



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7408

Physiologische und pathophysiologische Rolle von CD24

N. Cremers

Institut für Toxikologie und Genetik

Juli 2008

Forschungszentrum Karlsruhe

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7408

Physiologische und pathophysiologische Rolle
von CD24

Natascha Cremers

Institut für Toxikologie und Genetik

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

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2008

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:0005-074085

Physiologische und pathophysiologische Rolle von CD24

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

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

DISSERTATION

von

Dipl. Biol. Natascha Cremers

aus Karlsruhe

Dekan:	Prof. Dr. S. Bräse
Referent:	Prof. Dr. J.P. Sleeman
Korreferentin:	Prof. Dr. D. Wedlich
Tag der mündlichen Prüfung:	13.12.2007

Zusammenfassung

CD24 wird in verschiedenen Zelltypen exprimiert und ist an der Regulation von Prozessen wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose beteiligt. Darüber hinaus wurde CD24 kürzlich in verschiedenen Geweben als Marker für adulte Stamm- bzw. Vorläuferzellen identifiziert. Obwohl CD24 auf Mausbruststammzellen exprimiert wird, ist die funktionelle Rolle von CD24 in der Brust allerdings noch nicht erforscht.

Aus diesem Grund war ein Ziel dieser Arbeit, die Expression und Funktion von CD24 in der Mausbrustdrüse zu charakterisieren. Mittels immunhistologischer Analysen wurde gezeigt, dass die Expression von CD24 auf luminale Brustepithelzellen beschränkt ist und abhängig vom funktionellen Differenzierungsstatus des Brustepithels einer Regulation unterliegt. So ist CD24 während der Pubertät konstant exprimiert, wird mit fortschreitender Schwangerschaft herunterreguliert und ist während der Laktation nicht mehr detektierbar. Nach Abschluss der Laktationsphase wird das ursprüngliche CD24-Expressionsniveau im Brustepithel wieder hergestellt. Zur weiteren Untersuchung der Funktion von CD24 im Mausbrustepithel wurden CD24 knock-out Mäuse herangezogen. Die morphologische Analyse zeigte dabei, dass es während der Pubertät im knock-out Brustgewebe zu einer verstärkten Verzweigung bzw. erhöhten Dichte der Brustdrüsengänge kommt, was auf eine negative regulatorische Rolle von CD24 im Verzweigungsprozess hinweist.

CD24 wird von Mausbruststammzellen exprimiert, die in diesem Kontext potentielle funktionelle Rolle von CD24 wurde erstmalig in dieser Arbeit untersucht. Durch Transplantation kleiner CD24 knock-out Brustgewebestücke wurde gezeigt, dass die vollständige morphologische und funktionelle Rekonstitution des Brustgewebes erzielt werden kann. Damit ist CD24 für die Funktion von Mausbruststammzellen nicht essenziell. Eine Kompensation des Verlustes von CD24 im knock-out Brustgewebe durch verstärkte Expression des CD24-Paralogs CD52 wurde nicht beobachtet.

Neben der Expression in physiologischen Kontexten spielt CD24 auch eine Rolle in verschiedenen Tumoren und ist von Bedeutung für die Progression bzw. Metastasierung. Um die funktionelle Relevanz von CD24 für die Tumorprogression *in vivo* zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Tumortiermodelle zunächst hinsichtlich ihrer CD24-Expression charakterisiert. Durch Verpaarung eines der Tumormodelle mit CD24 knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass der Verlust der CD24-Expression eine erhöhte Überlebensrate der Tiere zur Folge hat, was auf die Beteiligung von CD24 an der Tumorprogression in diesem Modell schließen lässt.

Physiological and pathophysiological role of CD24

Abstract

CD24 is expressed on different cell types and takes part in the regulation of processes like differentiation, proliferation and apoptosis. In addition, CD24 was recently identified as a marker of adult stem and progenitor cells in different tissues. Although CD24 is expressed on mammary stem cells and is of importance for the progression of breast carcinoma, the precise functional role of CD24 in the breast is still unknown.

The aim of this work is therefore to characterize the expression and function of CD24 in the murine mammary gland. On the basis of immunohistological analysis it is shown, that CD24-expression is restricted to the luminal part of the gland and is regulated by the state of functional differentiation of the mammary epithelium. During puberty, CD24 is constantly expressed whereas in pregnancy its expression successively decreases and is no longer detectable during lactation. After lactation has finished, CD24-expression is re-established and reverts to previous levels. In further studies with CD24-deficient mice morphological analysis shows an increased branching of mammary ducts, indicating a negative regulatory role for CD24 in this process.

CD24 is expressed on mammary stem cells, its potential functional role in this context has now been addressed in this work for the first time. After transplantation of small pieces of CD24-deficient mammary tissue full morphological and functional reconstitution of the mammary gland is achieved, showing that CD24 is not essential for the function of mammary stem cells. However, compensation for the loss of CD24 in the knock-out gland by increased expression of its paralog CD52 is not observed. Besides its physiological expression, CD24 plays also a role in different tumors where it is involved in progression and metastasis. To investigate the functional relevance of CD24 for tumor progression *in vivo*, various mouse tumor models have first been characterized regarding CD24-expression. Breeding of one of these tumor models with CD24-k.o. mice shows, that loss of CD24 results in an increased survival rate of the animals indicating the involvement of CD24 in tumor progression.

