LN). Aus diesem Grund wurde Fibronectin für vergleichende Adhäsionsstudien herangezogen.



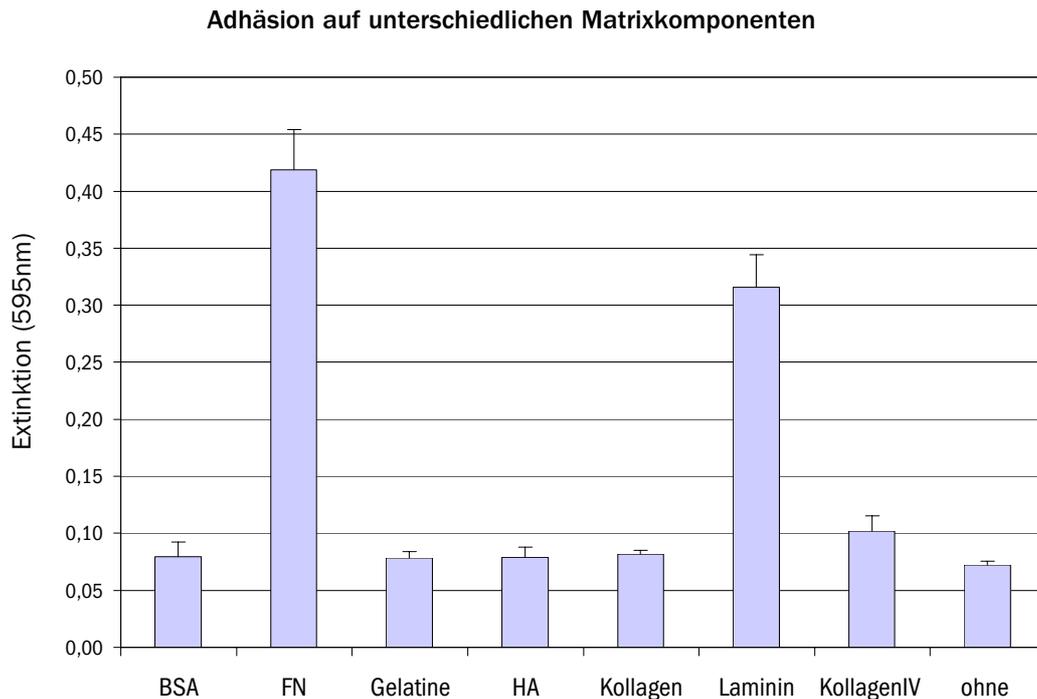
**Abb. 3.24** Western Blot zur Kontrolle der transienten Expression von rASAP1 in 1AS-Tumorzellen.

Zur Kontrolle der transienten Expression wurden 1AS-Zelllysate präpariert und diese Western Blot Analysen mit anti-FLAG-Tag-Antikörpern unterzogen. Durch den Einsatz der anti-FLAG-Antikörper kann die detektierte Bande eindeutig der transienten Expression von ASAP1 zugeordnet werden, was beim Einsatz der monoklonalen anti-ASAP1-Antikörper – aufgrund des endogenen ASAP1 Signals – nicht möglich wäre. Die Transfektionseffizienz wurde durch Cotransfektion von GFP-Protein und anschließender FACS-Auswertung bestimmt und lag bei >90%.



GFP-Signal minus Hintergrund = 93,39% - 0,38% = 93% Transfektionseffizienz

**Abb. 3.25 Transfektionseffizienz**  
 Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen, wurde ASAP1 mit GFP (green fluorescence protein) cotransfiziert. Per FACS-Analyse wurden dann die transfizierten Zellen ermittelt. Die Negativkontrolle (ohne GFP) dient zur Ermittlung des Hintergrundes (0,38%) 1AS GFP zur Ermittlung der Transfektionseffizienz (93%). Ein graphischer Vergleich ist links zu sehen. Die grüne Kurve steht für die Negativkontrolle, die blaue Fläche ist das GFP Signal.



**Abb.3.26** Adhäsion von transient mit rASAP1 transfizierten 1AS-Rattentumorzellen auf unterschiedlichen Komponenten der extrazellulären Matrix.

Je  $4 \times 10^5$  transient transfizierte 1AS-Zellen wurden auf die mit den Matrixkomponenten beschichteten 96well-Platten in Triplikaten ausgesät und nach einer Stunde analysiert. Hierfür wurden die Zellen in 70% Ethanol fixiert, mit Kristallviolett (0,1%) eingefärbt und nach mehrmaligem Waschen, mit Essigsäure (10%) entfärbt. Der Farbgehalt in der Essigsäure wurde über die Extinktion bei 595 nm ermittelt. Je größer die Extinktion, desto mehr Zellen haben an das Substrat gebunden. Rinderserumalbumin (BSA als Negativkontrolle), Fibronectin (FN), Hyaluronsäure (HA).

### 3.2.8.2.1 Transient transfiziertes rASAP1 erhöht die Adhäsion von 1AS-Tumorzellen zu Fibronectin

Nachdem Fibronectin als Substrat für die Adhäsionsversuche ausgesucht wurde, wurden 70-80% konfluente 1AS-Tumorzellen in 10 cm Schalen mit je  $10 \mu\text{g}$  der ASAP1-Konstrukte transient transfiziert und nach 24 h in Triplikaten auf Fibronectin inkubiert. Alle Versuche wurden mehrmals auf 24well-Platten durchgeführt, wobei je  $1 \times 10^5$  bzw.  $2 \times 10^5$  Zellen pro well analysiert wurden. Zur Kontrolle der transienten Expression wurden Zelllysate präpariert und diese Western Blot Analysen mit anti-FLAG-Tag-Antikörpern unterzogen (siehe Abb. 3.27). Die Transfektionseffizienz wurde durch Cotransfektion von GFP-Protein und anschließender FACS-Auswertung bestimmt und lag bei  $> 90\%$ .

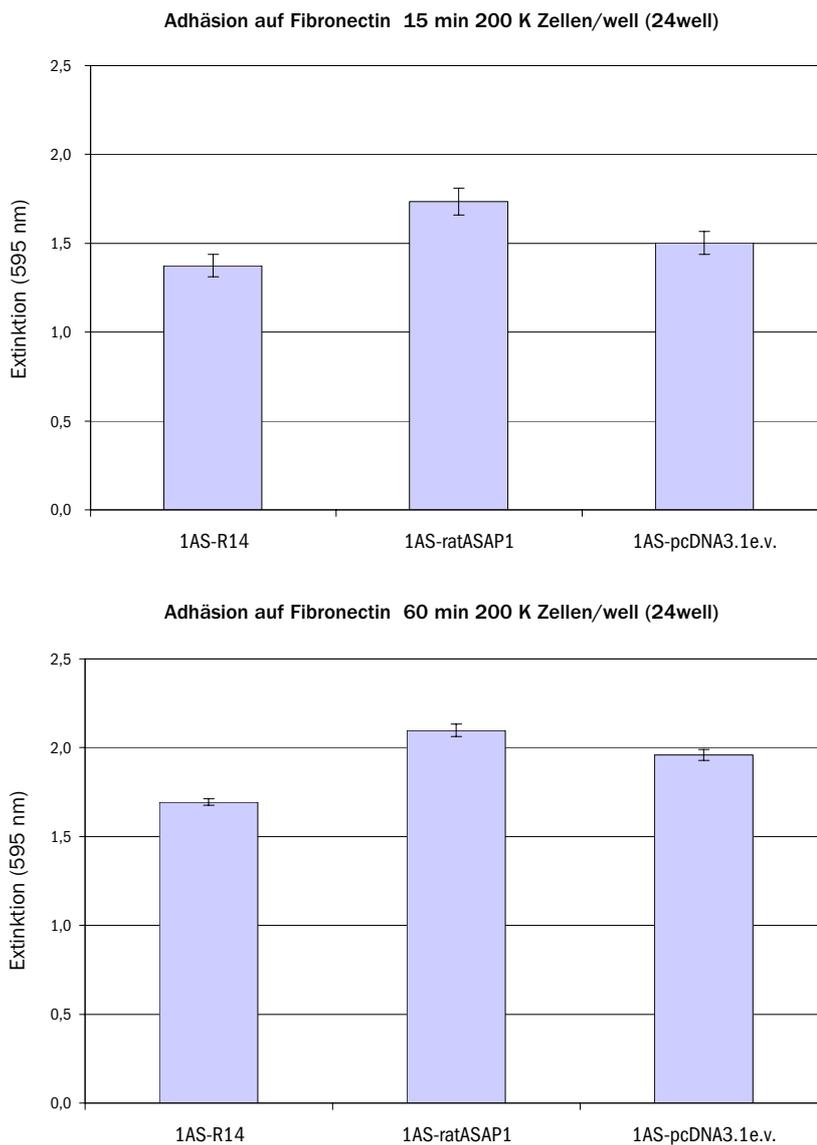
Die Adhäsion wurde nach je 15, 30, 60 und 120 Minuten getestet. Bei allen Zeitpunkten fällt eine Erhöhung der Adhäsion zu Fibronectin bei den rASAP1 überexprimierenden 1AS-Zellen, im Vergleich zu den mit Leervektor (pcDNA3.1) transient transfizierten 1AS-Zellen, auf. Der Vergleich mit den 1AS-Zellen, die das dominant negative ASAP1 (R14) exprimieren zeigt, dass diese eine geringere Adhäsion zu Fibronectin zeigen als Leervektor- oder w. t. rASAP1-transfizierte 1AS-Zellen.

Ebenfalls durchgeführte Adhäsionsversuche mit Laminin als Substrat führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Andere Substrate wurden aufgrund der geringen



**Abb.3.27 Western Blot Analyse der transient transfizierten 1AS-Zellen.**

Zur Kontrolle der transienten Expression wurden Zellysate präpariert und diese Western Blot Analysen mit anti-FLAG-TagAntikörpern unterzogen. Die Transfektionseffizienz wurde durch Cotransfektion von GFP-Protein und anschließender FACS-Auswertung bestimmt und lag bei >90%.



**Abb. 3.28 Erhöhte Expression von ASAP1 erhöht die Adhäsion auf Fibronectin.**

$1 \times 10^5$  bzw.  $2 \times 10^5$  transient transfizierte 1AS-Zellen wurden für 15, 30, 60 Minuten auf Fibronectin inkubiert, um anschließend die Adhäsion der Zellen an die Matrixkomponente zu bestimmen. Hierfür wurden die Zellen fixiert, mit Kristallviolett (0,1%) eingefärbt und anschließend mit Essigsäure (10%) entfärbt. Der Farbgehalt in der Essigsäure wurde über die Extinktion bei 595 nm ermittelt. Je größer die Extinktion, desto mehr Zellen haben an das Substrat gebunden. Hier nur dargestellt:  $2 \times 10^5$  transient transfizierte 1AS-Zellen, bei 15 und 60 Minuten Inkubationszeit. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

Adhäsion der transfizierten 1AS-Zellen nicht für weiterführende Adhäsionsversuche herangezogen.

Diese Versuche zeigen, dass rASAP1 in vitro die Adhäsion von 1AS-Rattentumorzellen erhöht und das dominant negative Konstrukt R14 die Adhäsion von 1AS-Zellen verringert (siehe Abb. 3.28).

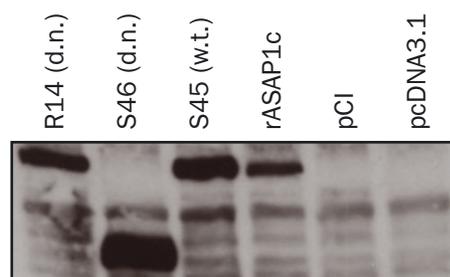
### 3.2.8.3 Zellstreckung in vitro

Um festzustellen, ob die ASAP1 Überexpression in 1AS-Rattentumorzellen zu Änderungen in der Zellstreckungsgeschwindigkeit führt, wurden Zellstreckungsversuche („spreadingassays“) mit transient transfizierten 1AS-Tumorzellen durchgeführt. Da die Formierung eines Leitsaumes bzw. flächige Lamellipodien oder stief förmige Filopodien eine Grundvoraussetzung für die amöboide Zellbewegung sind, können Unterschiede in der Bildungsgeschwindigkeit dieser Zellstrukturen Erkenntnisse über die Bewegungsfähigkeit der getesteten Zellen liefern.

Um dieses nun bei 1AS-Rattentumorzellen zu überprüfen, wurden transient transfizierte 1AS-Zellen ausgesät und nach jeweils 15, 30, 60, 120 Minuten fotografiert. Anschließend erfolgte die Auswertung, wobei in allen Versuchsansätzen verglichen wurde, wie viele Zellen, im Vergleich zu bereits ausgestreckten oder Zellfortsätze bildenden Zellen noch komplett abgerundet waren.

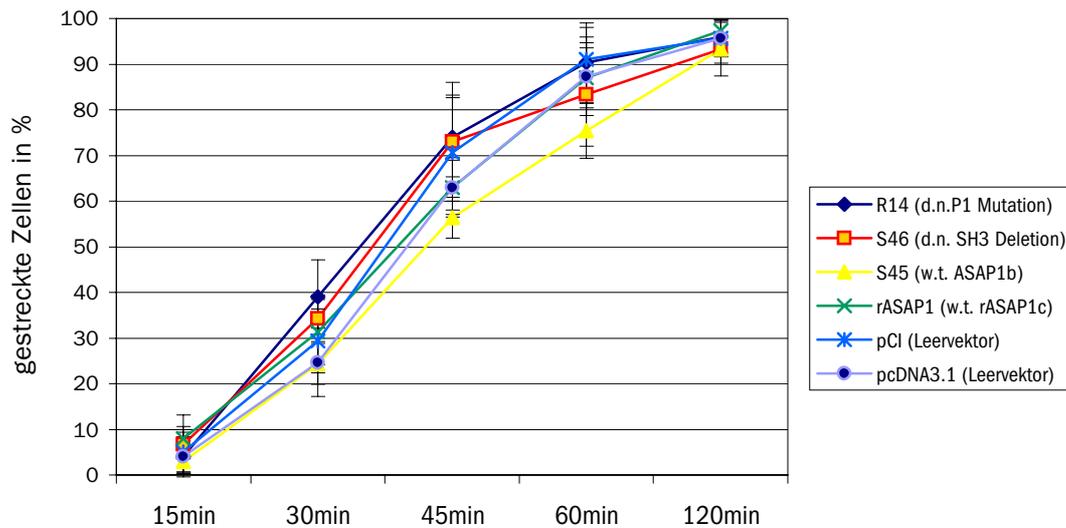
Von allen Versuchsansätzen wurden Zelllysate präpariert und anhand von Western Blot Analysen wurde die transiente ASAP1-Signalstärke ermittelt. Die per GFP-Cotransfektion mit anschließender FACS-Auswertung ermittelte Transfektionseffizienz lag bei über 90%.

Die Auswertungen der Zellstreckungsversuche erbrachte kein signifikanten Unterschied. Obwohl es scheint, dass die transiente Transfektion von 1AS-Zellen mit dem w.t. ASAP1b (S45) Konstrukt zu einer Reduzierung der Zellstreckung führt, kann keine signifikante Änderung in der Zellstreckung durch die unterschiedlichen Konstrukte ermittelt werden.



**Abb. 3.29 Western Blot zur Kontrolle der transienten Expression der ASAP1 Konstrukte in 1AS-Tumorzellen.**

Von allen Versuchen wurden Zelllysate präpariert. Per Western Analyse wurde die transiente Expression der verschiedenen ASAP1-Konstrukte überprüft. ASAP1 (w. t. rASAP1c), R14 (dominant negatives Mauskonstrukt, R811A Punktmutation in P1), pcDNA3.1 (Leervektor von ASAP1 und R14 als Negativkontrolle), S45 (w. t. Maus ASAP1b), S46 (dominant negatives Mauskonstrukt, ohne SH3-Domäne), pCI (Leervektor von S45 und S46 als Negativkontrolle).



**Abb. 3.30 Einfluss der transient transfizierten ASAP1-Konstrukte auf die Zellstreckung.**

Transient transfizierte 1AS-Zellen wurden auf Fibronektin beschichteten Kulturschalen ausgesät und nach 15, 30, 60, 120 Minuten Inkubation bei 37°C fotografiert. Es wurde bei der Auswertung unterschieden zwischen noch völlig abgerundeten Zellen und bereits abgeflachte oder Fortsätze bildende Zellen. Die Kurven geben also an, wie schnell sich die Zellen nach der Aussaat auf dem Substrat strecken.

### 3.2.8.4 In vitro Wundheilungsversuch

Um die Zellbeweglichkeit in einem weiteren in vitro Versuch zu testen, wurden Wundheilungsassays (Kratzassays) durchgeführt.