Inhalt

Einleitung	1
Allgemeine Einleitung	1
CD24	1
CD24: Expression und Funktion im physiologischen Kontext	3
CD24 im hemapoetischen System	3
CD24 im zentralen Nervensystem	3
CD24 in anderen Geweben und in Stammzellen	4
CD24: Expression und Funktion im pathologischen Kontext	5
CD24 als Signalmolekül	8
Bedeutung der Glykosylierung für die Funktion von CD24	9
Aufbau und Entwicklung der Brust in der Maus	10
Der Lebenszyklus der Brust	10
Aufbau des Brustgewebes	11
Terminal End Buds (TEBs) und Brustepithelstammzellen	12
Tiermodelle als Grundlage der Tumorigeneseforschung <i>in vivo</i>	15
Das TRAMP-Prostatakarzinommodell	16
Das MMTV-PyVMT-Brusttumormodell	17
Das APC ^{+1572T} -Modell	18
Zielsetzung dieser Arbeit	19
Material und Methoden	21
Material	21
Antikörper	21
Seren, Medien und Zellkulturartikel	21
Chemikalien und Reagenzien	21
Verwendete Kits	23
Enzyme, Reaktionspuffer und Größenstandards	24
Geräte und sonstige Verbrauchsmaterialien	24
Plasmide, Primer und Sequenzierung	25
Bezugsquelle der in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme	25
Mikrosatelliten-DNA-Analyse von Mausstämmen	25
Methoden	26
Histologische Methoden und Präparation von Geweben	26

Immunhistochemie/Immunfluoreszenz.....	26
Immunfluoreszenz-Methode	26
Immunhistochemie-Methode.....	27
Whole mount Präparation	27
DNA-Methoden.....	28
Herstellung kompetenter Bakterien.....	28
Transformation von kompetenten Bakterien	29
Plasmid-DNA Minipräparation.....	30
Plasmid-DNA Maxipräparation.....	31
Fällung von Nukleinsäuren	31
Phenol-Chloroform-Extraktion.....	32
Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
Elektrophoretische Auftrennung von DNA	32
Aufreinigung/Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	33
Allgemeiner Restriktionsverdau von DNA	33
Klonierung des CD24pSuperRetro-Vektors zur stabilen RNA-Interferenz (RNAi).....	33
Sequenzierung von DNA	35
RNA-Methoden.....	35
RNA-Isolierung	35
Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	36
Northern Analyse	37
Zellkultur, Transfektion und <i>in vitro</i> -Differenzierung von HC11-Zellen	40
Verwendete Medien.....	40
Passagieren von Zellen	41
Einfrieren von Zellen.....	41
Auftauen von Zellen.....	41
Stabile Transfektion von HC11-Zellen	41
<i>In vitro</i> -Differenzierung von HC11-Zellen.....	42
Proteinbiochemische Methoden	43
Präparation von Protein-Lysaten aus HC11 Zellen.....	43
Protein-Gelelektrophorese	43
Western Blot	44
Western Blot Analyse von CD24.....	44

Sonstige Methoden	45
FACS-Färbung und anschließende Analyse.....	45
Transplantation von Brustgewebe in epithelfreies Empfängerbrustgewebe...	45
Genotypisierung genetisch veränderter Mausstämme.....	46
Mikrosatelliten-DNA Analyse zur Bestimmung der Reinheit des genetischen Hintergrundes	50
Ergebnisse	51
Analyse der CD24-Expression in der Mausbrustdrüse	51
CD24 RNA-Expression.....	51
Immunhistologische Analyse der CD24-Proteinexpression in der Mausbrust ...	53
Die CD24-Expression während Schwangerschaft, Laktation und Involution der Brust.....	57
<i>In vitro</i> -Untersuchungen zur funktionellen Rolle von CD24 im Brustepithel	60
Das HC11-Zellkulturmodell.....	60
CD24-RNAi in HC11-Zellen.....	63
Analyse von CD24 k.o.-Mäusen.....	66
Whole mount Analyse.....	66
CD24 und Brustepithelstammzellen	71
CD52 als Substitutionsmolekül für CD24	75
Ergebnisse der Tumormodellstudien	77
Histologische Analyse von Gewebeschnitten des TRAMP-Modells	78
Einfluss der CD24-Expression auf die Überlebensrate im TRAMP-Modell.....	80
Histologische Analyse von Gewebeschnitten des APC ^{+1572T} -Modells.....	81
Histologische Analyse von Gewebeschnitten des MMTV-PyVMT-Modells	84
Diskussion	87
CD24 ist im Brustgewebe spezifisch auf Brustepithelzellen, vor allem auf luminalen Zellen, exprimiert	88
CD24 ist ein Marker der funktionellen Differenzierung des Brustepithels	89
CD24 ist in Terminal End Buds exprimiert	91
CD24 hat keine essenzielle Rolle in Brustepithelstammzellen.....	92
CD52 dient nicht als Substitutionsmolekül in CD24 knock-out Mäusen	93
CD24 ist ein negativer Regulator der Verzweigung von Brustepithelgängen	94
Die CD24-Expression hat im HC11-Differenzierungsmodell keinen Einfluss auf die Laktation.....	96

CD24 hat eine funktionelle Rolle in der Tumorprogression	98
Beobachtungen im TRAMP-Modell	99
Beobachtungen im MMTV-PyVMT-Modell	100
Allgemeine Betrachtungen zur Tumorerogenität	101
CD24 ist im TRAMP-Modell an der Tumorprogression beteiligt	103
Beobachtungen im APC ^{+1572T} -Modell.....	103
Abschließende Betrachtung, Perspektiven	105
Literatur	106
Abbildungsverzeichnis	121
Abkürzungsverzeichnis	123
Danksagung	125
Lebenslauf	127