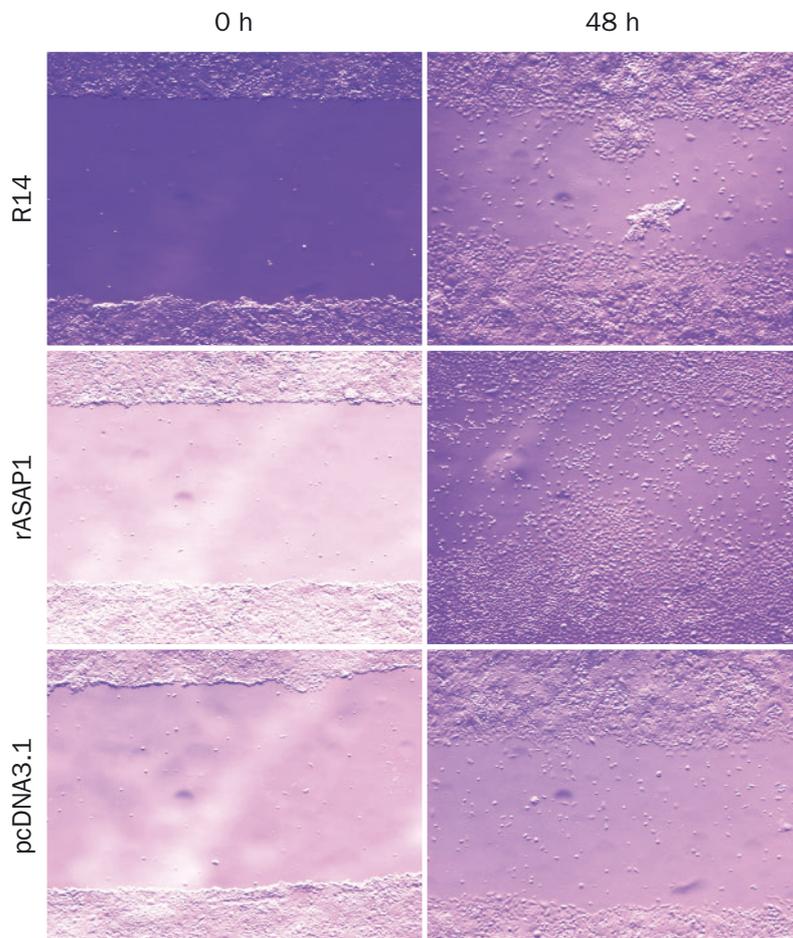
In Fibronektin-beschichteten 6 cm-Kulturschalen wurden subkonfluente 1AS-Zellen mit den unterschiedlichen ASAP1-Konstrukten transient transfiziert. 24 h später wurde in die nun konfluenten Zellen eine Bahn mit einer sterilen Pipettenspitze gekratzt. Die losgelösten Zellen wurden durch mehrmaliges Absaugen und Waschen mit PBS entfernt. Die Ränder der Zellrasen, die den Spalt begrenzten, wurden alle 24 h fotografiert, um die Einwanderungsgeschwindigkeit der mit unterschiedlichen Konstrukten transient transfizierten Zellen zu dokumentieren.

Da trotz der mehrmaligen Wasch- und Absaugschritte nicht zu verhindern war, dass sich einzelne Zellen aus dem Zellverbund ablösen und sich in den Spalt absetzen, wurde dies bei der Analyse beachtet (siehe Abb. 3.31). Bei der Vermessung der Spaltbreite wurden einzelne von der Lauffront der Zellteppiche lösgelöste Zellen nicht berücksichtigt.

Um die ASAP1-Expression der transient transfizierten 1AS-Zellen zu überprüfen, wurden alle Zellen nach Beendigung der Versuche geerntet. Anhand von Western Blot Analysen wurde dann die noch vorhandene transiente ASAP1-Signalstärke ermittelt (Abb. 3.32).

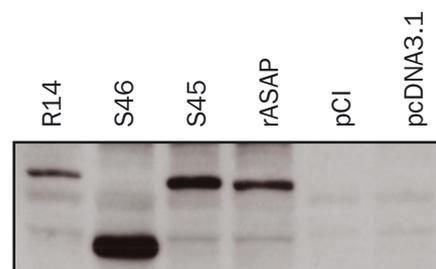
Die schnellste Motilität auf zweidimensionalem Substrat zeigen die transient transfizierten rASAP1-1AS (konstitutiv aktiv) und S45-1AS Zellen, wobei es sich bei beiden Konstrukten um wildtyp ASAP1 handelt. Die mit den dominant negativen ASAP1-Konstrukten (S46, R14) transfizierten 1AS-Zellen zeigen die zweitschnellste Motilität, gefolgt von den mit Leervektoren (pcDNA3.1, pCI) transfizierten 1AS-Klonen.

Vergleiche der mit wildtyp ASAP1 transfizierten 1AS-Zellen, welche den Spalt nach 48 h zu ca.50% geschlossen haben, mit den Leervektoren tragenden 1AS-Zellen, die nach 48 h nur ca. 30% des Spaltes schließen konnten, bestätigen die in Fibroblasten gemachte Beobachtung (Randazzo et al., 2000), dass die Expression von ASAP1 die Zellmotilität erhöht (siehe Abb. 3.33).



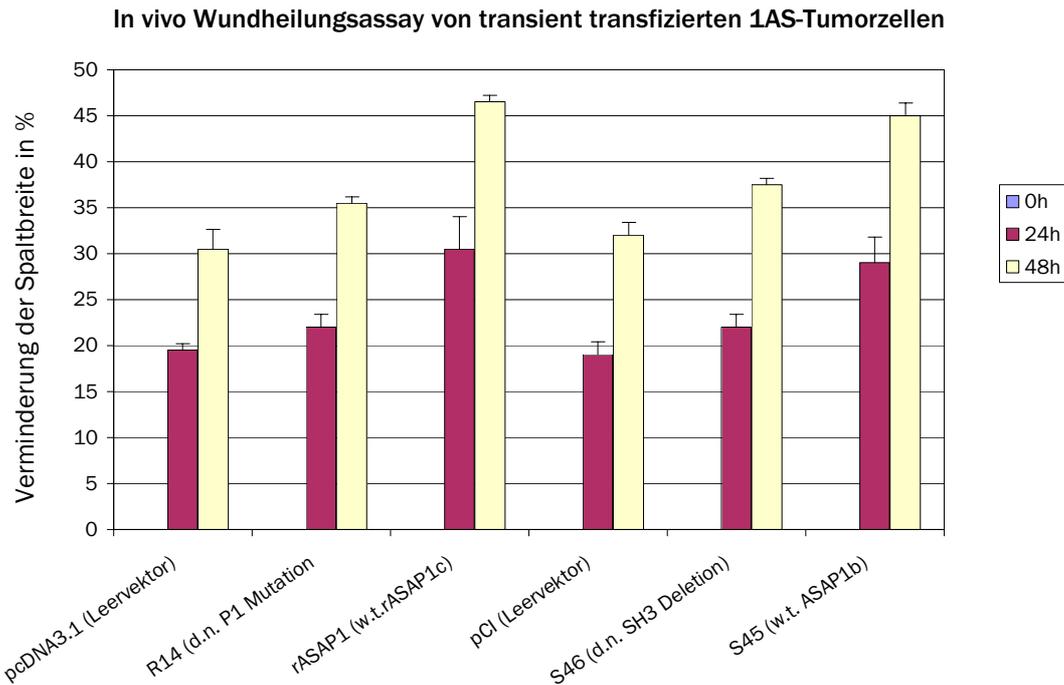
**Abb. 3.31 In vitro Wundheilungsversuch.**

Transient mit rASAP1c transfizierten 1AS-Zellen schließen schneller die Lücke im Zellrasen als die Vergleichsgruppen. Dargestellt sind exemplarisch 1AS-Zellen, welche mit folgenden Konstrukten transient transfiziert wurden: dominant negatives R14, rASAP1c und Leervektor pcDNA3.1.



**Abb. 3.32 Western Blot mit transienter Expression der ASAP1-Konstrukte in 1AS-Tumorzellen.**

Nach Beendigung der Kratzassays wurden die 1AS-Zellen geerntet und lysiert. Per Western Analyse wurde die transiente Expression der verschiedenen ASAP1-Konstrukte überprüft. ASAP1 (w. t. rASAP1c), R14 (dominant negatives Mauskonstrukt, R811A Punktmutation in P1), pcDNA3.1 (Leervektor von ASAP1 und R14 als Negativkontrolle), S45 (w. t. Maus ASAP1b), S46 (dominant negatives Mauskonstrukt, ohne SH3-Domäne), pCI (Leervektor von S45 und S46 als Negativkontrolle).



**Abb. 3.33 Auswertung der Wundheilungsversuche.**

In einem Zellrasen transient transfizierter 1AS-Tumorzellen wurde mit einer Pipettenspitze ein Spalt gekratzt und dessen Schließung durch einwandernde Zellen analysiert. Graphische Darstellung der prozentualen Verminderung der Spaltbreite. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

### 3.2.8.5. Proliferation

Da ASAP1 in wichtige Signalwege integriert ist (Integrine, c-Src, siehe Einleitung), sollte anhand der Überexpression von wild typ ASAP1 bzw. dominant negativem ASAP1 ein Einfluss in vitro auf die Proliferation ermittelt werden.

Eine unbeschränkte Fähigkeit zur Proliferation ist eine wichtige Grundeigenschaft von Tumorzellen. Das Ausschalten der Proliferationskontrolle und der damit einhergehende Verlust der terminalen Differenzierung und der Quieszenz führt zu einer Entkopplung der Tumorzellen von der Regulation der Gewebhomeostase.

Ein Weg diese Proliferationskontrolle zu umgehen besteht in der Überexpression oder Mutation von Signaltransduktionsmolekülen, so dass konstitutiv aktive Signalwege zu einer erhöhten Proliferation führen.

Für die Ermittlung des Einflusses von ASAP1 auf die Proliferation, wurden die 1AS-Tumorzellen bzw. deren hochmetastatische Gegenspieler ASML transient mit den ASAP1-Konstrukten transfiziert. Nach 24 h wurde dann <sup>3</sup>H-Thymidin zu den Zellen gegeben und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden maschinell geerntet und auf eine Membran übertragen, welche nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit maschinell ausgewertet werden konnte. Der Einbau von radioaktiven <sup>3</sup>H-Thymidin in die neu synthetisierte DNA wurde gemessen und als CPM-Wert dargestellt (counts per minutes, Ereignisse pro Minute). Je höher der CPM-Wert, desto mehr DNA wurde neu synthetisiert in welche <sup>3</sup>H-Thymidin eingebaut werden konnte, umso höher ist die Proliferationsrate der getesteten Zellen.

Zur Kontrolle der transienten Expression wurden Zelllysate präpariert und diese Western Blot Analysen mit anti-FLAG-Tag-Antikörpern unterzogen. Die Transfektionseffizienz wurde durch Cotransfektion von GFP-Protein und anschließender FACS-Auswertung bestimmt und lag bei über 90%.

Die transiente Transfektion von ASAP1 (= w. t. rASAP1c), R14 (= dominant negatives Mauskonstrukt, Punktmutation in P1), Leervektor pcDNA3.1 (Negativkontrolle), S45 (= w. t. Maus ASAP1b) und deren Leervektor pCI als Negativkontrolle in 1AS-Tumorzellen zeigten keine Unterschiede in der Proliferation.

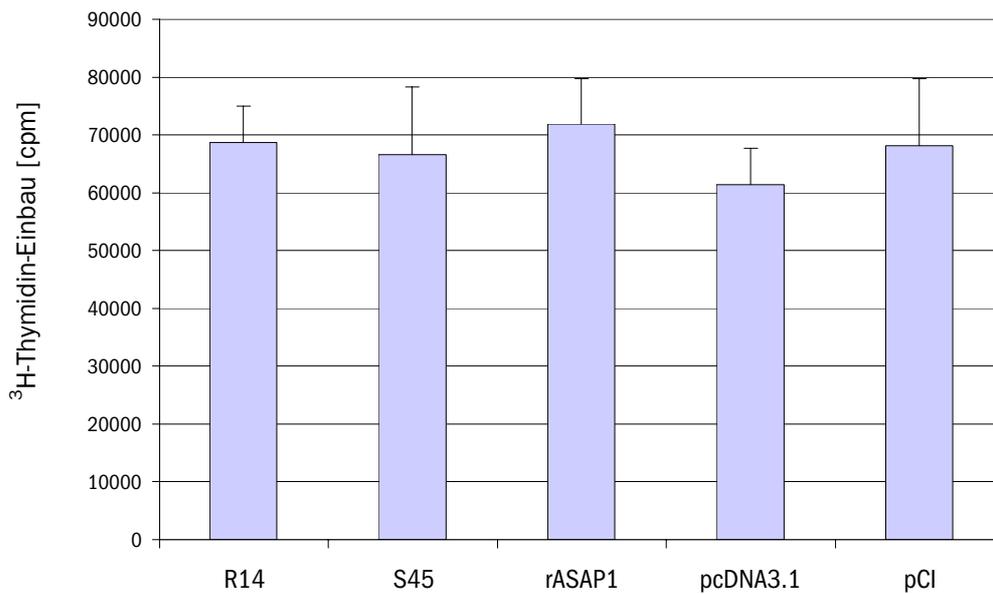
Auch die transienten Transfektionen der dominant negativen Konstrukte und deren korrespondierende Leervektoren in ASML-Tumorzellen zeigten keine Veränderung in der Proliferation dieser Zellen (Abb. 3.34, 3.35).

Die *in vitro* Proliferationsversuche zeigen, dass ASAP1 keinen statistisch relevanten Einfluss auf die Proliferation der transient transfizierten Rattentumorzellen 1AS und ASML hat.

Die Analyse stabiltransfizierter ASML-Rattentumorzellen bezüglich einer Änderung in der Proliferation wird in Abbildung 3.36 dargestellt. Im ASML *in vitro* Zellsystem zeichnet sich eine leichte Erhöhung der Proliferation bei Überexpression von dominant negativen Konstrukten ab. Dies ist möglicherweise auf klonale Varianzen zurückzuführen und liegt, wie Abb. 3.36B zeigt, im Bereich natürlicher Schwankungen von *in vitro* Versuchen und ist statistisch nicht relevant. Gestützt auf die Ergebnisse der transienten Transfektionen, bei welchen kein Proliferationsunterschied feststellbar war, ist im *in vitro* ASML-Zellsystem keine signifikante Änderung der Proliferation aufgrund der Überexpression von dominant negativen ASAP1-Konstrukten feststellbar.

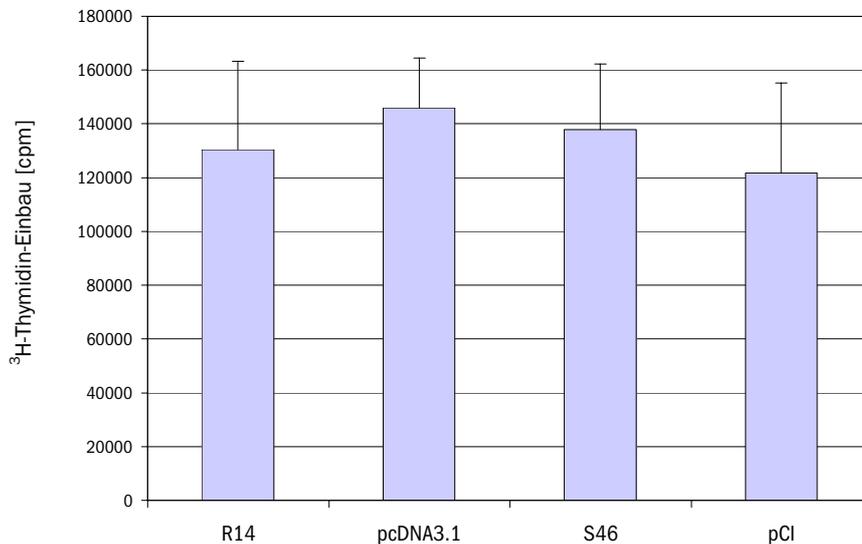
Die Schlussfolgerung aus den obigen Versuchen ist, dass ASAP1 *in vitro* keinen Einfluss auf die Proliferation der 1AS- bzw. ASML-Rattentumorzelllinien hat.

### Proliferation transient transfizierter 1AS Zellen

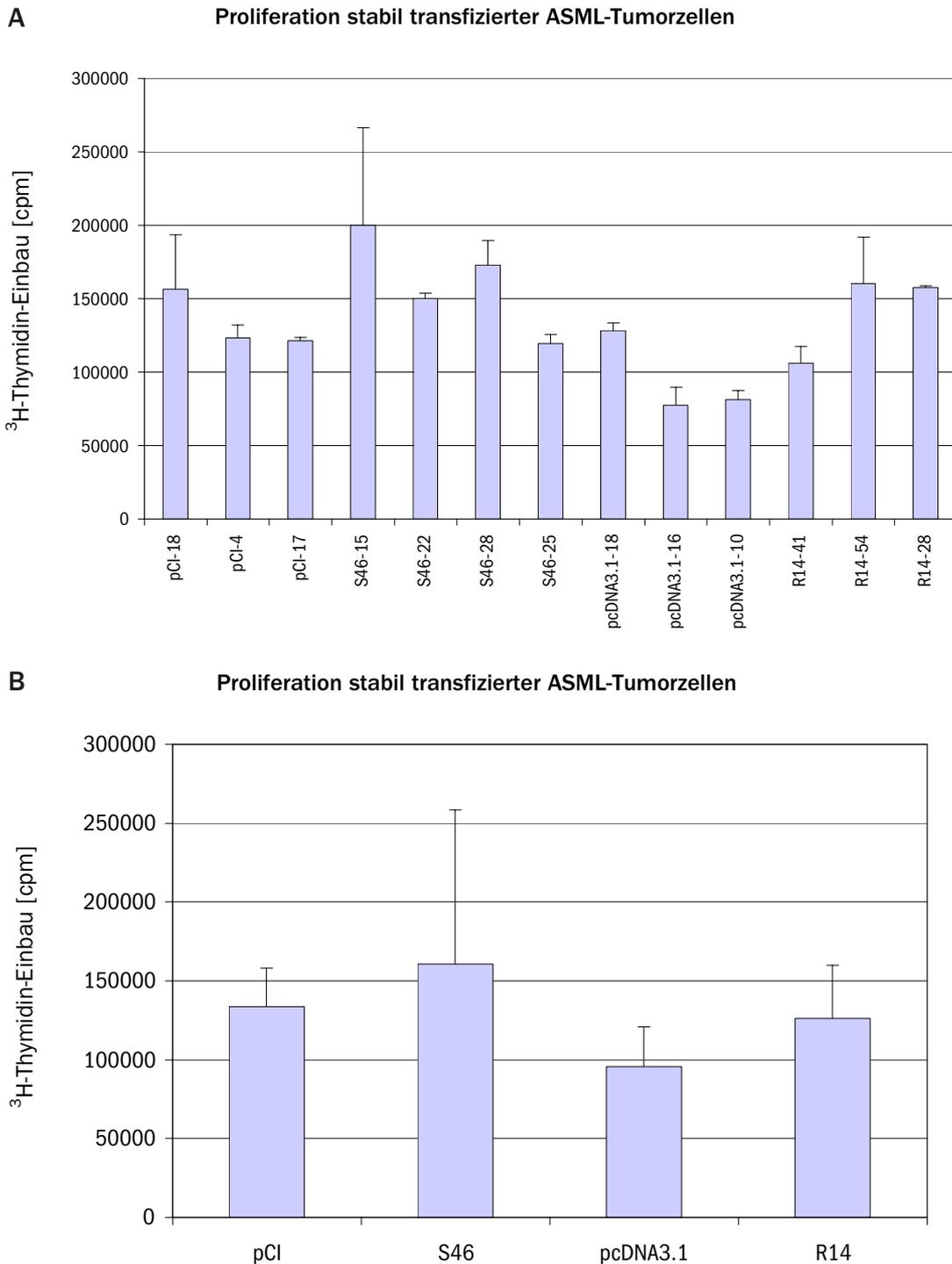


**Abb. 3.34 Proliferationsrate transient transfizierter 1AS-Tumorzellen, dargestellt in CPM. (counts per minute)**  
Über den Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin in neusynthetisierte DNA konnte die Proliferationsrate von transient transfizierten 1AS-Tumorzellen ermittelt werden. Zwischen allen transient transfizierten 1AS-Tumorzelllinien ist kein signifikanter Unterschied in der Proliferationsrate festzustellen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

### ASML Proliferation



**Abb. 3.35 Proliferationsrate transient transfizierter ASML-Tumorzellen, dargestellt in CPM. (counts per minute)**  
Über den Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin in neusynthetisierte DNA konnte die Proliferationsrate von transient transfizierten ASML-Tumorzellen ermittelt werden. Zwischen allen transient transfizierten ASML-Tumorzelllinien ist kein signifikanter Unterschied in der Proliferationsrate festzustellen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten



**Abb. 3.36 Proliferationsrate stabil transfizierter ASML-Tumorzellen, dargestellt in CPM. (counts per minute)**  
 Über den Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin in neusynthetisierte DNA konnte die Proliferationsrate von stabil transfizierten 1AS-Tumorzellen ermittelt werden. Sowohl die stabilen Klone als auch die Ergebnisse der transient transfizierten Zellen erlauben die Aussage, dass rASAP1 keinen ändernden Einfluss auf die Proliferation hat. Die klonalen Varianzen, die teilweise zu einer Erhöhung bzw. Erniedrigung der Proliferationsrate führen, liegen möglicherweise an der Einbaustelle des Konstruktes in die genomische DNA, was zu Mutationen bzw. Expressionsänderungen in für die Proliferation wichtigen Genen führen kann.

**A:** Darstellung der einzelnen stabilen Klone. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten

**B:** Zusammenfassung aller mit demselben Konstrukt stabil transfizierten ASML-Zellen. Diese Daten repräsentieren den Mittelwert aus 9 unabhängigen Experimenten. Dominant negatives ASAP-S46 mit dem korrespondierenden Leervektor pCl. Dominant negatives ASAP-R14 mit dem korrespondierenden Leervektor pcDNA3.1.

### 3.2.8.6 Apoptose

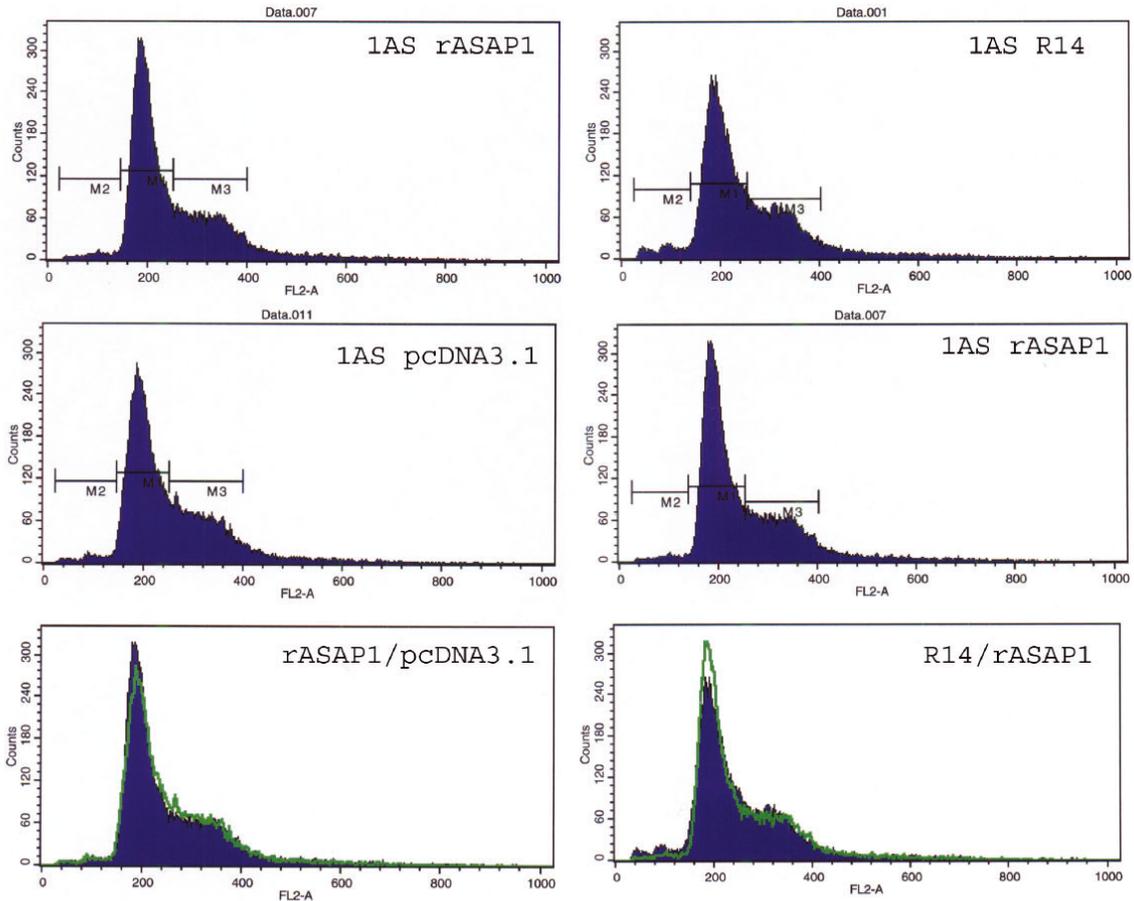
Die Apoptose (programmierter Zelltod) ist einer der Hauptverteidigungsmechanismen, um ungezügelt Proliferation und damit die Transformation von Zellen zu verhindern. So führt die Aktivierung von Onkogenen wie z.B. c-myc oder ras nicht nur zu einer erhöhten Proliferation, auch die Apoptose wird durch die Onkogenaktivierung unterdrückt. Auch Tumorsuppressorgene spielen eine Rolle bei der Aktivierung der Apoptose. So besitzt der Tumorsuppressor p53 nicht nur die Fähigkeit die Zellproliferation zu inhibieren, auf bestimmte Signale hin kann es auch die Apoptose einleiten.

Bezüglich der Metastasierung spielt die Apoptose eine wichtige Rolle und wird in diesem Zusammenhang als Anoikis bezeichnet. Anoikis wird definiert als Apoptose, welche durch inadäquate bzw. ungenügende Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen ausgelöst wird. Dieser durch die Integrine eingeleitete Prozess soll verhindern, dass Zellen ihren Gewebeverband verlassen und im Körper umherwandern können. Um zu metastasieren muss die Zelle also die Fähigkeit besitzen, das Auslösen der Anoikis bzw. der Apoptose zu unterdrücken.

Um nun den Einfluss von ASAP1 auf die Apoptose zu bestimmen, wurden mit ASAP1-Konstrukten transient transfizierte 1AS-Tumorzellen auf die Induktion der Apoptose hin untersucht. Hierfür wurden 48 h nach der transienten Transfektion die 1AS-Zellen mit den verschiedenen ASAP1-Konstrukten geerntet und in 70% Ethanol fixiert. Diese fixierten Zellen wurden dann mit Propidiumjodid (PI) behandelt, was zu einer DNA-Färbung führt. Per FACS wurden die so behandelten Zellen dann analysiert, wobei kontrolliert wurde, ob es zu einer Erhöhung des sub-G1-Signals (Zeichen für den apoptotischen Abbau der DNA) in den ASAP1 transfizierten Zellen (wildtyp bzw. dominant negativ) im Vergleich zu den mit Leervektor transfizierten Zellen kommt (siehe „2. Material und Methoden“).

In Abbildung 3.37 sind alle FACS-Analysen der transient transfizierten 1AS-Zellen dargestellt und die Expression der transfizierten Konstrukte kann dem Western Blot in Abbildung 3.29 entnommen werden.

Wie die FACS-Auswertungen zeigen, hat die Expression von ASAP1 keinen Einfluss auf die Apoptose in 1AS-Zellen.



File: Data.001 1ASR14  
 Log Data Units: Linear Values  
 Sample ID:  
 Patient ID:  
 Tube: Untitled  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Acquisition Date: 22-Sep-04  
 Gate: G1  
 Gated Events: 26288  
 Total Events: 34539  
 X Parameter: FL2-A (Linear)

Marker	Left	Right	Events	% Gated
All	0	1023	26288	100.00
M1	140	254	15849	60.29
M2	26	140	1137	4.33
M3	254	402	7801	29.68

File: Data.007 1ASrASAP1  
 Log Data Units: Linear Values  
 Sample ID:  
 Patient ID:  
 Tube: Untitled  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Acquisition Date: 22-Sep-04  
 Gate: G1  
 Gated Events: 26285  
 Total Events: 31487  
 X Parameter: FL2-A (Linear)

Marker	Left	Right	Events	% Gated
All	0	1023	26285	100.00
M1	140	254	16734	63.66
M2	26	140	509	1.94
M3	254	402	7548	28.72

File: Data.007 1ASrASAP11  
 Log Data Units: Linear Values  
 Sample ID:  
 Patient ID:  
 Tube: Untitled  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Acquisition Date: 22-Sep-04  
 Gate: G1  
 Gated Events: 26285  
 Total Events: 31487  
 X Parameter: FL2-A (Linear)

Marker	Left	Right	Events	% Gated
All	0	1023	26285	100.00
M1	145	251	16515	62.83
M2	23	145	556	2.12
M3	251	399	7675	29.20

File: Data.011 1ASpcDNA3.1  
 Log Data Units: Linear Values  
 Sample ID:  
 Patient ID:  
 Tube: Untitled  
 Panel: Untitled Acquisition Tube List  
 Acquisition Date: 22-Sep-04  
 Gate: G1  
 Gated Events: 26447  
 Total Events: 30136  
 X Parameter: FL2-A (Linear)

Marker	Left	Right	Events	% Gated
All	0	1023	26447	100.00
M1	145	251	15986	60.45
M2	23	145	660	2.50
M3	251	399	8143	30.79

**Abb. 3.37 Apoptoseauswertung.**

Exemplarische Darstellung der Apoptoseauswertung per FACS-Analyse. In der Darstellung werden die transient transfizierten 1AS-Zellen analysiert, die folgende Konstrukte exprimieren: rASAP1, R14, pcDNA3.1. Bei allen Konstrukten liegt die Zellzahl der sub-G1-Peaks bei 2-4%. Dieser Bereich wird in allen Darstellungen durch M2 markiert. Falls ein Konstrukt die Apoptose auslösen sollte, würde die Anzahl der Zellen in diesem Bereich signifikant ansteigen, da diese Zellen ihre DNA abbauen und somit unter den G1-Bereich fallen würden. Mit gleichen Ergebnissen wurden folgende Konstrukte, welche ebenfalls transient in 1AS-Zellen transfiziert wurden getestet: S45, S46, pCI

### 3.2.9. Identifikation von ASAP1-Interaktionspartnern anhand eines SH3-Domain-Arrays

Da ASAP1 mit seiner prolinreichen Region bzw. den Proteindomänen P1-P3 an SH3-Domänen von anderen Proteinen binden kann, wurde anhand eines Transignal SH3-Domain-Arrays (BioCat) versucht, Bindungspartner von ASAP1 zu finden.

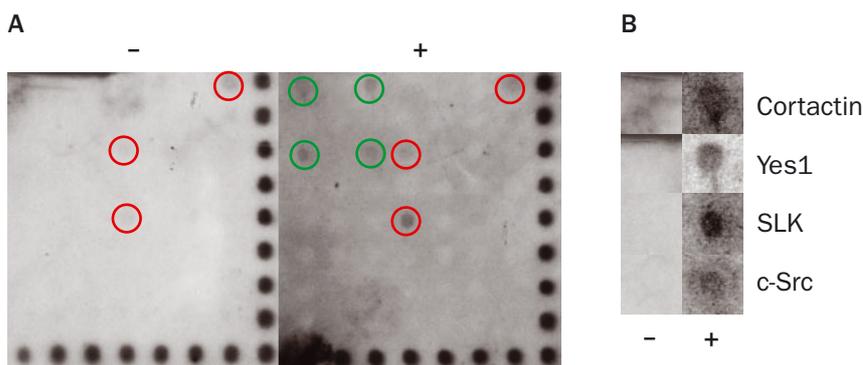
Auf diesen SH3-Domain-Arrays befinden sich je 38 unterschiedliche SH3-Domänen, mit welchen das ASAP1-Protein mögliche Bindungen eingehen kann.

Um festzustellen, mit welchen SH3-Proteinen ASAP1 interagiert, wurde ein Zelllysate aus der hochmetastatischen Zelllinie ASML hergestellt. Da ASAP1 in dieser Zelllinie stark überexprimiert wird, besteht eine gute Möglichkeit, dass das ASAP1-Protein an einige dieser SH-Domänen binden kann. Zur Detektion dieser Interaktion zwischen ASAP1 und den möglichen SH3-Zielproteinen wurde der monoklonale anti-ASAP1-Antikörper 7B12 eingesetzt, der spezifisch ASAP1 bindet. Zur Visualisierung der Interaktion wurde ein HRP-gekoppelter sekundärer anti-Maus-Ig-Antikörper benutzt, der bei der Umsetzung des ECL-Substrates luminesziert, was per ECL-Hyperfilm (Amersham) detektiert werden kann. Als Negativkontrolle wurde der Versuch ohne den Einsatz des Zelllysates ausgeführt.

Wie in Abbildung 3.38 und Tabelle 3.6 dargestellt ist, konnten folgende Proteine als Interaktionspartner von ASAP1 identifiziert werden: Cortactin, Yes1, SLK und c-Src.

Da c-Src schon als Interaktionspartner von ASAP1 identifiziert wurde (Randazzo et al., 1998), spricht dies für die Zuverlässigkeit der mit den SH3 Domain Arrays erzielten Ergebnisse.

Da Cortactin in den Vesikeltransport involviert ist und die SLK, Yes1 und c-Src bereits im Zusammenhang mit Krebs beschrieben wurden, könnten dies ein weiterer Hinweis darauf sein, dass ASAP1 möglicherweise bei der Tumorprogression und Metastasierung funktionell beteiligt ist.



**Abb. 3.38 SH3-Domain-Array**

**A:** Links (-) der als Negativkontrolle fungierende Blot und rechts (+) der mit ASML-Zelllysate inkubierte Blot. Beide Blots zeigen die gleichen (rot umringten) Signale, die durch unspezifische Bindung der eingesetzten Antikörper entstanden. Die vier grün umringten Signale tauchen nur auf dem rechten SH3-Domain-Array auf. Dies sind die vier identifizierten Interaktionspartner von ASAP1: Cortactin, Yes1, SLK und c-Src.

**B:** Nahaufnahme der positiven Signale neben den korrespondierenden Membranstellen der Negativkontrolle.

SH3 Domäne	voller Name
Cortactin	Cortacin
SLK	Src-like kinase
Yes1	Yamaguchi sarcoma virus oncogene homologe 1
c-Src	Cellular Rous Sarcoma Virus

**Tab. 3.6 Interaktionspartner des ASAP1-Proteins.**

Alle vier identifizierten Interaktionspartner von ASAP1 zeichnen sich durch eine SH3-Domäne aus, an die das ASAP1-Protein mit seiner Prolin-reichen Region bzw. den Domänen P1 und P3 binden kann. Cortactin ist am Vesikeltransport beteiligt und SLK, Yes1 und c-Src wurden bereits im Zusammenhang mit Krebs beschrieben.