Einleitung

Allgemeine Einleitung

Im Fokus der Arbeitsgruppe Sleeman steht die Erforschung grundlegender Prozesse der Tumorigenese und Metastasierung. In diesem Zusammenhang wurden unter anderem Screens mit verschiedenen Tumorprogressionsmodellen durchgeführt, um differenziell exprimierte Gene zu identifizieren, die mit dem Prozess der Metastasierung assoziiert sind. Eines der näher untersuchten Kandidatengene ist CD24 (*Nestl et al., 2001*). *In vitro* als auch *in vivo*-Folgeexperimente mit Tumorzelllinien zeigten dabei, dass CD24 mehrere für die Tumorprogression wichtige und mit der Metastasierung assoziierte Eigenschaften vermitteln kann (*Baumann et al., 2005*).

Die in unserer Arbeitsgruppe gewonnenen Daten als auch andere Studien aus der Literatur belegen dabei eine bedeutende Rolle von CD24 insbesondere in Brusttumoren. Um ein erweitertes Verständnis dieser Rolle zu erlangen, sollte in dieser Arbeit neben der Untersuchung von Tumormodellen vor allem auch die Funktion von CD24 in der normalen Brustdrüse geklärt werden.

CD24

CD24 ist ein stark glykosiliertes Protein, welches über einen GPI (Glykosphosphatidylinositol)-Anker in der äußeren Schicht der Zellmembran lokalisiert ist. Wegen seiner Widerstandsfähigkeit gegenüber hohen Temperaturen wird CD24 in der Maus auch als hitzestabiles Antigen (heat-stable antigen, kurz HSA) bezeichnet (*Springer et al., 1978*). An den z.B. in der Maus nur 27 Aminosäuren umfassenden Proteinkern sind verschiedenartige Zuckerketten kovalent angeheftet. Die Verknüpfung der Zuckerketten mit dem Proteinkern erfolgt sowohl über das Sauerstoffatom von Serin- und Threonin (O-gebundene Glykosilierung) als auch über das Stickstoffatom von Asparagin (N-gebundene Glykosilierung). Durch diese äußerst variable und vom Gewebe-bzw. Zelltyp abhängige Glykosilierung schwankt das Molekulargewicht von CD24 zwischen 38 und 70 kDa. (*Kristiansen et al., 2004a*).

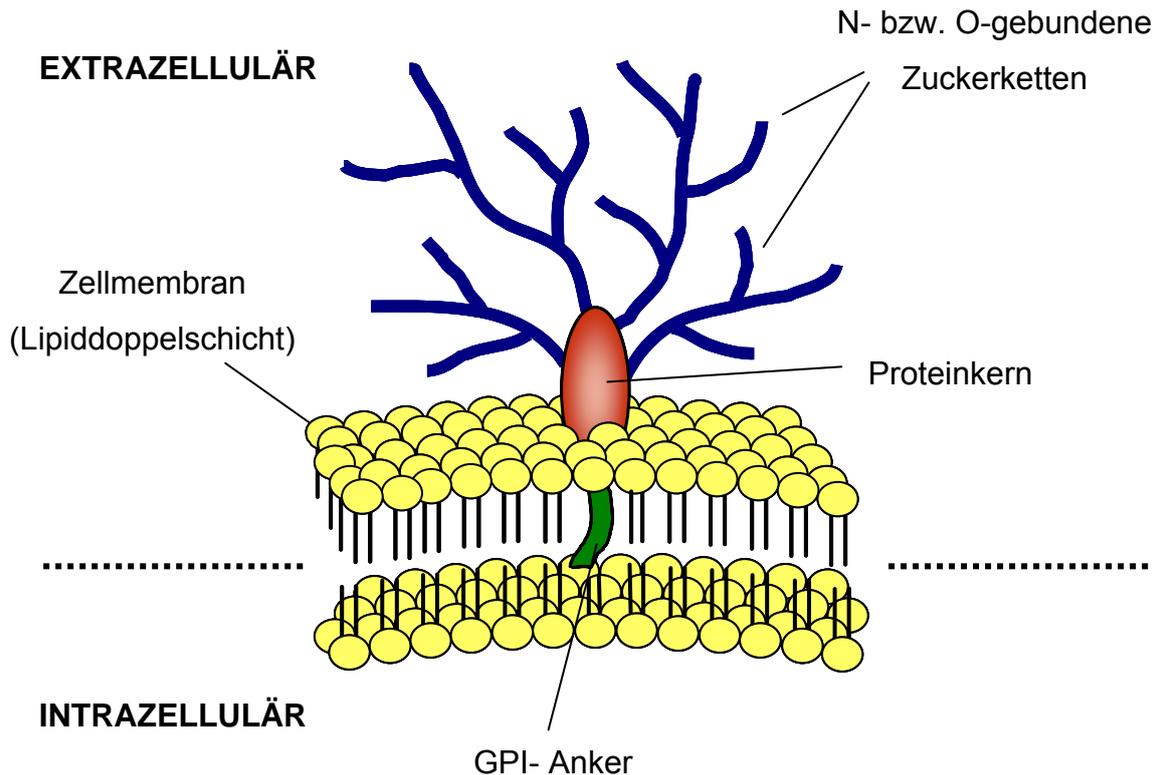


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Struktur von CD24. Der relativ kleine Proteinkern von CD24 ist durch N- und O-gebundene Zuckerketten stark glykosyliert und wird durch einen kovalent gebundenen GPI-Schwanz in der Zellmembran verankert. Da CD24 kein transmembranes Protein ist, hat es keinen direkten Kontakt zum Zellinneren.

Sowohl im humanen Genom als auch im Genom der Maus existieren zusätzlich zum funktionellen CD24-Gen zwei Pseudogene. Jedes der drei Gene befindet sich dabei auf einem anderen Chromosom (Wenger et al., 1991; Wenger et al., 1993; Hough et al., 1994 a). Eine Besonderheit stellt der Promotor von CD24 dar, welcher sowohl Charakteristika eines differentiell regulierten, als auch die eines typischen, konstitutiv aktiven ‚house-keeping‘-Promotors vereint (Wenger et al., 1993).

Expressionsanalysen zeigen, dass CD24 fast ubiquitär von verschiedenen Zelltypen und Organen exprimiert wird (Akashi et al., 1994). Dabei wird CD24 sowohl im physiologischen als auch im pathologischen Kontext eine funktionelle Rolle zugeschrieben.

CD24: Expression und Funktion im physiologischen Kontext

CD24 im hemopoetischen System

CD24 wurde zum ersten Mal Ende der siebziger Jahre als ein von unreifen B-Zellvorläufern exprimiertes Antigen beschrieben (Springer et al., 1978). Es ist jedoch auch auf anderen hemopoetischen Zelltypen wie beispielsweise T-Zellen (Bruce et al., 1981; Crispe und Bevan, 1987) und auch Erythrozyten (Hitsumoto et al., 1992) zu finden.

Im hemopoetischen System ist CD24 in den Differenzierungsprozess von B-als auch T-Zellen involviert, wobei ihre fortschreitende Differenzierung durch den sukzessiven Verlust der CD24-Expression charakterisiert ist (Bruce et al., 1981; Crispe und Bevan, 1987; Hough et al., 1994 b; Hough et al., 1996; Nielsen et al., 1997). Darüber hinaus reguliert CD24 in diesen Zellen wichtige Prozesse wie Proliferation (Li, O. et al., 2004) und Apoptose (Hough et al., 1996; Lu et al., 2000), und besitzt speziell auf T-Zellen eine co-stimulatorische Aktivität (Liu et al., 1992a; Liu et al., 1992b). CD24 ist auch als Vermittler der Adhäsion bekannt: zum einen in direkter homotypischer Weise (Kadmon et al., 1992), zum anderen indirekt durch die Modulation der Aktivität von Integrinen (Hahne et al., 1994). Zudem bindet CD24 an den von Blutplättchen und aktivierten Blutendothelzellen exprimierten Liganden P-Selektin und kann dadurch den initialen Schritt beim sogenannten ‚rolling‘ einleiten, ein Vorgang, bei dem Zellen durch schwache temporäre Adhäsion langsam über das Blutendothel wandern (Sammar et al., 1994; Aigner et al., 1995; Aigner et al., 1998).

CD24 im zentralen Nervensystem

Während der embryonalen Entwicklung des Gehirns findet eine transiente Expression von CD24 statt (Nedelec et al., 1992; Calaora et al., 1996; Poncet et al., 1996), durch die vor allem post-mitotische, migrierende, undifferenzierte Neuronen charakterisiert sind und die mit zunehmendem Differenzierungsgrad dieser abnimmt (Kuchler et al, 1989; Calaora et al., 1996). Im adulten Gehirn ist die Expression von CD24 hauptsächlich auf Gehirnareale beschränkt, in denen aus adulten Stammzellen durch sogenannte sekundäre Neurogenese neue Neuronen hervorgehen (Calaora et al., 1996). In dieser Phase übt CD24 eine anti-proliferative Wirkung auf die neuronalen Vorläuferzellen aus und ist damit an der Regulation ihrer Populationsgröße beteiligt

(Belvindrah et al., 2002; Nieoullon et al., 2005). Damit wird CD24 eine regulatorische Rolle in der Kontrolle des homeostatischen Gleichgewichts von Proliferation und Differenzierung zwischen Vorläuferzellen (transit-amplifiers) und differenzierten Zellen zugeschrieben (Nieoullon et al., 2007).

Als gehirnspezifischer Ligand für CD24 gilt das neuronale Erkennungsmolekül L1. Durch die Interaktion von CD24 und L1 wird das Neuritenwachstum und die Axonverzweigung gehemmt. Allerdings ist dieser Effekt vom neuronalen Zelltyp abhängig, da eine stimulatorische Wirkung von CD24 auf Neuritenwachstum und Axonverzweigung ebenfalls beobachtet wurde. Dies deutet auf eine zellkontextabhängige regulatorische Rolle von CD24 während der Zielfindung von Axonen hin (Kleene et al., 2001).

CD24 in anderen Geweben und in Stammzellen

Zusätzlich zum hemopoetischen System und dem Zentralnervensystem wird CD24 beispielsweise von regenerierenden Muskelfasern exprimiert (Figarella-Branger et al., 1993), und nach neuerer Beobachtung auch von den synaptischen Kernen in der zentralen Region des Muskels. Hier wurde eine Beteiligung von CD24 an der Regulation der synaptischen Transmission von Signalen in der neuromuskulären Synapse gezeigt (Jevsek et al., 2006).