### **3.2.10 Tierversuche zur in vivo Analyse von mit ASAP1-Konstrukten stabil transfizierten 1AS- und ASML-Rattentumorzellen**

Da in vitro Methoden nur Annäherungen an die Situation in vivo sind, können niemals alle Einflüsse und Faktoren, welche in einem Organismus auf Zellen einwirken, in diesen künstlichen Systemen simuliert werden. In vitro Methoden sind also nur sehr limitierte Darstellungen der Wirklichkeit und damit entsprechen Ergebnisse, die in diesen in vitro Systemen erzielt werden, nie vollkommen der Realität in vivo.

Um den Einfluss von ASAP1 auf die Tumorprogression und die Metastasierung in einem möglichst realitätsnahen Szenario zu untersuchen, sind daher in vivo Methoden unabdingbar. Um mögliche Einflüsse der unterschiedlichen ASAP1-Konstrukte auf das Tumorwachstum und die Metastasierung dieser Tumorzelllinien zu überprüfen, wurden in meiner Arbeit stabile Klone ASAP1 überexprimierender Zelllinien subkutan in Ratten injiziert.

#### **3.2.10.1 Generation stabil transfizierter ASAP1 überexprimierender Zelllinien**

Da die Tierversuche über mehrere Wochen gehen, ist es nötig stabil transfizierte Zelllinien zu generieren, die über diesen Zeitraum die unterschiedlichen ASAP1-Konstrukte kontinuierlich überexprimieren. Aus diesem Grund wurden die nicht metastatische Tumorzelllinie 1AS und die hochmetastatische Zelllinie ASML stabil mit den unterschiedlichen ASAP1-Konstrukten transfiziert.

Hierfür wurde die nicht metastasierende Zelllinie 1AS mit folgenden Expressionskonstrukten stabil transfiziert:

- rASAP1(Wildtyp Ratten-ASAP1c, die kleinste Spleißvariante, konstitutiv aktiv)
- R14 (dominant negatives Konstrukt mit P1-Mutation)
- pcDNA3.1 (Leervektor)

Zur Generation stabiler ASML-Klone wurde die hochmetastatische Zelllinie ASML mit folgenden Expressionskonstrukten transfiziert:

- R14 (dominant negatives Konstrukt mit P1-Mutation)
- pcDNA3.1 (Leervektor)
- S46 (dominant negatives Konstrukt mit SH3-Deletion)
- pCI (Leervektor)

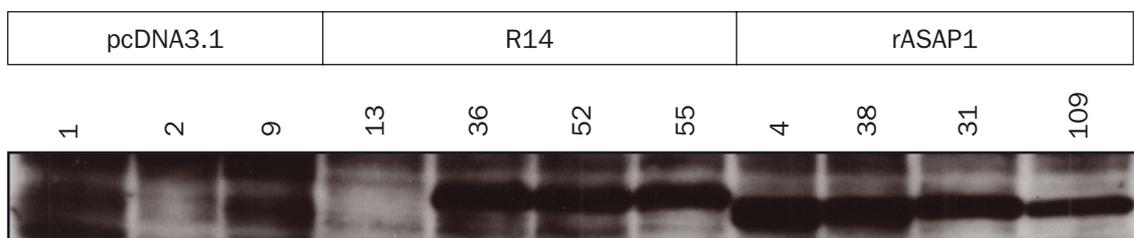
Diese relativ große Anzahl von unterschiedlichen ASAP1-Konstrukten ermöglicht es, den Einfluss von ASAP1 in einem breiten Wirkungsspektrum in der Zelle zu untersuchen. So wird in der nicht metastatischen Zelllinie 1AS der Einfluss der Überexpression der kleinsten, konstitutiv aktiven rASAP1-Spleißvariante im Vergleich mit der Normalsituation (Leervektor pcDNA3.1) und der Blockierung der ASAP1-Funktionalität (dominant negatives Konstrukt R14) überprüft.

In der hochmetastatischen Zelllinie ASML kann der Einfluss von rASAP1 durch die Blockierung unterschiedlicher ASAP1-Interaktionen und der damit verbundenen Signalwege durchleuchtet werden. Durch den Vergleich des dominant negativen Konstruktes R14 mit seinem korrespondierenden Leervektor pcDNA3.1 kann die

Auswirkung der Interaktion von ASAP1 mit dem zellulären Src bzw. Crk überprüft werden. Der Vergleich des dominant negativen Konstruktes S46 mit seinem korrespondierenden Leervektor pCI ermöglicht Einblicke in die Interaktionen von ASAP1 mit FAK und Pyk2.

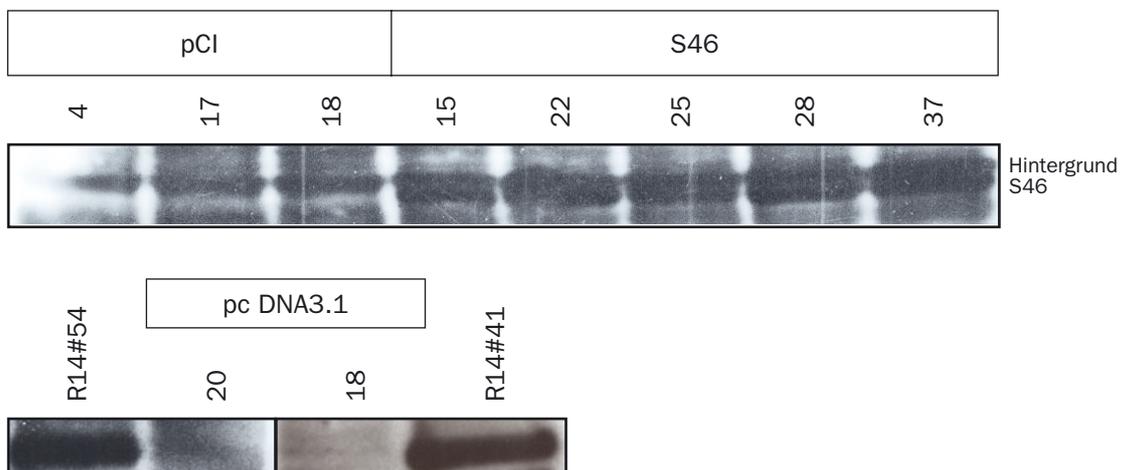
Nach der Transfektion der Expressionskonstrukte wurden die positiven Klone anhand von Neomycin (G418, Sigma) selektioniert. Nach der Expansion der Neomycin-resistenten Klone wurden Zelllysate präpariert und diese Western Blot Analysen mit anti-FLAG-Tag Antikörpern unterzogen (siehe Abb. 3.39 und 3.40).

Das Ergebnis dieser stabilen Transfektionen war, dass viele Zellklone identifiziert wurden, die das jeweilige ASAP1-Konstrukt stabil überexprimierten. Es wurden drei positive Klone jeden Konstruktes bei den stabil transfizierten 1AS-Zellen für in vivo Experimente ausgewählt. Bei den stabil transfizierten ASML-Zellen wurden für jedes Konstrukt je zwei positive Klone für die in vivo Experimente herangezogen.



**Abb. 3.39 Western Blot mit stabil transfizierten 1AS-Klonen.**

Für die in vivo Experimente wurden die Klone 1, 2, 9 der Leervektoren (pcDNA3.1) 36, 52, 55 der dominant negativen R14 und 4, 31 und 38 der rASAP1 exprimierenden 1AS-Tumorzellen ausgewählt. Die bandenähnlichen Signale in den Leervektor-transfizierten 1AS-Zellen sind Hintergrundsignale. Die Detektion erfolgte mit einem anti-FLAG-Antikörper.



**Abb. 3.40 Western Blots mit stabil transfizierten ASML-Tumorzellen.**

Für die in vivo Experimente wurden die Klone 4, 18 (pCI), 22, 37 (S46), 18, 20 (pcDNA3.1) und 54, 42 (R14) eingesetzt. Bei dem Western Blot mit den stabilen S46 und pCI Klonen sind bei genauer Beobachtung zwei Banden zu erkennen, die bei den positiven Klonen wie eine einzelne dicke Bande erscheinen. Bei diesen beiden Banden handelt es sich bei der oberen um Hintergrund und bei der unteren um die S46 spezifische Bande. Die untere Darstellung mit den stabilen R14 bzw. pcDNA3.1 Konstrukten wurde aus zwei Western Blots zusammengesetzt (R14 # 54, pcDNA3.1 # 20 und R14 # 41, pcDNA3.1 # 18). Bei allen Blots wurde für die Detektion ein anti-FLAG-Antikörper eingesetzt.

### 3.2.10.2. In vivo Analyse von mit ASAP1-Konstrukten stabil transfizierten 1AS-Rattentumorzellen

Für die Analyse der Tumorprogression und der Metastasierung der mit ASAP1-Konstrukten stabil transfizierten 1AS-Rattentumorzellen in BDX-Ratten wurden die 1AS-Klone ausgewählt, welche bei den Westernanalysen die höchste Expression der stabil transfizierte Konstrukte zeigten. Als Kontrolle fungierten drei Klone von mit Leervektor (pcDNA3.1) stabil transfizierten 1AS-Tumorzellen.

Von jeder stabil transfizierten 1AS-Zelllinie wurden für jedes Konstrukt je drei Klone ausgewählt, um damit die in vivo Experimente durchzuführen. So wurden von den Klonen rASAP1#4, #31, #38 (konstitutiv aktiv), sowie R14#36, #52, #55 (dominant negativ) und pcDNA3.1#1, #2 und #9 (Leervektor) je  $1 \times 10^6$  Zellen in PBS subkutan in BDX-Ratten injiziert (8 Tiere pro Klon).

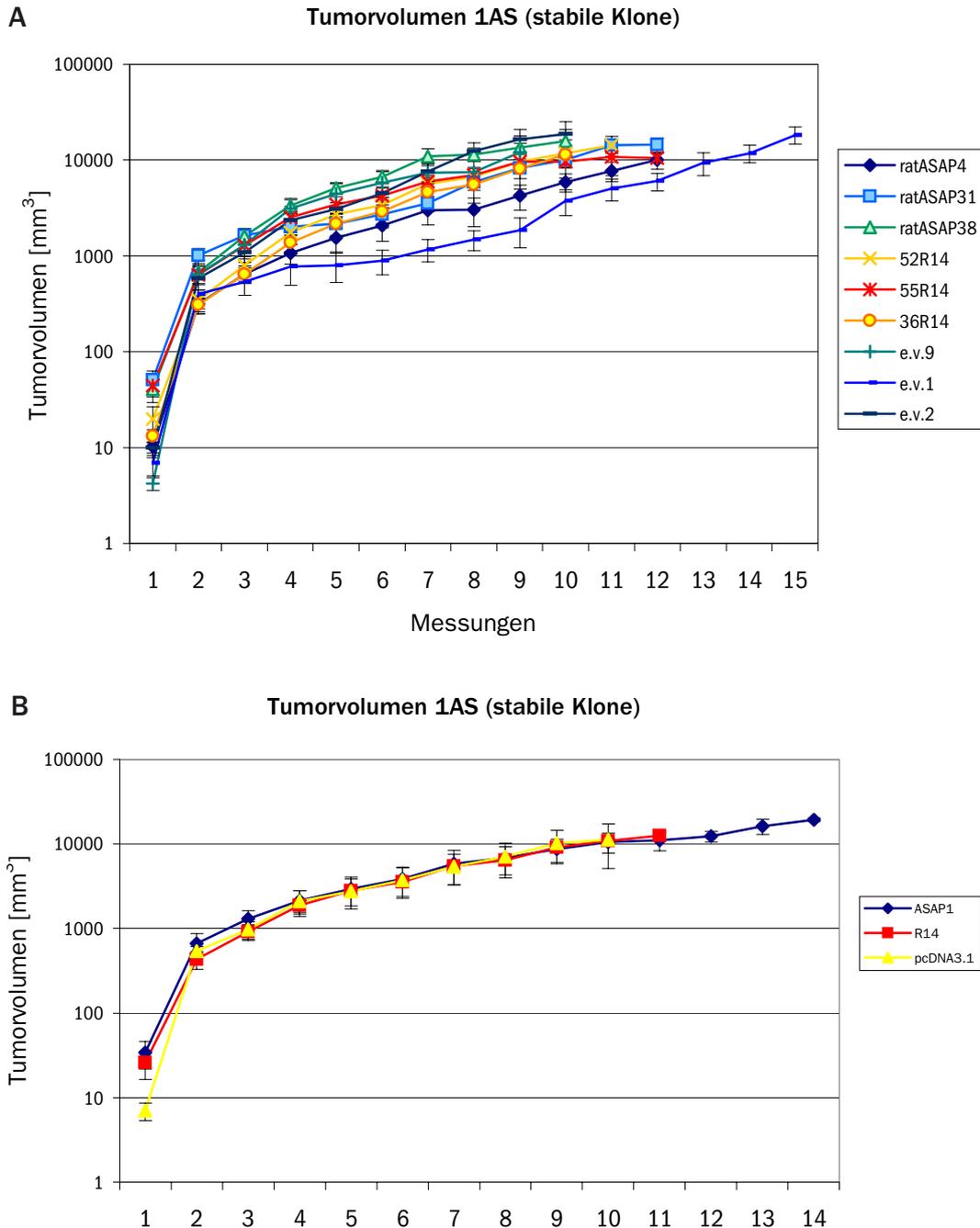
Nachdem die sich bildenden Tumore zu ertasten waren, wurden zweimal pro Woche, für die restliche Dauer des Experiments, die Dimensionen der Tumore gemessen und festgehalten. Bei Erreichen der gesetzlichen Höchstgröße des Tumors, beim Aufplatzen des Tumors oder bei feststellbarem Leiden des Tieres wurde das jeweilige Tier getötet und obduziert. Bei der Obduktion wurde der Primärtumor noch einmal vermessen, danach die ipsilateralen und kontralateralen Lymphknoten (axillar) präpariert und ausgemessen. Abschließend wurde das komplette Interieur mit allen Organen der Ratten visuell auf Auffälligkeiten hin untersucht, wobei das Hauptaugenmerk den Lungen galt, welche auf Metastasen hin untersucht wurden.

Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen, dass in der Wachstumsrate der unterschiedlichen Tumore kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen feststellbar ist. Wie schon bei den in vitro Versuchen zur Proliferation festgestellt wurde, ist auch bei den in vivo Versuchen kein Einwirken von ASAP1 auf die Proliferation festzustellen (siehe Abb. 3.41).

Da in diesem in vivo Versuch auch die 1AS-Leervektorkontrollen vergrößerte ipsilaterale Lymphknoten verursachten, wurden zur Kontrolle dieser Ergebnisse nun die ipsilateralen Lymphknotenvolumina aller drei Gruppen gegeneinander verglichen, um auf diese Weise die Metastasierung in die Lymphknoten zu validieren. Da dieser Vergleich keinen signifikanten Unterschied der Volumina aufzeigte, kann gefolgert werden, dass in diesem in vivo Versuch die Überexpression von rASAP1 bzw. des dominant negativen R14 Konstruktes keinen signifikanten Einfluss auf die Bildung von Lymphknotenmetastasen hat (Abb. 3.42).

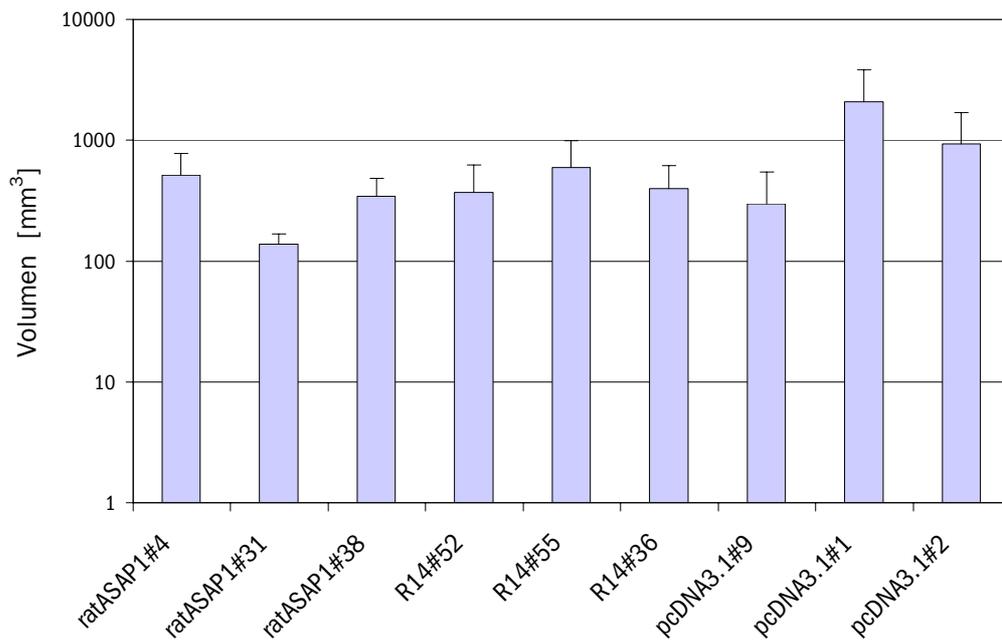
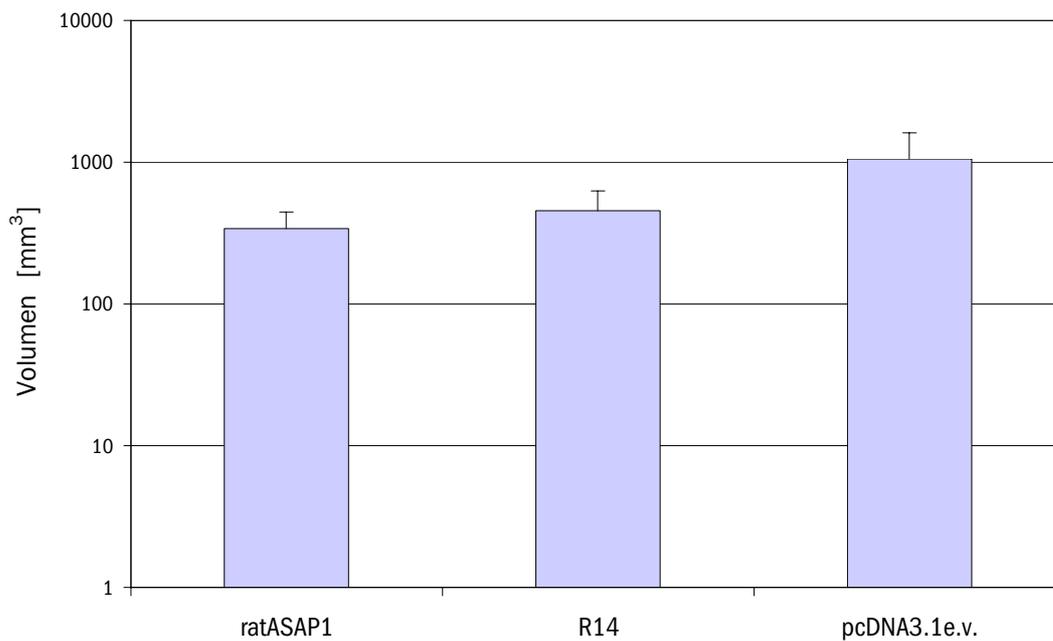
Die Untersuchung der Lungen auf Metastasen zeigte allerdings, dass die Überexpression von rASAP1c doch einen Einfluss auf die Metastasierung der 1AS-Tumore ausübt. Wie in Abbildung 3.43 dargestellt, führt die Überexpression des konstitutiven rASAP1-Konstruktes in 1AS Tumoren zur Bildung von Lungenmetastasen. Da sonst weder bei der Überexpression des dominant negativen Konstruktes R14, noch bei den Leervektor-Kontrollgruppen Metastasen in der Lunge gebildet wurden, kann davon ausgegangen werden, dass dies ein Phänotyp der stabilen Expression von rASAP1c in 1AS-Zellen ist. Die statistische Beurteilung nach dem exakten Test von Fischer bestätigte bei dem Vergleich der rASAP1c-Gruppe mit den R14- und pcDNA3.1-Kontrollgruppen die Signifikanz ( $P=0,002$ ).

Zusammengefasst konnte anhand dieses in vivo Versuches gezeigt werden, dass rASAP1c (konstitutiv aktiv) überexprimierende 1AS-Tumore keinen signifikanten Unterschied im Tumorwachstum oder der Bildung von Lymphknotenmetastasen aufweisen, aber zu einer signifikanten Bildung von Metastasen in der Lunge führen.



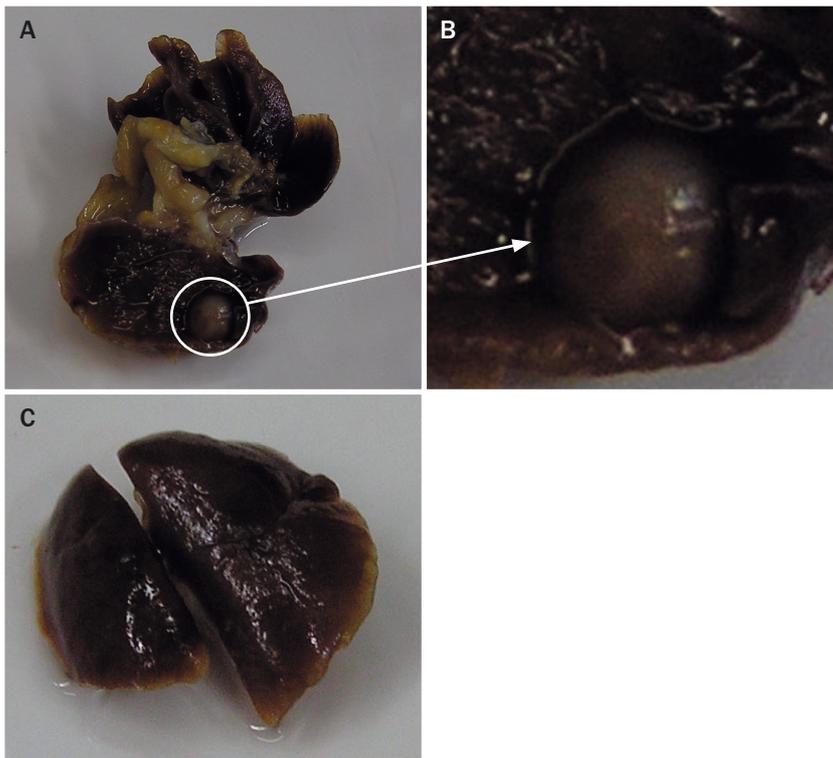
**Abb. 3.41 Wachstumsrate der durch stabile 1AS-Klone verursachten Tumore.**

Die nach subkutaner Injektion von  $1 \times 10^6$  Zellen der stabilen 1AS-Klone in BDX-Ratten entstandenen Tumore wurden zweimal die Woche ausgemessen. Die Volumenvergleiche sollten mögliche Unterschiede in der Proliferation der einzelnen stabilen Klone identifizieren. Wie schon bei in vitro Versuchen, so konnte auch hier gezeigt werden, dass ASAP1 keinen Einfluss auf die Proliferation von 1AS-Tumorzellen hat. **A:** Graphische Darstellung der Tumorumfänge jedes stabilen 1AS-Klones. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von je acht Tieren/Klon. **B:** Zusammengefasste Darstellung der Tumorumfänge. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von je ca. 24 Tieren. e.v.: Leervektor pcDNA3.1 (empty vector).

**A****1AS ipsilaterale Lymphknotenvolumina****B****1AS ipsilaterale Lymphknotenvolumina**

**Abb. 3.42** Auswertung der Metastasierung über die Lymphknoten der durch stabil transfixierte 1AS-Klone verursachten Tumore.

Die Überprüfung der Metastasierung über die Lymphknoten zeigt, dass die Überexpression des konstitutiv aktiven rASAP1c bzw. des dominant negativen R14-Konstruktes keinen signifikanten Einfluss auf die Bildung von Lymphknotenmetastasen hat. Die Beurteilung der Metastasierung über die Lymphknoten zeigte auch, dass die mit Leervektor stabil transfixierten 1AS-Zellen zur Metastasierung neigen. **A:** Größenvergleich der ipsilateralen Lymphknoten. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von je acht Tieren/Klon. **B:** Zusammengefasste Größenvergleiche der ipsilateralen Lymphknoten. Diese Daten repräsentieren die Mittelwerte von je ca. 24 Tieren/Klon. IP: ipsilateral, CO: kontralateral.



**Abb. 3.43 Lungenmetastasen in Ratten mit 1AS-rASAP1c-Tumoren.**

Nur die 1AS-Tumore mit stabilen transfizierten, konstitutiv aktiven rASAP1c bildeten Metastasen in der Lunge (exakter Fischer-Test:  $P = 0,002$ )

**A:** rASAP1#4 Lunge. 4/7 dieser Ratten entwickelten Metastasen in der Lunge.

**B:** Nahaufnahmen der Lungenmetastase.

**C:** exemplarisches Beispiel einer metastasenfreien Lunge. Keine der folgenden Rattengruppen bildete Metastasen in der Lunge. R14#55, R14#52, R14#36, pcDNA3.1#2, pcDNA3.1#1, pcDNA3.1#9.

Tumor aus 1AS-Klon	Lungenmetastasen
rASAP1c # 4	4/7
rASAP1c # 31	3/6
rASAP1c # 38	2/8
R14 # 36	0/7
R14 # 52	0/8
R14 # 55	0/8
pcDNA3.1 # 1	0/5
pcDNA3.1 # 2	0/8
pcDNA3.1 # 9	0/8
<b>Zusammengefasst:</b>	
Tumor aus 1AS-Klon	Lungenmetastasen
rASAP1c	9/21*
R14	0/23
pcDNA3.1	0/21

**Tab. 3.7. Stabil rASAP1c überexprimierende 1AS-Tumore führen zur Bildung von Lungenmetastasen in Ratten.**

Dargestellt sind die in vivo getesteten stabilen 1AS-Klone. Tumore dieser Klone führen im Falle des rASAP1c zu Lungenmetastasen (rechte Spalte). Die Zahlen geben Auskunft über die Anzahl der Lungen mit Metastasen in Bezug zur Gesamtzahl der beurteilten Lungen. Die Zusammenfassung summiert die Ergebnisse und zeigt, dass die Bildung von Lungenmetastasen durch rASAP1c exprimierende 1AS-Tumore signifikant ist (\* $P = 0,002$  nach dem exakten Test von Fischer).

### 3.2.10.3 In vivo Analyse von mit ASAP1-Konstrukten stabil transfizierten ASML-Rattentumorzellen

Für die Analyse der Tumorprogression und der Metastasierung der mit ASAP1-Konstrukten stabil transfizierten ASML-Rattentumorzellen in BDX-Ratten wurden die ASML-Klone ausgewählt, welche bei den Westernanalysen die höchste Expression der stabil transfizierten Konstrukte zeigten (siehe Abb. 3.40). Als Kontrolle fungierten je zwei Klone von mit Leervektor (pcDNA3.1 und pCI) stabil transfizierter ASML-Tumorzellen.

Von jeder stabil transfizierten ASML-Zelllinie wurden für jedes Konstrukt zwei Klone ausgewählt, um damit die in vivo Experimente durchzuführen. So wurden von den Klonen S46 #22, #37 (d.n.), R14 #41, #54 (d.n.), pCI #4, #18 (Leervektor), pcDNA3.1 #18, #20 (Leervektor) je  $1 \times 10^6$  Zellen in PBS subkutan in BDX-Ratten injiziert (8 Tiere pro Klon).

Nachdem die sich bildenden Tumore zu ertasten waren, wurden zweimal die Woche, für die restliche Dauer des Experiments, die Dimensionen der Tumore gemessen und festgehalten. Nach feststellbaren Leiden zweier Tiere, verursacht durch große ipsilaterale, axillare Lymphknoten, wurde das Experiment an dieser Stelle abgebrochen, alle Tiere getötet und obduziert. Bei der Obduktion wurde der Primärtumor noch einmal vermessen, danach die ipsilateralen und kontralateralen Lymphknoten (axillar) präpariert und ausgemessen. Abschließend wurde das komplette Interieur mit allen Organen der Ratten visuell auf Auffälligkeiten hin untersucht.

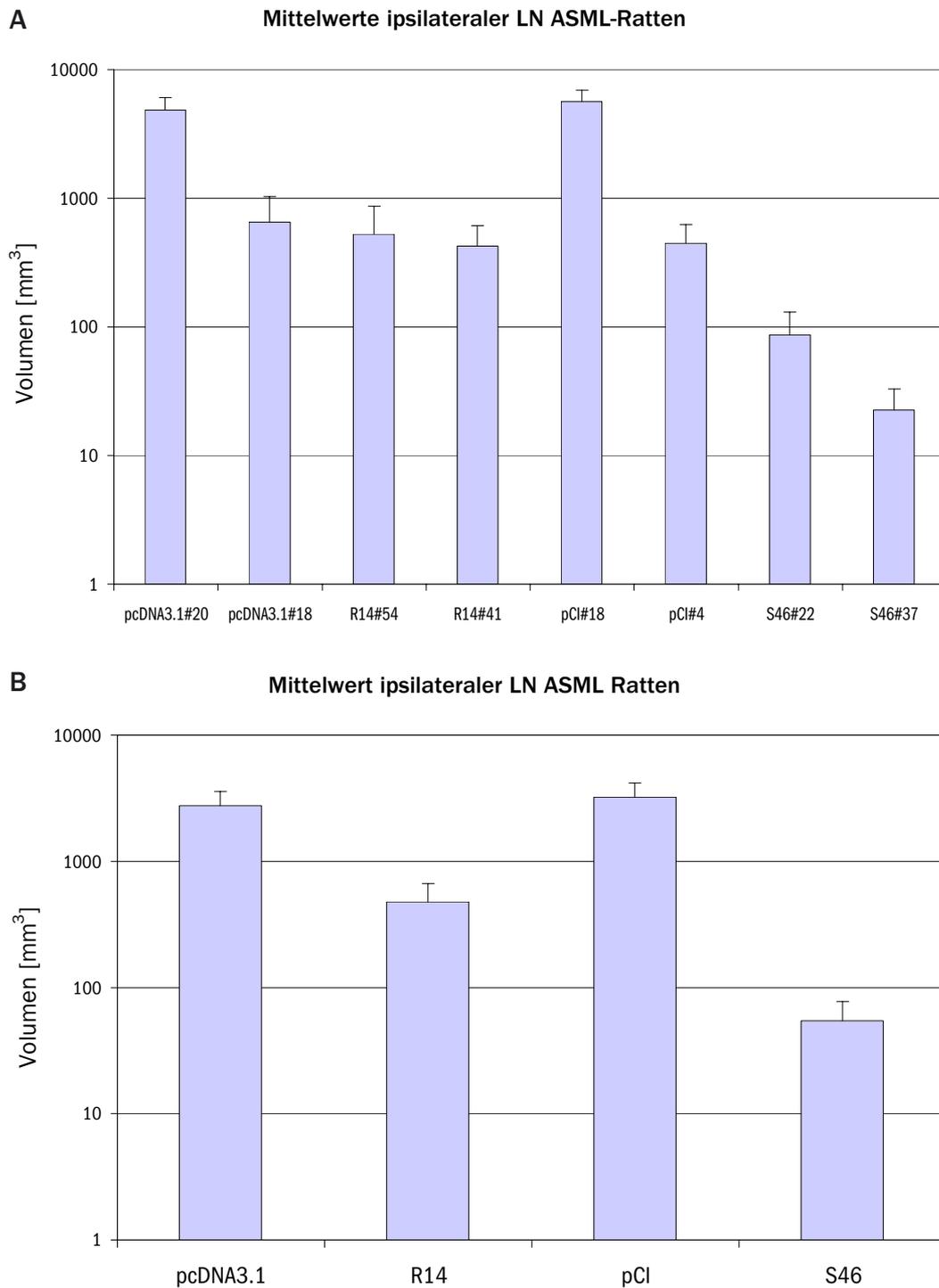
Ein signifikanter Einfluss auf das Wachstum der ASML-Tumore ist bei keinem der stabil transfizierten Konstrukte messbar (Daten nicht dargestellt). Dies bestätigt die in vitro festgestellten Ergebnisse, bei welchen keines dieser dominant negativen Konstrukte einen Einfluss auf die Proliferation zeigte, weder bei transient noch bei den stabil transfizierten ASML-Tumorzellen.

Die Auswertung des metastatischen Phänotyps dieser ASML-Tumore zeigen, dass das metastatische Potential der Tumorzelllinie ASML durch die stabile Expression der dominant negativen (d.n.) Konstrukte R14 und besonders S46 reduziert wird.

Beide Konstrukte sind in der Lage, die Metastasenbildung in den Lymphknoten zu reduzieren und spiegeln damit eine funktionelle Beteiligung von ASAP1 bei der Tumormetastasierung wider (Abb. 3.44)

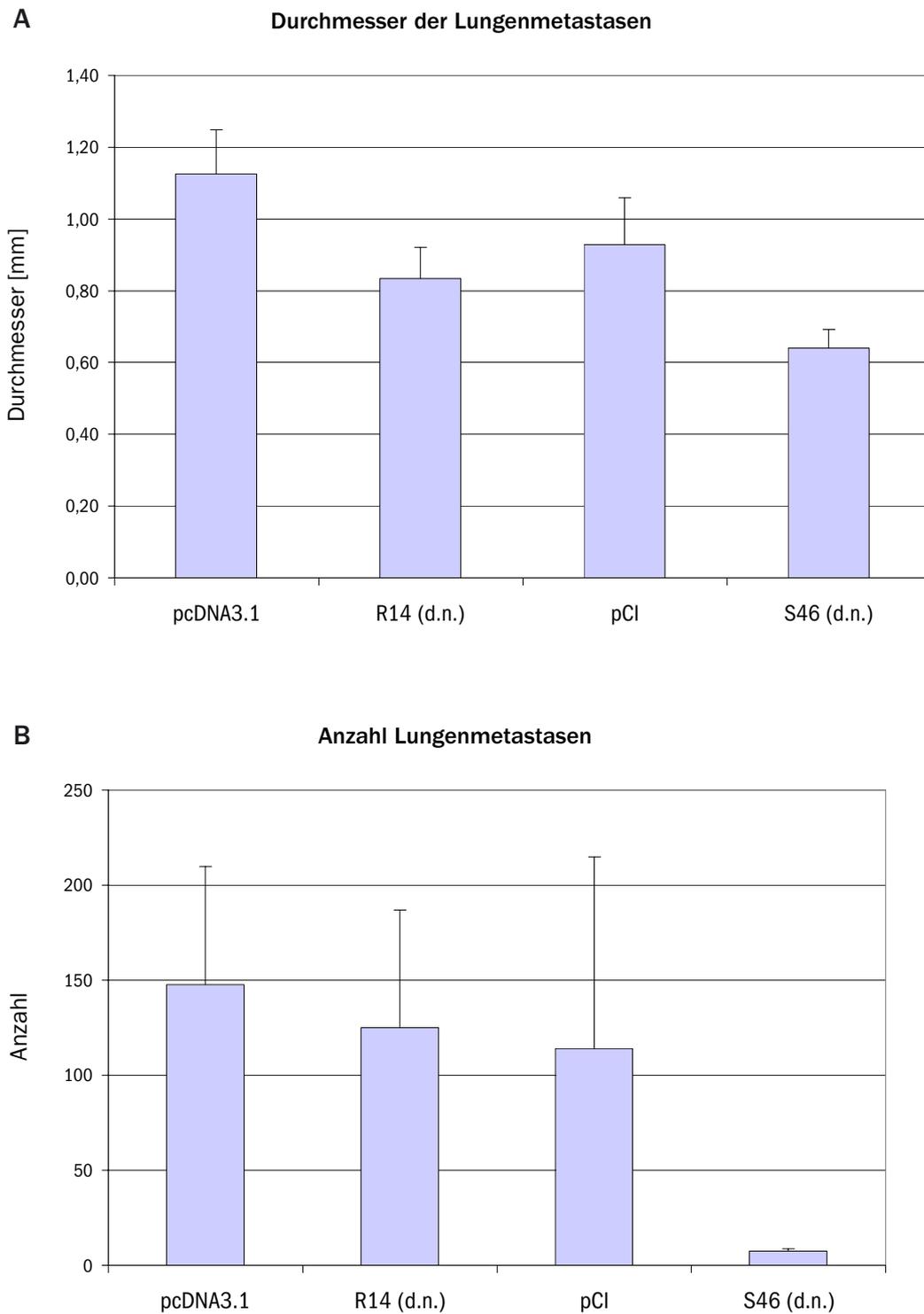
Lungenmetastasen wurden in allen Rattenlungen entdeckt, allerdings variierte die Anzahl und die durchschnittliche Größe der Metastasen (Abb. 3.45)

Da die dominant negativen ASAP1-Konstrukte die Metastasierung reduzieren, folgt im Umkehrschluss, dass ASAP1 die Tumorprogression und die Metastasierung von ASML-Tumoren erhöht.