In jüngster Zeit häufen sich zudem Hinweise, die CD24 auch in Verbindung mit Stammzellen und Vorläuferzellen verschiedener Organe bzw. Gewebe erwähnen. Eine CD24-Expression wurde dabei in multipotenten Vorläuferzellen der Niere (Sagrinati et al., 2006), Stammzellen der Prostata (Lawson et al., 2007) und Stammzellen der Brust (Sleeman et al., 2006; Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006) gezeigt. Die potentielle funktionelle Rolle von CD24 in den Stammzellen dieser Gewebe wurde jedoch noch nicht beschrieben.

Trotz dieser vielfältigen Expressionsorte von CD24 zieht dessen Verlust in der CD24 knock-out Maus keine ernsthafteren pathologischen Schäden nach sich. So ist zwar im Knochenmark die Anzahl der B-Zellvorläufer reduziert, die Zahl und Verteilung der reifen B-Zellen in der Peripherie bleibt davon jedoch unbeeinträchtigt und hat keine funktionelle Beeinträchtigung der Immunabwehr zur Folge. Eine auffallendere Veränderung ist in Erythrozyten zu beobachten, die - im Gegensatz zu anderen hemopoetischen Zelltypen - auch im reifen Zustand noch eine hohe CD24-

Expression aufweisen. CD24-defiziente Erythrozyten zeigen *in vitro* mit dem Alterungsprozess in Verbindung gebrachte Eigenschaften wie die verstärkte Aggregation und die Empfindlichkeit gegenüber osmotischer Lyse. Obwohl *in vivo* die Lebensdauer der Erythrozyten in der Tat deutlich verkürzt ist, werden sie in ausreichender Menge ersetzt, wodurch eine Anämie der Tiere verhindert wird (*Nielsen et al., 1997*). Neben den Effekten im hemopoetischen System wirkt sich der Verlust von CD24 auch in bestimmten Bereichen des adulten Zentralen Nervensystems aus. Hier kommt es zur gesteigerten sekundären Neurogenese, die auf einer verstärkten Proliferation neuronaler Vorläuferzellen der Subventrikulären Zone und des Hippocampus basiert. Allerdings werden die im Überschuss produzierten Neuronen anschließend durch eine erhöhte Apoptoserate wieder eliminiert, so dass es zu keiner Größenzunahme des Gehirns CD24-defizienter Mäuse kommt (*Belvindrah et al., 2002*). Veränderungen sind auch im Epithel der Haut bzw. der Cornea von CD24 knock-out-Mäusen zu beobachten, wobei es zu einer gesteigerten Proliferation in der basalen (enthält Stammzellen) und suprabasalen (enthält differenziertere Zellen) Schicht kommt (*Nieoullon et al., 2007*).

Die relativ geringfügigen Konsequenzen der Abwesenheit von CD24 werden mit der Existenz eines kompensatorischen Moleküls erklärt (*Nielsen et al., 1997*). Bislang wurde allerdings noch kein Protein identifiziert, welches die Funktion von CD24 übernehmen könnte.

CD24: Expression und Funktion im pathologischen Kontext

Zahlreiche Studien zeigen, dass CD24 nicht nur im physiologischen sondern auch im pathologischen Kontext eine Rolle spielt.

Im Mittelpunkt vieler Untersuchungen stehen insbesondere Tumoren, in denen häufig eine starke Expression von CD24 auftritt. Diese Beobachtung wurde in zahlreichen Krebsarten wie beispielsweise Tumoren des hemopoetischen Systems (*Abramson et al., 1981; Michiels et al., 1988; Schuurman et al., 1988; Raife et al., 1994*) und einer Reihe von Karzinomen (*Droz et al., 1990; Jackson et al., 1992; Huang und Hsu, 1995; Kristiansen et al., 2004a; Liu et al., 2004; Santin et al., 2004; Biade et al., 2006*) dabei insbesondere in Brusttumoren (*Fogel et al., 1999; Kristiansen et al., 2003a; Bircan et al., 2006*) gemacht.

Sowohl immunhistologische als auch RNA-basierte Studien haben gezeigt, dass die Expression von CD24 in Tumoren im Vergleich zu entsprechenden normalen Geweben oftmals um ein vielfaches erhöht ist (Fogel et al. 1999, Santin et al., 2004; Liu et al., 2004; Bircan et al., 2006; Biade et al., 2006) und als Indikator für die Tumorprogression dienen kann (Fogel et al., 1999; Jacob et al., 2004; Winkler et al., 2007). Die Relevanz dieser tumorassoziierten CD24-Expression wird dadurch verdeutlicht, dass CD24 mittlerweile für diverse Krebsarten als prognostischer Marker gilt, welcher mit einer ungünstigen Patientenprognose korreliert. (Kristiansen et al., 2002; Kristiansen et al., 2003a; Kristiansen et al., 2003b; Kristiansen et al., 2004a; Kristiansen et al., 2005; Weichert et al., 2005; Smith et al., 2006b; Surowiak et al., 2006). Die negative Prognose bezieht sich dabei auch auf die Zeitspanne bis zur Diagnose von Tochtertumoren bzw. Metastasen, welche durch ihr Wachstum in lebenswichtigen Organen diese verdrängen und somit die häufigste Todesursache einer Krebserkrankung darstellen.