**Abb. 3.44 Die dominant negativen ASAP1-Konstrukte R14 und S46 reduzieren signifikant die Tumormetastasierung über die Lymphknoten**

Auswertung der Metastasierung über die Lymphknoten der durch stabile ASML-Klone verursachten Tumore. **A:** Mittelwerte der Lymphknotenvolumina aller stabilen Klone. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von je ca. acht Tieren/Klon. **B:** Zusammenfassung aller Ergebnisse bezogen auf die stabil transfizierten unterschiedlichen Konstrukte. Statistischer T-Test zur Feststellung der Signifikanz: pcDNA3.1/R14:  $P=0,007$ . pCI/S46:  $P=0,003$ . Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von je ca. 16 Tieren/Klon. LN: Lymphknoten, P: Wahrscheinlichkeit der zufälligen Größenverteilung Mann-Whittney-Rangsummentest



**Abb. 3.45** Graphische Darstellung der Lungenmetastasen bezogen auf die Größe/Metastase und Anzahl/Lunge.

**A:** Durchmesser der Lungenmetastasen bezogen auf das Konstrukt. **B:** Anzahl der Lungenmetastasen bezogen auf das Konstrukt. Statistik: signifikante Größenabnahme durch R14 im Vergleich mit Leervektor pcDNA31 ( $P=0,03$ ; T-Test), signifikante Größenabnahme bei S46 # 37 im Vergleich mit pCI # 4 ( $P= 0,02$ ).

## 4. Diskussion

### 4.1 Charakterisierung zweier subtraktiver Bibliotheken durch DNA-Mikroarrays

Mit der Entwicklung der Mikroarray-Technologie im Jahre 1992 wurde die biologische Forschung revolutioniert. Von nun an war es möglich für die verschiedensten Fragestellungen komplette Transkriptionsprofile von Zelllinien oder Gewebe zu erstellen und diese zu vergleichen. Dies führte unter anderem in der Krebsforschung zu zahlreichen Veröffentlichungen in welchen Expressionsprofile von Tumorzellen mit Normalgeweben oder metastatische Zelllinien mit nicht metastatischen Zelllinien verglichen werden. In der Regel werden mit diesen Versuchen Dutzende oder gar Hunderte von differentiell exprimierten Genen identifiziert, die dann in langen Listen nach Genklassen oder dem Grad der Expressionsänderung sortiert dargestellt werden. Die so eingesetzte Mikroarray-Technologie vermittelt also ein Gesamtbild von regulierten Genen, welche dann anhand zahlreicher Folgestudien auf ihre Validität hin untersucht werden müssen.

In meiner Arbeit wurde mit der Mikroarray-Technologie ein anderer Weg beschritten. Nicht ein möglichst detailreiches Gesamtbild von differentiell exprimierten Genen, welche eine Assoziation zum metastatischen Phänotyp aufweisen, sollte dargestellt werden, sondern die Zahl von Genen, welche bereits in unterschiedlichen Tumorprogressionssystemen eine Verbindung zur Metastasierung zeigten, sollte auf wenige essentielle und für weitere Studien prädestinierte Gene reduziert werden.

Um dies zu erreichen, wurden die über die SSH-Methode isolierten Gene zweier subtraktiver Bibliotheken (PLSSH, von Stein et al., 1997; MLSSH, Nestl et al., 2001) amplifiziert und auf Glasträger gespottet (siehe „3.1 Ergebnisse“). Die anschließende Hybridisierung mit markierter cDNA aus der nicht metastatischen Zelllinie G und der hochmetastatischen Zelllinie MatLylu, welche beide aus dem Ratten-Prostata-Adenokarzinom System Dunning R3327 stammen, erbrachte das gewünschte Ergebnis. Die ursprünglich 268 differentiell exprimierten Gene aus den beiden subtraktiven Bibliotheken konnten mit Hilfe der von mir durchgeführten Mikroarray-Analyse auf 40 Tumorsystem-übergreifend differentiell exprimierter Gene reduziert werden.

### 4.2 Identifikation Metastasen-assoziiierter Gene

Die Darstellung des Resultates in Tabelle 3.1 zeigt, dass die meisten der aufgelisteten Gene bereits in der Literatur mit einer Beteiligung bei der Tumorprogression oder Metastasierung beschrieben sind. Soz.B. HMGI (high mobility group protein I), welches historisch als nukleares Protein bekannt ist, das Nukleosomen stabilisieren, DNA binden und für die Transkription biegen kann. Das erst kürzlich als Cytokin identifizierte HMG, welches bei Entzündungsreaktionen passiv durch nekrotisches Gewebe oder aktiv durch Makrophagen sezerniert werden kann (siehe Übersichtsartikel Anderson et al., 2002), wurde z.B. auch anhand der SAGE-Technik in humanen Kolontumoren identifiziert (Zhang et al., 1997).

Mit der gleichen Technik wurde Thrombospondin in humanen Pankreastumoren entdeckt (Zhang et al., 1997). Ein Zusammenhang mit der Metastasierung von humanen Brustkrebs und der dabei stattfindenden Adhäsion von Adenokarzinomzellen an

Gefäßendothelzellen wurde ebenfalls für das adhäsive Glykoprotein Thrombospondin herausgefunden (Incardona et al., 1995, 1993; Wang et al. 1996).

Ebenfalls im Zusammenhang mit der Adhäsion von metastasierenden Tumorzellen an Endothelzellen konnte das über Glykosyl-Phosphatidylinositol verankerte Zelloberflächenprotein CD24 gebracht werden (Aigner et al., 1998). Eine niedrige CD24 Expression auf akuten lymphoblastischen Lymphomzellen steht für eine bessere Prognose für den Patienten (Lavabre-Bertrand et al., 1994). Bei früheren Analysen der oben erwähnten subtraktiven Bibliotheken konnte eine hohe Expression von CD24 in menschlichen Kolorektaltumoren und in invasiven humanen Brustkarzinomen festgestellt werden (Nestl et al., 2001). CD24 wurde inzwischen als prognostischer Marker für die Überlebensprognosen von Prostatakrebs-Patienten identifiziert (Kristiansen et al., 2004).

Eine hohe Expression von Caveolin in Assoziation mit Prostata- und Brustkrebs (Yang et al., 1998) zeigt dass auch dieses Protein bereits mit der Tumorprogression in Zusammenhang beschrieben wurde.

Wie bereits in früheren Arbeiten mit der subtraktiven Pankreas-spezifischen Bibliothek aufgelistet (von Stein et al., 1997), sind folgende Proteine in der Literatur bereits als Tumorentwicklungsassoziiert dargestellt: Calcyclin, das eine erhöhte Expression in Zellkarzinomen der oralen Mucosa aufweist (Berta et al., 1997) und in Verbindung mit dem invasiven Phänotyp von humanen Kolorektalen Adenokarzinomen steht (Komatsu et al., 2000). Calgizzarin, das in Assoziation zu kolorektalen Krebs steht (Tanaka et al., 1995); uPa, der Plasminogenaktivator des Urokinasetyps, welcher durch Freisetzung aus Tumorzellen das inaktive Zymogen Plasminogen in die aktive Proteinase Plasmin konvertiert und damit für eine Degradation der extrazellulären Matrix und der Basalmembranen sorgt, was eine Grundvoraussetzung für die Invasion von Tumorzellen ist (Übersichtsartikel von Werb, 1997).

Ein weiteres Mitglied auf der Liste ist Cytokeratin, das als Tumormarker für epitheliale Krebszellen im Knochenmark dient und dessen erhöhte Expression für eine schlechte Prognose von Brustkrebspatienten steht (Braun et al., 2000).

Auch Annexin und Ezrin wurden bereits als Tumorprogressions- und Invasionsassoziiert veröffentlicht (Liu et al., 2003; Martin et al., 2003).

Ein Hauptziel bei der Analyse der beiden subtraktiven Bibliotheken, lag in der Identifikation von noch nicht mit der Tumorprogression oder Metastasierung beschriebenen Genen. Deshalb möchte ich hier nicht weiter die bereits bekannten „Tumorprogressionsgene“ beschreiben, sondern die Aufmerksamkeit auf die nicht geringe Gruppe von Genen lenken, die noch nicht im Zusammenhang mit Tumorprogression bzw. Metastasierung beschrieben oder noch völlig unbekannt sind (novels). Diese Gene stellen die Kandidaten für zukünftige fortführende Untersuchungen dar, um ihre Identität und ihre mögliche funktionelle Rolle bei der Tumorprogression bzw. der Metastasierung aufzuklären. Da diese Gene noch nicht in der Literatur beschrieben sind, wird die Aufklärung ihrer zellulären Funktion und ihrer möglichen funktionellen Beteiligung bei der Tumorentwicklung oder Metastasierung ein wichtiger Schritt zur Aufklärung und zum Verständnis des „metastatischen Programms von Genen“ sein.

Das Ergebnis dieser Arbeit zeigt, dass der experimentelle Ansatz richtig gewählt wurde, ausgehend von der Isolation differentiell exprimierter Gene aus gut charak-

terisierten Tumorprogressionssystemen anhand der SSH-Technik, in Kombination mit verschiedenen Screeningmethoden wie Northern Blot und der weiterführenden Analyse durch die Mikroarray-Technik. Die so identifizierten Gene stellen eine reiche Quelle von Kandidaten für zukünftige Anwendungen in der medizinischen Diagnose und Therapie von humanen Krebs dar.

### **4.3 Charakterisierung des Metastasen-assoziierten Gens ASAP1**

Ein weiterer Teil meiner Arbeit handelt von der Isolation und Charakterisierung eines neuen Metastasen-assoziierten Gens, welches den Namen ASAP1 trägt. Dieses Gen wurde anstelle eines noch unbekanntes Gens (novel) für fortführende Charakterisierungen ausgewählt, da Northern Blot-Analysen und seine schon beschriebenen biologischen Funktionen dafür sprechen, dass es möglicherweise funktionell in die Tumorprogression oder Metastasierung involviert ist. Da ASAP1 in diesem Zusammenhang (Tumorprogression, Metastasierung) noch nicht untersucht wurde, hielt ich es für einen geeigneten Kandidaten für weiterführende Charakterisierungen.

Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse meiner Arbeit unterstützen die Hypothese, dass ASAP1 eine funktionelle Rolle bei der Tumorprogression und Metastasierung spielt.

#### **4.3.1 Assoziation der ASAP1-Expression zum neoplastischen Phänotyp**

Immunhistochemische Analysen zahlreicher menschlicher Tumor-/Normalgewebe, die mit den generierten monoklonalen anti-ASAP1-Antikörpern durchgeführt wurden, konnten eine starke Expression von ASAP1 in einer Vielzahl der getesteten Tumorgewebe zeigen (Tab. 3.5). Die korrespondierenden Normalgewebe zeigten nur sehr schwache ASAP1-Signale.

ASAP1 zeigt also eine Assoziation zum neoplastischen Phänotyp, da aber bei den immunhistologisch untersuchten Tumoren keine Daten über den Metastatisierungsstatus der Patienten zur Verfügung standen, konnte leider keine Validation der ASAP1-Expression bezüglich des metastatischen Potentials der Tumore durchgeführt werden.

#### **4.3.2 Modulationen für die Metastasierung wichtiger Zellfunktionen durch ASAP1**

Durch die in vitro durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von ASAP1 in 1AS-Tumorzellen – im Vergleich zu Leervektor-transfizierten 1AS-Zellen – die Adhäsion zu Fibronectin signifikant erhöht (Abb. 3.28). Es konnte ebenfalls eine durch ASAP1 induzierte Erhöhung der Zellmotilität von 1AS-Tumorzellen nachgewiesen werden (Abb. 3.33).

#### **4.3.3 Beeinflussung des metastatischen Phänotyps durch ASAP1**

Anhand durchgeführter Tierversuche konnte nachgewiesen werden, dass ASAP1 das metastatische Potential von 1AS-Tumorzellen erhöht und damit zu einer Metastasierung dieser Zellen in die Lungen führt (Abb. 3.43, Tabelle 3.7). Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Unterdrückung der ASAP1-Signalgebung durch dominant negative ASAP1-Konstrukte zu einer Verminderung des metastatischen

Potentials von ASML-Tumorzellen führt und damit zu einer signifikanten Reduzierung von Lymphknoten- und Lungenmetastasen sorgte (Abb. 3.44, 3.45).

#### **4.4 Mögliche Mechanismen der Tumorprogression und Metastasierung**

Wie bereits in der Einleitung geschildert, ist ASAP1 ein Multidomänen-Protein, das mit zahlreichen Proteinen interagieren kann. Die unterschiedlichen Signalwege, die durch diese Interaktionen beeinflusst werden, korrelieren mit möglichen Funktionen von ASAP1 bei der Tumorprogression und Metastasierung.

So können Interaktionen von ASAP1 mit den Mitgliedern der Ras-Superfamilie Arf1 (Adenosin-Ribosylation-Factor) und Arf5, Modifikationen des Membranverkehrs, des Actinskeletts und des Phospholipidmetabolismus beeinflussen (Donaldson, 2000; Brown et al., 1998; Furman et al., 2002; Kam et al., 2000; Randazzo et al., 2000).

Die Interaktionen von ASAP1 mit c-Src und Crk, können unter Einbeziehung der Arf-Interaktionen das Zellwachstum, die Zytoskelettorganisation und den Zellmembranaufbau modulieren (Brown et al., 1998).

Die oben genannten Interaktionen, zusammen mit den Funktionen der ebenfalls identifizierten Bindungspartnern FAK (Fokale Adhäsions Kinase) und Pyk2 (Phospho-Tyrosin-Kinase2), die Zelladhäsion, Motilität, Signaltransduktion über Integrine und die Zellstreckung beeinflussen (Liu et al., 2002; Oda et al., 2002; Randazzo et al., 2000) zeigen, dass ASAP1 viele für den Prozess der Metastasierung notwendige Prozesse beeinflussen kann.

Um mögliche Funktionen von ASAP1 bei dem Prozess der Tumorprogression bzw. Metastasierung besser verstehen zu können, ist es nötig, alle Interaktionen, die das ASAP1-Protein in der Zelle ausüben kann, zu ermitteln. Aus diesem Grund war eine interessante Fragestellung bei meiner Arbeit mit ASAP1, ob es möglich ist, weitere Interaktionspartner als die bereits in der Literatur beschriebenen zu identifizieren.

Unter zu Hilfenahme eines SH3-Domain-Arrays konnten vom mir vier ASAP1-Interaktionspartner identifiziert werden (Abb. 3.38). Unter diesen identifizierten Proteinen befanden sich die bereits als ASAP1-Interaktionspartner identifizierten c-Src und die Src-like-Kinase (Brown et al., 1998), was für die Zuverlässigkeit der erzielten Ergebnisse spricht. Des weiteren wurde das in den Vesikeltransport involvierte Cortactin und das Oncogenhomolog Yes1 identifiziert.

Wie tragen diese Erkenntnisse nun zum besseren Verständnis möglicher ASAP1 Funktionen bei der Krebsentwicklung und Metastasierung bei? Eine erst kürzlich erschienene Veröffentlichung (Kowanetz et al., 2004) hilft, alle bisher ermittelten Interaktionspartner von ASAP1 zu einem Netzwerk von Signalwegen zu verbinden.

So wurde in dieser Veröffentlichung gezeigt, dass das Multidomänen-Adapterprotein CIN85 anhand der Bindung zu zahlreichen Proteinen, den EGF-Rezeptor-Verkehr (EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor = RezeptorTyrosinkinase) über die endozytotischen und Recycling-Pfade steuern kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von ASAP1 zu einer erhöhten Recyclingrate der EGF-Rezeptoren führt. Wie sich an dem bekannten Beispiel v-erb zeigt, das eine verkürzte Version des c-erbB-Gens ist, welches für den EGF-Rezeptor kodiert und durch diese Deletionen und der damit verbundenen konstitutiven Aktivität des Rezeptors seine

onkogene Wirkung entfaltet, können Manipulationen an Rezeptortyrosinkinasen zu Krebs führen (siehe Übersichtsartikel: Bishop, 1985).

Die Bindung von ASAP1 an CIN85 ist unabhängig von einer Ligandenstimulierung und die Funktion von ASAP1 nach der Bindung ist unabhängig von dem ASAP1-Phosphorylierungsstatus.

Ausschlaggebend für die Recycling-Funktion ist die ArfGAP-Domäne in ASAP1, welche das Arf-gebundene GTP hydrolysiert. In dieser Hinsicht ist die von mir isolierte neue ASAP1-Splicevariante von Bedeutung, da sie durch den Verlust des Tyrosin 308 konstitutiv aktiv ist und damit das Recycling der EGF-Rezeptoren beeinflussen kann.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass CIN85 über seine Prolin-reiche Region ebenfalls SH3-Domänen-Proteine binden kann und damit Verbindung zu wichtigen Signalwegen aufbaut. Unter diesen SH3-Domänen-Proteinen befinden sich Interaktionspartner von ASAP1 z.B. Cortactin (Zytoskeletumbau), Src, Yes und die Src-like Kinase Fyn (Regulation der Src Familien Kinasen). Da die Affinität zwischen SH3-Domänen und PxxxPr-Domänen schwach ist, ist die Bindung zu CIN85 konzentrationsabhängig.

Diese Fakten laden zu der Spekulation ein, dass die Überexpression von ASAP1 in Tumorzellen zu einer verstärkten Bindung an CIN85 führt, wodurch der EGF-Rezeptor-Verkehr moduliert wird und die unterschiedlichen Signalwege durch die Interaktionen mit den assoziierten ASAP1-Bindungsproteinen manipuliert werden, was möglicherweise die Tumorprogression und die Metastasierung unterstützt.

Über die genauen Mechanismen der ASAP1-Beteiligung an der Tumorprogression und der Metastasierung kann an dieser Stelle nur spekuliert werden, da längst nicht alle Interaktionen von ASAP1 in der Zelle bekannt sind. Ebenso sind der Phosphorylierungsstatus von ASAP1 und die dazugehörigen funktionellen Auswirkungen noch nicht komplett aufgeklärt. Dies herauszufinden wird die Aufgabe zukünftiger Forschungen sein.

Wie im Folgendem aufgelistet, wurden die Ziele meiner Arbeit erreicht:

1. Es wurden Tumorsystem-übergreifende Metastasen-assoziierte Gene identifiziert. Dabei wurde die Anzahl von 268 differentiell exprimierten SSH-Genen auf 40, für den Prozess der Metastasierung essentielle Gene reduziert.
2. Es wurde drei Spleißvarianten des Metastasen-assoziierten Gens ASAP1 isoliert. Dies führte zur Identifikation der kleinsten, konstitutiv aktiven ASAP1-Variante, die bis jetzt noch nicht in der Literatur beschrieben wurde.
3. Es wurde eine funktionellen Beteiligung von ASAP1 bei der Tumorprogression und der Metastasierung nachgewiesen. Da ASAP1 noch nicht in diesem Zusammenhang in der Literatur erwähnt wurde, konnte somit ein neuer Tumormarker identifiziert werden, der für die Diagnose menschlichen Krebses eingesetzt werden kann und somit möglicherweise ein Ziel zukünftiger therapeutischer Interventionen darstellt.



## 5. Literaturverzeichnis

**Ahmad, A.** and **Hart, I. R.** (1996). Biology of tumor micrometastasis. *J. Hematotherapy*, 5: 525-535.

**Aigner, S.**, Ramos, C. L., Hafezi-Moghadam, A., Lawrence, M. B., Friederichs, J., Altevogt, P. and Ley, K., (1998). CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *FASEB J.*, 12: 1241-1251.

**Andersson, U.**, Erlandsson-Harris, H., Yang, H., Tracey, K. J. (2002). HMGB1 as a DNA-binding cytokine. *J Leukoc Biol. Dec*; 72 (6): 1084-1091.

**Beck, K.**, Hunter, I. and Engel, J. (1990). Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB*, 4: 148-160.

**Behrens, J.** (1993). The role of cell adhesion molecules in cancer invasion and metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.*, 24: 175-184.

**Berta, G.N.**, Ghezzi, F., D'Avolio, A., Zulian, P., Carbone, V., Racca, S., Vercellino, V., Di Carlo, F. (1997). Enhancement of cdcyclin gene RNA expression in squamous cell carcinoma of the oral mucosa, but not in benign lesions. *J. Oral. Pathol. Med.* 26, 206-210.

**Birchmeier, W.**, and **Birchmeier, C.** (1995) Epithelial-mesenchymal transitions in development and tumor progression. *Exs* 74, 1-15.

**Bishop, J. M.**, (1985). Viral Oncogenes. *Cell* 42, 23-38.

**Block, N. L.**, Canazzi, F., Deneffio, J., Troner, M., Claflin, A., (1977). Chemotherapy of the transplantable adenocarcinoma (R3327) of the Copenhagen rat. *Oncology* 34, 110-113

**Braun, S.**, Pantel, K., Müller, P., Janni, W., Hepp, F., Kentenich, C. R. M., Gastroph, S., Wischnik, A., Dimpfl, T., Kindermann, G., Riethmüller, G., and Schlimok, G., (2000). Cytokeratin-Positive Cells in the Bone Marrow and Survival of Patients with Stage I, II, or III Breast Cancer. *NEJM*, Feb; 342 (8), 525-533.

**Brooks, P. C.**, Stromblad, S., Sanders, L. C., von Schalacha, T. L., Aimes, R. T., Stetler-Stevenson, W. G., Quigley, J. P. and Cheresch, D. A. (1996). Localisation of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin  $\alpha_5\beta_3$ . *Cell*, 85: 683-693.

**Brown, M. T.**, Andrade, J., Radhakrishna, H., Donaldson, J.G., Cooper, J.A., and Randazzo, P.A. (1998). ASAP-1 A phospholipid-dependent Arf GTPase-activating protein that associates and is phosphorylated by Src. *Mol. Cell. Biol.* 18, 7038-7051.

**Cepek, K. L.**, Shaw, S. K., Parker, C. M., Russel, G. J., Morrow, J. S., Rimm, D. L., Brenner, M. B., (1994). Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the  $\alpha_5\beta_1$  integrin. *Nature*. Nov 10;372(6502):190-3

**Claffey, K. P.** and Robinson, G. S. (1996). Regulation of VEGF/VEP expression in tumor cells: consequences for tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, 15: 165-176.

**Clafin, A.,** McKinney, E., Fletcher, M. (1977). The Dunning R3327 prostata adenocarcinoma in the Fisher-Copenhagen F1 Rat: A useful model for immunological studies. *Oncology* 34, 105-109.

**Crockett-Torabi, E.** and Fantone, J. C. (1995). The selectins: insights into selectin-induced intracellular signaling in leukocytes. *Immunol. Res.*, 14: 237-251.

**Danen, E. H.,** van Muijen, G. N., ten Berge, P. J and Ruiten, D. J. (1993). Integrins and melanoma progression. *Recent Results Cancer Res.*, 128: 119-132.

**DeClerck, Y. A.** and Laug, W. E. (1996). Cooperation between matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin system in tumor progression. *Enzyme Protein*, 49: 72-84.

**DeRisi, J. L.,** Iyer, V. R., and Brown, P. O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680-686

**Diatchenko, L.,** Lau, Y. F., Campbell, A. P, Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. and Siebert, P. D., (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6025-6030

**Donaldson, J. G.,** (2000). Filling the GAPs in the ADP-ribosylation factor story. *Proc Natl Acad Sci USA*. Apr 11; 97(8): 3792-3794.

**Duffy, M. J.** (1987). Do proteases play a role in cancer invasion and metastasis? *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 23: 583-589.

**Duffy, M. J.** (1992). The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Clin. Expt. Met.*, 10: 145-155.

**Duffy, M. J.** (1993). Urokinase plasminogen activator and malignancy. *Fibrinolysis*, 7: 295-302.

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

**Fidler, C. A.** and Radinski, R. (1990). Genetic control of cancer metastasis. *J. Natl. Cancer. Inst.* 82, 166-168.

**Fidler, I. J.** (1978). Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 38, 2651-2660

**Fidler, I. J.,** (1995). Cancer biology: invasion and metastasis. In: Abeloff M.D., Armitage, J.O., Lichter, A.S., Niederhuber, J.E. (eds) *Clinical oncology*. Churchill livingstone, New York. 55-76.

**Folkman, J.** (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.*, 82:4-6.

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

**Folkman, J., Watson, K., Ingber, D. and Hanahan, D.** (1989). Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature*, 339: 58-61.

**Frixen, U. H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Lochner, D. and Birchmeier, W.** (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol.*, 113: 173-185.

**Furman, C., Short, S. M., Subramanian, R. R., Zetter, B. R., Roberts, T. M.,** (2001). DEF-1/ASAP1 is a GTPase-activating protein (GAP) for ARF1 that enhances cell motility through a GAP-dependent mechanism. *J Biol Chem.* Mar 8; 277(10). 7962-7969.

**Giroldi, L. A., Bringuier, P P and Schalken, J. A.** (1994). Defective E-cadherin function in urological cancers-clinical implications and molecular mechanisms. *Invasion and Metastasis*, 14: 71-81.

**Harlow und Lane**, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1998

**Hart, I. J., Goode, N. T. and Wilson, R. E.** (1989). Molecular aspects of the metastatic cascade. *Biochem. Biophys. Acta.*, 989: 65-84.

**Hazan, R. B., Kang, L., Whooley, B. P and Borgen, P I.** (1997). N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes. Commun.*, 4(6): 399-411.

**Hazan, R. B., Phillips, G. R., Qiao, R. F., Norton, L. and Aaronson, S. A.** (2000). Exogenous Expression of N-Cadherin in Breast Cancer Cells Induced Cell Migration, Invasion, and Metastasis, *J. Cell Biol.*, 148, 779-790.

**Hedge, P., Qi, R., Gaspard, R., Abernathy, K., Dharap, S., Earl-Hughes, J., Gay, C., Nwokekeh, N. U., Chen, T., Saeed, A.I., Sharov, V., Lee, N.H., Yeatman, T. J. and Quackenbush, J.** (2001). Identification of tumor markers in models of human colorectal cancer using a 19200-element complementary DNA microarray. *Cancer res.* 61, 7792-7797.

**Hynes, R. O.** (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69: 11-25.

**Ichikawa, T., Ichikawa, Y., Dong, J., Hawkins, A. L., Griffin, C. A., Isaacs, W. B., Oshimura, M., Barrett, J. C. and Isaacs, J. T.** (1992). Localization of metastasis suppressor gene(s) for prostatic cancer to the Short arm of human chromosome 11, *Cancer Res.* 52, 3486-3490.

- Incardona, F., Calvo, F., Fauvel-Lafeve, F., Legrand, Y., Legrans, C. (1993).** Involvement of thrombospondin in the adherence of human breast-adenocarcinoma cells: a possible role in the metastatic process. *Int J Cancer*, Sep.; 55 (3): 471-477.
- Incardona, F., Lewalle, J. M., Morandi, V., Lambert, S., Legrand, Y., Foidart, J. M. and Legrand, C. (1995).** Thrombospondin modulates human adenocarcinoma cell adhesion to human vascular endothelial cells. *Cancer Research*; 55 (1), 166-173
- Isaacs, J. T., Coffey, D.S.(1981).** Adaptation versus selection as the mechanism responsible for the relapse of prostatic cancer to androgen ablation therapy as studied in the Dunning R-3327-H adenocarcinoma. *Cancer Res.* 41, 5070-5075.
- Isaacs, J. T., Heston, W. D., Weissman, R., Coffey, D. S. (1978).** Animal models of the hormone-sensitive and -insensitive prostatic adenocarcinomas, Dunning R-3327-H, R-3327-HI, and R-3327-AT. *Cancer Res.* 38, 4353-5359.
- Isaacs, J. T., Wake, N., Coffey, D. S.(1981).** The characterization of a newly identified, highly metastatic variant of the Dunning R-3327 rat prostatic adenocarcinoma system: The MatLyLu tumor. *Invest Urol* 19, 20-23.
- Isaacs, J. T., Isaacs, W. B., Feitz, W. F. & Scheres, J. (1986).** Establishment and characterization of seven Dunning rat prostatic cancer cell lines and their use in developing methods for predicting metastatic abilities of prostatic cancers. *Prostate* 9, 261-281
- Jackson, T. R., Kearns, B. G., Theibert, A. B. (2000)** Cytohesins and centaurins: mediators of PI 3-kinase-regulated Arf signaling. *TIBS* 25 489-495
- Jalkanen, S., Jalkanen, M., Bargatze, R., Tammi M., Butcher E. C. (1988).** Biochemical properties of glycoproteins involved in lymphocyte recognition of high endothelial venules in man. *J Immunbiol.* 141, 1615-1623
- Johnson, J. P. (1991).** Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev.*, 10: 11-22.
- Jothy, S., Munro, S. B., LeDuy, L., McClure, D. and Blaschuk, O. (1995).** Adhesion or antiadhesion in cancer: What matters more? *Cancer Metast Rev.*, 14: 363-376.
- Jouanneau, J., Tucker, G. C., Boyer, B., Valles, A. M. and Thiery, J. P. (1991).** Epithelial cell plasticity in neoplasia. *Cancer Cells*, 3: 525-529.
- Kam, J. L., Miura, K., Jackson, T. R., Gruschus, J., Roller, P., Stauffer, S., Clark, J., Aneja, R., Randazzo, P. A., (2000).** Phosphoinositide-dependent activation of the ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein ASAP1. Evidence for the pleckstrin homology domain functioning as an allosteric site. *J Biol Chem.* Mar 31; 275 (13): 9653-9663.

**Kamatsu, K.**, Andoh, A., ishiguro, S., Suzuki, N., Hunai, H., Kobune-Fujiwara, Y., Kameyama, M., Miyoshi, J., Akedo, H., and Nakamura, H., (2000). Increased Expression of S100A6 (Calcyclin), a Calcium-binding Protein of the S100 Family, in Human Colorectal Adenocarcinomas. *Clinical Cancer Research* 6; jan., 172-177.

**Kantor, J. D.** and Zetter, B. R. (1996). Cell motility in breast cancer. *Cancer Treat. Res.*, 83: 303323

**King, F. J.**, Hu, E., Harris, D. F., Sarraf, P., Spiegelmann, B. M., and Roberts, T. M. (1998), DEF-1, a novel Src SH3 binding protein that promotes adipogenesis in fibroblastic cell lines. *Mole. and Cell. Biol.* 19, 2330-2337.

**Kirchheimer, J. C.**, Wojta, J., Christ, G. and Binder, B. R. (1989). Functional inhibition of endogenously produced urokinase decreases cell proliferation in a human melanoma cell line. *PNAS USA.*, 86: 5424-5428.

**Knierim, M.**, Paweletz, N. and Finze, E.-M. (1986a) Tumor related reconstitutive vascularisation. An ultrastructural study. *Anticancer. Res.* 1305-1316.

**Knierim, M.**, Paku, S., Paweletz, N. and Spieß, E.(1986b). Ultrastructural studies on the lung colonization by nonmetastatic ret tumor cells. *Anticancer. Res.* 6, 669-682.

**Kondo, A.**, Hashimoto, S., Yano, H., Nagayama, K., Mazaki, Y., Sabe, H. (2000). A New Paxillin-binding Protein, PAG3/Papa/KIAA0400, Bearing ADP-Ribosylation Factor GTPase-activating Protein Activity, Is Involved in Paxillin Recruitment to Focal Adhesions and Cell Migration. *Mol Biol Cell.* Apr 1; 11(4): 1315-1327.

**Kowanetz, K.**, Husnjak, K., Höller, D., Kowanetz, M., Soubeyran, P, Hirsch, D., Schmidt, M. H. H., Pavelic, K., Camilli, P D., Randazzo, P.A., and Dikic, I. (2004) CIN85 Associates with multiple Effectors Controlling Intracellular Trafficking of Epidermal Growth Factors Receptors. *M.B.C.*, Vol 15, 3155-3166

**Kristiansen, G.**, Pilarsky, C., Wissmann, C., Kaiser, S., Brummendorf, T., Roepke, S., Dahl, E., Hinzmann, B., Specht, T., Pervan, J., Stephan, C., Loening, S., Dietel, M., Rosenthal, K. (2004). Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. *J Path* Nov 8

**Kruljac-Letunic, A.**, Moelleken, J., Kallin, A., Wieland, F. and blaukat, A., (2003). The Tyrosine Kinase Pyk2 Regulates Arf1 Activity by Phosphorylation and Inhibition of the Arf-GTPase-activating Protein ASAP1. *J Biol Chem.*, Aug 8; 278(32), 29560-29570.

**Lavabre-Bertrand, T.**, Dupperay, C., Brunet, C., Poncelet, P, Exbrayat, C., Bourquard, P, Lavabre-Bertrand, C., Brochier, J., Navarro, M., and Janossy, G., (1994). Quantification of CD24 and CD45 antigens in parallel allows a precise determination of B-cell maturation stages: relevance for the study of B-cell neoplasias. *Leikemia* 8(Baltimore), 8: 402-408.