Eine der Grundlagen, welche es Tumorzellen erlaubt, sich vom Primärtumor loszulösen und in andere Gewebe einzuwandern um dort Tochtertumoren zu bilden, ist ihr invasives Verhalten (Sleeman, 2000). CD24 erhöht sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Invasivität von Tumorzellen (Senner et al., 1999; Baumann et al., 2005; Fukushima et al., 2007) und hat einen fördernden Einfluss auf die Metastasierung (Baumann et al., 2005). Auch die Interaktion von CD24 und P-Selektin trägt zu dieser pro-metastatischen Rolle bei, da CD24-positive Tumorzellen durch ihre Bindung an P-Selektin exprimierendes Blutendothel lange genug verweilen können, um ihre Einwanderung in das umgebende Gewebe einzuleiten (Aigner et al., 1998; Friederichs et al., 2000). Da jedoch auch Hinweise auf eine inverse Korrelation der CD24-Expression mit pro-metastatischen Eigenschaften wie beispielsweise Invasivität existieren (Schindelmann et al., 2002; Sheridan et al., 2006), ist die genaue Rolle von CD24 für die Metastasierung zur Zeit noch nicht eindeutig geklärt. Neben Funktionen in der Adhäsion fördert CD24 in Krebszellen auch die Proliferation und trägt damit ebenfalls zur Progression von Tumoren bei (Smith et al., 2006b; Baumann et al., 2005).

Das seit kurzem von hemopoetischen Tumoren (Bonnet, 2005) auf solide Tumoren übertragene Konzept der Krebsstammzelle macht allerdings eine erweiterte Betrachtungsweise der Rolle von CD24 sowohl in der Tumorigenese als auch der Metastasierung notwendig. Laut der Krebsstammzellhypothese besitzt nur eine kleine Population (Krebsstammzellen) der gesamten Zellmasse eines Tumors tumorogene Eigenschaften und kann damit das Wachstum des Tumors aufrecht erhalten (Dalerba et al., 2007). In Falle von Brusttumoren konnte diese tumorogene

Population an Hand eines Oberflächenexpressionsprofils identifiziert werden, welches sie als CD44-positiv und CD24-negativ bis schwach positiv ($CD44^+/CD24^{-/low}$) beschreibt. Die nicht-tumorigene Population ist hingegen als CD44-positiv und CD24-positiv ($CD44^+/CD24^+$) definiert (Al-Hajj et al., 2003). Bislang konnten Krebsstammzellen sowohl aus primären Brusttumoren als auch aus Tochtertumoren, den Metastasen, isoliert werden (Al-Hajj et al., 2003). Es wird daher spekuliert, dass Krebsstammzellen migratorische bzw. invasive Fähigkeiten besitzen und so auch für die Etablierung von Metastasen verantwortlich sein könnten (Brabletz et al., 2005; Li, F. et al., 2007). Erste Hinweise darauf liefern kürzlich durchgeführte Studien in welchen der CD24-negative Phänotyp von Brustkrebszellen mit einem gesteigerten invasiven Verhalten korreliert werden konnte (Schindelmann et al., 2002; Sheridan et al., 2006).

Die Hypothese von migrierenden Krebsstammzellen wird ferner durch die Beobachtung gestützt, dass die in der frühen Phase des streuenden Tumorzwachstums in das Knochenmark ausgewanderten Krebszellen überwiegend den für Brustkrebsstammzellen definierten $CD44^+/CD24^{-/low}$ -Phänotyp aufweisen (Balic et al., 2006). Obgleich die Detektion von Mikrometastasen im Knochenmark mit einer schlechten Prognose korreliert (Braun et al., 2005), ist noch unklar, in welchem Umfang die $CD44^+/CD24^{-/low}$ -Krebszellen für die weitere systemische Verbreitung des Tumors verantwortlich sind. Die Tatsache, dass der $CD44^+/CD24^{-/low}$ -Phänotyp alleine in Tierexperimenten für die Etablierung von Metastasen nicht immer ausreichend ist (Sheridan et al., 2006), deutet zudem auf die Möglichkeit hin, dass die metastatische Kompetenz nicht vollständig durch die Expression der Marker CD44 und CD24 wiedergespiegelt wird.

Die Tatsache, dass Brustkrebsstammzellen CD24-negativ bzw. schwach CD24-positiv und wahrscheinlich für die Etablierung von Metastasen verantwortlich sind, lässt sich mit der bisherigen Rolle von CD24 in der Tumorzprogression und Metastasierung nur schwer in Einklang bringen. Allerdings ist auch noch unklar, in wieweit der $CD44^+/CD24^{-/low}$ -Phänotyp in Anbetracht zahlreicher verschiedener Brustkrebstypen als verlässliches und allgemein gültiges Brustkrebsstammzellmerkmal dient. In der Studie von Abraham et al. (2005) wurde gezeigt, dass die Anzahl und die Häufigkeit von $CD44^+/CD24^{-/low}$ -Zellen in primären Brusttumoren weder von prognostischem Wert für die Überlebensrate der Krebspatienten war, noch mit der Progression der Brusttumoren korreliert hat. Diese Daten lassen vermuten, dass sich Krebsstammzellpopulationen verschiedener Brusttumortypen in

der Expression ihrer Marker unterscheiden könnten. Entsprechende experimentelle Beweise zur Überprüfung dieser Möglichkeit stehen allerdings noch aus.

Außer in Brusttumoren gilt CD24 auch in Krebsstammzellen anderer Tumorarten als Marker, so z.B. in Pankreaskarzinomen. Hier ist die tumorigene Population hingegen nicht als CD44⁺/CD24^{-low}, sondern als CD44⁺/CD24⁺ beschrieben (Li, C. et al., 2007). Die funktionelle und möglicherweise vom Tumortyp abhängige Relevanz von CD24 in Krebsstammzellen ist bislang unerforscht.

CD24 als Signalmolekül

Im Gegensatz zu vielen transmembranen Signalmolekülen hat CD24 als GPI-verankertes, in der äußeren Hälfte der Zellmembran lokalisiertes Protein keinen Kontakt zum Zellinneren. Dennoch ist es in der Lage, Signaltransduktionskaskaden zu modulieren bzw. zu initiieren und somit auf zellulärer Ebene einen Effekt auszulösen. Die Fähigkeit zur Signalübermittlung wurde bereits für viele andere GPI-verankerte Proteine gezeigt und wird unter anderem mit ihrer Lokalisation in sogenannten *lipid rafts* in Verbindung gebracht, welche als spezielle Membrandomänen verschiedenartige Proteine beherbergen und somit als „Signalling- Plattform“ dienen (Ilangumaran et al., 2000; Simons und Toomre, 2000; Foster et al., 2003). Als ein mit *lipid rafts* assoziiertes Protein ist CD24 in diese Plattform eingebettet (Suzuki et al., 2001) und kann dort die Aktivität anderer Proteine beeinflussen, wie am Beispiel des Chemokinrezeptors CXCR4 gezeigt wurde (Schabath et al., 2006).

Ebenfalls in der Assoziation mit *lipid rafts* begründet ist die Interaktion von CD24 mit Mitgliedern der Src-Proteintyrosinkinasefamilie, welche durch Ko-Immuno-präzipitationsstudien bereits mehrfach gezeigt und durch Kolokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenz gestützt wurde (Zam et al., 1996; Sammar et al., 1997; Suzuki et al., 2001; Baumann et al., 2005). Src-Familienmitglieder und insbesondere c-Src gelten als zentrale Moleküle einer Vielzahl verschiedener Signaltransduktionskaskaden und regulieren Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Motilität (Ishizawa und Parsons, 2004; Parsons und Parsons; 2004).

Die Interaktion von CD24 mit Src-Familienmitgliedern führt zu ihrer erhöhten Aktivität (Suzuki et al., 2001; Baumann et al., 2005) bzw. zur Stabilisation der aktiven Form von c-Src

(Baumann et al., unveröffentlichte Daten) und ermöglicht dadurch die Modulation zellulärer Signalkaskaden. Infolgedessen kann es beispielsweise zur CD24-vermittelten Bindung von Integrinen an Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin (Hahne et al., 1994; Baumann et al., 2005), oder auch zur Aktivierung der SAP-, Erk-, und der p38 MAP-Kinase kommen (Suzuki et al., 2001).

Bedeutung der Glykosilierung für die Funktion von CD24

Das Ausmaß und die Art der Glykosilierung von CD24 ist je nach Zelltyp und Gewebe äußerst variabel. Trotz der potentiellen physiologischen als auch pathologischen Rolle der verschiedenen CD24-Glykoformen existieren nur wenige Studien über ihre zell- und gewebespezifische Zusammensetzung (Ohl et al., 2003).

Die Relevanz der verschiedenen N- und O-gebundenen Zuckerketten zeigt sich vor allem in der Interaktion von CD24 mit dessen Liganden P-Selektin und L1. In beiden Fällen konnten die Bindung von CD24 und die darüber vermittelten Effekte durch enzymatischen Abbau der CD24-assoziierten Kohlenhydratepitope verhindert werden (Aigner et al., 1995; Aigner et al., 1997; Kleene et al., 2001). In umgekehrter Weise konnte beispielsweise durch ektopische Ko-Expression des für den Glykosilierungsprozess relevanten Enzyms Fucosyltransferase VII und CD24 in Krebszellen demonstriert werden, dass die Modifikation der Zuckerketten von CD24 dessen Bindung an endotheliales P-Selektin ermöglicht. Dies hatte im Tierversuch vor allem die verstärkte Akkumulation der Krebszellen in der Lunge zur Folge (Friederichs et al., 2000).

Diese Daten zeigen, dass die Funktion von CD24 in direkter Weise von der Zuckereinheit des Proteins abhängen kann. Es ist daher wahrscheinlich, dass das bislang für CD24 beobachtete Spektrum an Funktionen wie Adhäsion, Proliferation und Differenzierung in der variablen Glykosilierung dieses Proteins begründet sein könnte.

Aufbau und Entwicklung der Brust in der Maus

Wie in den vorangegangenen Abschnitten bereits erwähnt, ist die Rolle von CD24 insbesondere im pathologischen Kontext von großer Bedeutung und hier vor allem im Bereich der Tumorigenese und der Metastasierung.

Seit kurzem richtet sich dabei der Fokus auch auf die Rolle von CD24 in Brustkrebsstammzellen, die als initiiierende und erhaltende Einheit von Brusttumoren betrachtet werden und als vielversprechendes Ziel zukünftiger Krebstherapien gelten (*Lynch et al., 2006; Dalerba et al., 2007*). Als potentielle Kandidaten in der Frage nach dem zellulären Ursprung von Brustkrebsstammzellen werden unter anderem gewebeeigene Brustepithelstammzellen gehandelt (*Smalley und Ashworth, 2003*). Das Wissen um die Rolle von CD24 im physiologischen Kontext wie beispielsweise der Brust trägt daher nicht nur zum Verständnis dessen dortiger Funktion bei, sondern könnte auch Rückschlüsse auf seine pathologische Rolle erlauben. Da im Rahmen dieser Arbeit auch die Rolle von CD24 in der normalen Mausbrustdrüse untersucht wurde, wird in den folgenden Abschnitten auf ihren Aufbau und ihre Funktion, als auch auf Brustepithelstammzellen näher eingegangen.