**Lazan, D.,** Hetson, W. D., Kadman, D., Fair, W. (1982). Inhibition of the R3327 MAT-Lu prostatic tumor by diethylstilbestrol and 1,2-bis(3,5-dioxopiperazin-1-yl)propane. *Cancer Res.* 42, 1390-1394.

**Levine, M. D.,** Liotta, L. A. and Stracke, M. L. (1995). Stimulation and regulation of tumor cell motility in invasion and metastasis. *EXS.*, 74: 157-179.

**Liotta, L. A. & Stetler-Stevenson, W.G.**(1991). Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 51, 5054s-5059s

**Liotta, L. A.,** Steeg, P.S. & Stetler-Stevenson, W.G. (1991). Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64, 327-336

**Liu, Y.,** Loijens, J. C., Martin, K. H., Karginov, A. V., Parsons, J. T., (2002). The Association of ASAP1, an ADP Ribosylation Factor GTPase-Activating Protein, with Focal Adhesion Kinase Contributes to the Process of Focal Adhesion Assembly. *Mol Biol Cell.* Jun 1; 13 (6): 2147-2156.

**Liu, Y.,** Wang, H. X., Lu, N., Mao, Y. S., Liu, F., Wang, Y., Zhang, H. R., Wang, K., Wu, M., Zhao, X. H., (2003). Translocation of annexin I from cellular membrane to the nuclear membrane in human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol.* Apr; 9 (4): 645-649.

**Martin, T. A.,** Harrison, G., Mansel, R. E., Jiang, W. G., (2003). The role of CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Crit Oncol Hematol*, May; 46 (2): 165-186.

**Matsuura, K.,** Kawanishi, J., Fujii, S., Imamura, M., Hirano, S., Takeichi, M. and Nitsu, Y. (1992). Altered expression of E-cadherin in gastric cancer tissues and carcinoma-tous fluid. *Br. J. Cancer*, 66: 1122-1130.

**Matzku, S.,** Komitowski, D., Mildenerger, M. & Zoller, M. (1983). Characterization of BSp73, a spontaneous rat tumor and its in vivo selected variants showing different metastasizing capacities. *Invasion Metastasis* 3, 109-123

**Nagata, M.,** Fujita, H., Ida, H., Hoshina, H., Inoue, T., Seki, Y., Ohnishi, T., Shingaki, S., Kaji, M., Saku, T., Takagi, R. (2003) Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral cell carcinoma by microarray analysis. *International journal of Cancer*, Vol.106, Issue 5 P.683-689

**Neri, A.,** Welch, D., Kawaguchi, T. & Nicolson, G. (1982). Development and Biologic Properties of Malignant Cell Sublines and Clones of a Spontaneously Metastasizing Rat Mammary Adenocarcinoma. *JNCI*, Vo. 68, No. 3, 507-517

**Neri, A. & Nicolson, G. L.** (1981b). Phenotypic drift of metastatic and cell-surface properties of mammary adenocarcinoma cell clones during growth in vitro. *Int J Cancer* 28, 731-738

**Neri, A.,** Ruoslahti, E. & Nicolson, G. L. (1981a). Distribution of fibronectin on clonal cell lines of a rat mammary adenocarcinoma growing in vitro and in vivo at primary and metastatic sites. *Cancer Res* 41, 5082-5095

**Nestl, A.**, von Stein, O. D., Zatloukal, K., Thies, W. G. Herrlich, P., Hofmann, M., and Sleeman, J. P. (2001). Gene expression patterns associated with the metastatic phenotype in rodent and human tumors. *Cancer res.* 61, 1569-1577

**Niebuhr et al.** Cell Biology: A Laboratory Handbook, Second Edition. Vol.2, 1998, Academic Press

**Nishizuka, I.**, Ishikawa, T, Hamagucchi, Y., Kamiyama, M., Ichikawa, Y., Kadota, K., Miki, R., Tomaru, Y., Mizuno, Y., Yano, R., Nitanda, H. Togo, S., Okazaki, Y., Hayashizaki, Y., Shimada, H. (2002). Analysis of gene expression involved in brain metastasis from breast cancer cDNA microarray. *Breast cancer* 9(1): 26-32

**Norrby, K.** (1997). Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *APMIS*, 105: 417-437.

**North, S. M.** & Nicolson, G.L. (1985). Effect of host immune status on the spontaneous metastasis of cloned cell lines of the 13762NF rat mammary adenocarcinoma. *Br J Cancer* 52, 747-755

**Oda, A.**, Wada, I., Miura, K., Okawa, K., Kadoya, T., Kato, T., Nishihara, H., Maeda, M., Tanaka, S., Nagashima, K., Nishitani, C., Matsuno, K., Ishino, M., Machesky, L. M., Fujita, H. and Randazzo, P. (2003). CrkL Directs ASAP1 to Peripheral Focal Adhesions. *J Biol Chem.*, Feb 21; 278(8), 6456-6460.

**Padera, T. P.**, Kadambi, A., di Tomaso, E., Carreira, C. M., Brown, E. B., Boucher, Y., (2002). Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*; 296:1883–1886.

**Paku, S.**, Werling, H.-O., Aulenbacher, A., Paweletz, N. and Spiess, E. (1986). Invasive activities of metastasizing and non-metastasizing tumor cell variants in vitro . II Studies on confrontations with aorta, vein, ductus thoracicus, diaphragm, and ling. *Anticancer. Res.* 6, 17-26.

**Paweletz, N.** Werling, H. O., Aulenbacher, P, Spiess, E. (1982). Morphological and behavioral characteristics of two ret tumor cell lines with different metastatic capacities. *Scan Electron Microsc.* 2, 783-792.

**Paweletz, N.**, Paku, S., Werling, H.O. and Spiess, E. (1986). Experimental approaches to problems of invasion and metastasis. *Anticancer. Res.* 6, 119-128.

**Pignatelli, M.** and Vessey, C. J. (1994). Adhesion molecules: novel molecular tools in tumor pathology. *Hum. Pathol.*, 25: 849-856.

**Ponta, H.** & Herrlich, P. (1998). The CD44 protein family: Roles in embryogenesis and tumor Progression *Frontiers in Bioscience* 3, 650-656

**Price, J. T.**, Bonovich, M. T. & Kohn, E. C. (1997). The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rei, Biochem Mol Biol* 32, 175-253

**Randazzo, P. A.**, Andrade, J., Miura, K., Brown, M. T., Long, Y. Q., Stauffer, S., Roller, P., Cooper, J. A., (2000). The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA*. Apr 11; 97(8): 4011-4016.

**Raz, A.**, Zöller, M. and Ben-Ze'ev, A. (1986). Cell configuration and adhesive properties of metastasizing and non-metastasizing Bsp73 rat adenocarcinoma cells. *Exp. Cell. Res.* 167, 127-141.

**Rudy, W.**, Hofmann, M., Schwartz-Albiez, R., Zöller, M., Heider, K.-H., Ponta, H. and Herrlich, P. (1993). The two major CD44 proteins expressed on a metastatic rat Tumor cell line are derived from different splice variants: each one individually suffices to confer metastatic behaviour. *Cancer Res.*, 53: 1262-1268.

**Schmitz, A. A.**, Govek, E. E., Bottner, B., and Van Aelst, L. (2000). Rho GTPases: signaling, migration and invasion. *Exp Cell Res* 261, 1-12.

**Schwarz, L. C.**, Gingras, M. C. and Goldberg, G. (1988). Loss of growth factor and conversion of transforming growth factor-B1 inhibition to Stimulation in metastatic H-ras-transformed murine fibroblasts. *Cancer Res.*, 48: 6999.

**Segaloff, A.** (1966) Hormones and breast cancer. *Recent Prog. Horm. R.*, 22:351-379

**Senger, D. R.**, Van de Water, L., Brown, L. F., Nagy, J. A., Yeo, K. T., Yeo, T. K., Berse, B., Jackman, R. W., Dvorak, A. M. and Dvorak, H. F. (1993). Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev.*, 12: 303-324.

**Shimizu, Y.** and Shaw, S. (1993). Mucins in the mainstream. *Nature*, 336: 630-631.

**Shiozaki, H.**, Oka, H., Inoue, M., Tamura, S. and Monden, M. (1996). E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer*, 77: 1605-1613.

**Shweiki, D.**, Itin, A., Soffer, D., Keshet, E. (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359, 843-5

**Sleeman J. P.** (2000). The lymph nodes as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Recent Results in Cancer Research* 157, 55-8 1

**Smolev, J. K.**, Heston, W.D., Scott, W. W., Coffey, D. S., (1977). Characterization of the Dunning R3327H prostatic adenocarcinoma: an appropriate animal model for prostatic cancer. *Cancer Treat Rep.* 1977 Mar-Apr;61(2):273-87

**Springer, T. A.** and Lasky, L. A. (1991). Cell adhesion. Sticky sugars for selectins. *Nature*, 349: 196-197.

**Tanaka, M.**, Adzuma, K., Iwami, M., Yoshimoto, K., Monden, Y., and Itakura, M., (1995). Human calgizzarin, one colorectal cancer-related gene selected by a large scale random cDNA sequencing and Northern blot analysis. *Cancer Lett.*, 89:195-200.

**Testa, J. E.** and Quigley, J. P. (1990). The role of uPA in aggressive tumor cell behaviour. *Cancer Metastasis Rev.*, 9: 353-367.

**Tlsty, T. D.** (1998). Cell-adhesion-dependent influences on genomic instability and carcinogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 10, 647-653

**van Roy, F. V.** and Mareel, M. (1992). Tumor invasion: effects on cell adhesion and motility. *Trends Cell. Biol.*, 2:163-169.

**von Stein, O. D.**, Novel genes involved in metastasis. Dissertation (1998)

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

**Wang, T. N.**, Qian, X. H., Granick, M. S., Solomon, M. P., Rothman, V. L., Berger, D. H., Tuszynski, G. P. (1996). Thrombospondin-1 (TSP-1) Promotes the Invasive Properties of Human Cancer. *J of Sur: Res.*, June, 63 (1) 39-43.

**Werb, Z.**, (1997). ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91, 439-442.

**Werling, H.-O.**, Spiess, E., Aulenbacher, N. and Paweletz, N. (1985). Adhesion and spreading characterization of a rat tumor cell system exhibiting different metastatic behavior. *Invasion. Met.* 5, 270-294..

**Yang, X.**, Wei, L. L., Tang, C., Slack, R., Mueller, S., Lippman, M. E. (2001). Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells. *Cancer Res*;61:5284–5288.

**Yang, G.**, Truong, L. D., Timme, T. L., Ren, C., Wheeler, T. M., Park, S. H., Nasu, Y., Bangma, C. H., Kattan, M. W., Scardino, P.T., and Thompson, T. C. (1998). Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 4: 1873-1880.

**Zetter, B. R.** (1993). Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin. Cancer Biol.*, 4: 219-229.

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



## Abbildungen und Tabellen

Abbildungen	Seite
Abb. 1.1 Ein genetisches Modell für die schrittweise klonale Tumorgenese	2
Abb. 1.2 Die einzelnen Schritte der metastatischen Kaskade.	3
Abb. 1.3 Relative in vivo Wachstumsrate von drei isogenen pankreatischen Adenokarzinom-Zelllinien	11
Abb. 1.4 Zusammenfassung der Entwicklung der Dunning Tumorsublinien.	13
Abb. 1.5 Zwei Ratten-Tumorprogressionssysteme.	14
Abb. 1.6 Numerische Verteilung differentiell exprimierter Gene in beiden subtraktiven Bibliotheken.	15
Abb. 1.7 Proteindomänen von ASAP1.	17
Abb.3.1 Design des DNA-Mikroarrays.	46
Abb.3.2 Exemplarisches Agarosegel mit den PCR-Produkten.	46
Abb. 3.3 Hybridisierter DNA-Mikroarray zur Veranschaulichung des Designs.	47
Abb. 3.4 Drei unterschiedliche Rattentumorprogressionssysteme.	48
Abb. 3.5 Northern Blot Analyse von ASAP1 auf zwei Rattentumorprogressionsmodellen.	51
Abb. 3.6 Agarosegel mit PCR-Produkt des menschlichen ASAP1-Fragmentes.	52
Abb. 3.7 ASAP1 Expressionsstudien auf cDNA-Array.	53
Abb. 3.8 ASAP1 Expression in menschlichen Tumorgeweben (RNA-FISH).	56
Abb. 3.9 Coomassie gefärbtes Proteingel (SDS-PAGE) mit ASAP1-GST-Fusionsprotein	57
Abb. 3.10 ELISA-Platten mit Farbreaktionen, welche die Erkennung des Antigens durch die primären Antikörper visualisieren.	58
Abb. 3.11 Monoklonale anti-ASAP1-Antikörper auf Strip Blots.	59
Abb. 3.12 Strip Blots mit ASAP1 Signal in menschlichen Kolonkarzinomzelllinien.	60
Abb. 3.13 anti-ASAP1 auf ASML Stip Blot.	60
Abb. 3.14 anti-ASAP1 auf Western Blot.	61
Abb. 3.15 Immunpräzipitation von ASAP1-Protein aus ASML-Zellen mit den anti-ASAP1-Antikörper 7B12.	62
Abb. 3.16 Semiquantitative PCR-Amplifikation von ASAP1 in humanen Kolonkarzinomzellen.	63
Abb. 3.17 Cytoplasmatische Lokalisation von ASAP1-Protein in humanen Kolonkarzinomzellen.	64
Abb. 3.18 Monoklonale anti-ASAP1-Antikörper zeigen immunhistologisch eine hohe Expression von ASAP1 in humanen SW1116-Tumorzellen an.	65
Abb. 3.19 Monoklonale anti-ASAP1-Antikörper färben immunhistologisch ASML-Tumorzellen an.	66
Abb. 3.20 Immunohistochemische Färbung von menschlichen Tumor-/Normalgewebeparaffinschnitten mit monoklonalen anti-ASAP1-Antikörpern.	69
Abb. 3.21 Schematische Darstellung der 5' RACE Technik.	71
Abb. 3.22 Graphische Darstellung der drei isolierten rASAP1-Spleißvarianten.	73
Abb. 3.23 Proteinsequenzen der Spleißregionen (alternative Exons).	73
Abb. 3.24 Western Blot zur Kontrolle der transienten Expression von rASAP1 in 1AS-Tumorzellen.	75
Abb. 3.25 Transfektionseffizienz	76
Abb.3.26 Adhäsion von transient mit rASAP1 transfizierten 1AS-Rattentumorzellen auf unterschiedlichen Komponenten der extrazellulären Matrix.	77
Abb.3.27 Western Blot Analyse der transient transfizierten 1AS-Zellen.	78
Abb. 3.28 Erhöhte Expression von ASAP1 erhöht die Adhäsion auf Fibronektin.	78
Abb. 3.29 Western Blot zur Kontrolle der transienten Expression der ASAP1 Konstrukte in 1AS-Tumorzellen.	79

Abb. 3.30 Einfluss der transient transfizierten ASAP1-Konstrukte auf die Zellstreckung.	80
Abb. 3.31 In vitro Wundheilungsversuch.	81
Abb. 3.32 Western Blot mit transients Expression der ASAP1-Konstrukte in 1AS-Tumorzellen.	81
Abb. 3.33 Auswertung der Wundheilungsversuche.	82
Abb. 3.34 Proliferationsrate transient transfizierter 1AS-Tumorzellen, dargestellt in CPM. (counts per minute)	84
Abb. 3.35 Proliferationsrate transient transfizierter ASML-Tumorzellen, dargestellt in CPM. (counts per minute)	84
Abb. 3.36 Proliferationsrate stabil transfizierter ASML-Tumorzellen, dargestellt in CPM. (counts per minute)	85
Abb. 3.37 Apoptoseauswertung.	87
Abb. 3.38 SH3-Domain-Array	88
Abb. 3.39 Western Blot mit stabil transfizierten 1AS-Klonen.	91
Abb. 3.40 Western Blots mit stabil transfizierten ASML-Tumorzellen.	91
Abb. 3.41 Wachstumsrate der durch stabile 1AS-Klone verursachten Tumore.	93
Abb. 3.42 Auswertung der Metastasierung über die Lymphknoten der durch stabil transfizierte 1AS-Klone verursachten Tumore.	94
Abb. 3.43 Lungenmetastasen in Ratten mit 1AS-rASAP1c-Tumoren.	95
Abb. 3.44 Die dominant negativen ASAP1-Konstrukte R14 und S46 reduzieren signifikant die Tumormetastasierung über die Lymphknoten	97
Abb. 3.45 Graphische Darstellung der Lungenmetastasen bezogen auf die Größe/Metas- tase und Anzahl/Lunge.	98

#### **Tabellen**

Tab. 3.1 Prostata-Adenokarzinom-System (G/MatLylu) auf PLSSH/MLSSH-DNA-Array.	53
Tab. 3.2 Zusammenfassung der ASAP1 Expressionsstudien auf cDNA-Array	57
Tab. 3.3 Zusammenfassung der ASAP1-Expression in menschlichen Tumorgeweben (RNA-Fish).	59
Tab. 3.4 Zusammenfassung der Charakterisierung der monoklonalen anti-ASAP1-Antikörper.	70
Tab. 3.5 IHC-Analyse der ASAP1-Expression in Tumor-/Normalgeweben.	71
Tab. 3.6 Interaktionspartner des ASAP1-Proteins.	99
Tab. 3.7. Stabil rASAP1c überexprimierende 1AS-Tumore führen zur Bildung von Lungen- metastasen in Ratten.	105