Der Lebenszyklus der Brust

Die Brustentwicklung beginnt in der Maus bereits in der Embryonalphase mit der Etablierung der sogenannten Anlage. Das Wachstum dieser aus rudimentären Drüsengängen bestehenden Struktur wird jedoch erst mit Beginn der Pubertät fortgesetzt. Dabei findet insbesondere ein Längenwachstum der Drüsengänge statt, welche sich verzweigen und so das sie umgebende Fettgewebe vollständig besiedeln. Mit Beginn der Schwangerschaft findet ein weiteres Wachstum und die Bildung zusätzlicher Verzweigungen statt, welche als funktionell ausdifferenzierte Einheiten die Alveoli hervorbringen. Diese sind in der Laktationsphase für die Milchbildung und Sekretion verantwortlich. Nach Abschluss der Laktation wird das milchbildende Gewebe in der Phase der Involution abgebaut. In dieser Zeit kommt es verstärkt zur Apoptose und zu Gewebeumstrukturierungsprozessen. Am Ende der Involution ist die ursprüngliche Morphologie des Gewebes nahezu wieder hergestellt und die Brust kann erneut in den Zyklus von Schwangerschaft, Laktation und Involution eintreten (*Richert et al., 2000*). Die Regulation von Wachstum, Verzweigung,

Differenzierung als auch der Gewebeumstrukturierung des Brustepithels erfolgt über ein komplexes Netzwerk an Hormonen und Wachstumsfaktoren (*Hennighausen und Robinson, 2005*).

Aufbau des Brustgewebes

Die Brust ist ein Mischgewebe, in dem epitheliale Drüsengänge in das Fettgewebe eingebettet und zusätzlich von Bindegewebsanteilen (Fibroblasten/Stroma) umgeben sind. Die Drüsengänge selbst sind im Querschnitt aus zwei unterschiedlichen Epithelschichten aufgebaut, wobei die äußere basale Myoepithelschicht die innere luminale Epithelschicht umschließt (*Richert et al., 2000*) (siehe Abbildung 2).

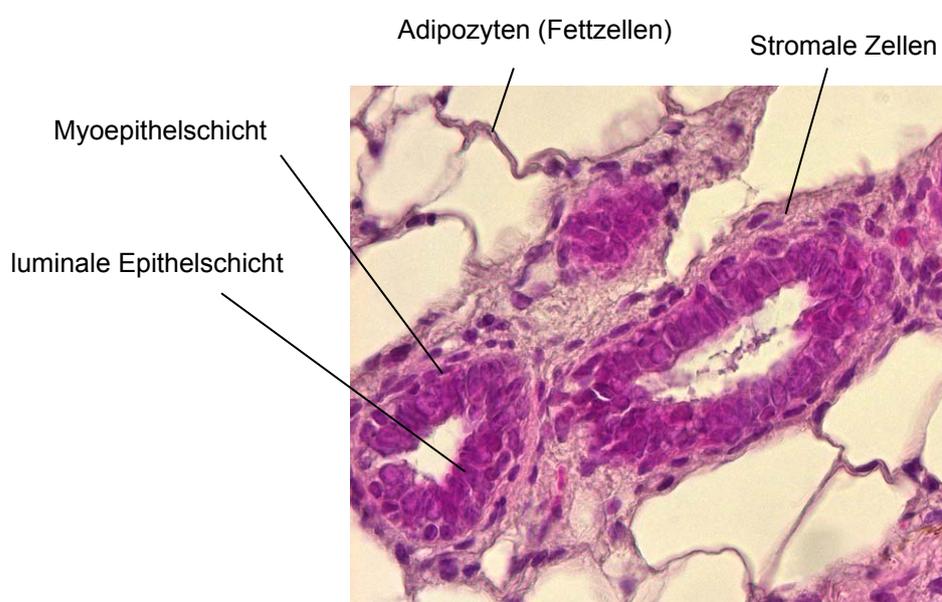


Abbildung 2. Histologischer Querschnitt von Brustdrüsengängen (Maus), H&E-Färbung. Jeder Drüsengang ist aus zwei verschiedenen Epithelschichten aufgebaut: einer dem Stroma zugewandten Myoepithelschicht und einer dem Lumen zugewandten Epithelschicht.

Die Myoepithelschicht ist gegenüber dem Stroma durch eine Basalmembran abgegrenzt (*Williams und Daniel, 1983*). Myoepithel und luminales Epithel sind funktionell verschieden. Das Myoepithel ist unter anderem für die Bildung der Basalmembran zuständig und hält die epitheliale Polarität der luminalen Zellen aufrecht. Zudem haben Myoepithelzellen sowohl Kontakt zum Stroma als auch zum luminalen Epithel und gelten als Kommunikationsvermittler diverser Signale während der Entwicklung und Differenzierung der Brust. Durch die Expression von Myosin und Aktin sind

Myoepithelzellen kontraktile und ermöglichen dadurch während der Laktation den aktiven Milchtransport. Das luminale Epithel spielt vorwiegend während der Schwangerschaft und der Laktation eine Rolle, wo es zu milchbildendem, sekretorischem Epithel ausdifferenziert (Gudjonsson et al., 2005).

Terminal End Buds (TEBs) und Brustepithelstammzellen

Eine der für die Brustentwicklung bedeutsamsten Strukturen sind die Terminal End Buds (TEBs), welche in der Pubertät für das Längenwachstum und die Verzweigung der Epithelgänge verantwortlich sind. Terminal End Buds befinden sich am Ende jedes Drüsenganges und weisen eine keulenartige Struktur auf (Abbildung 3).

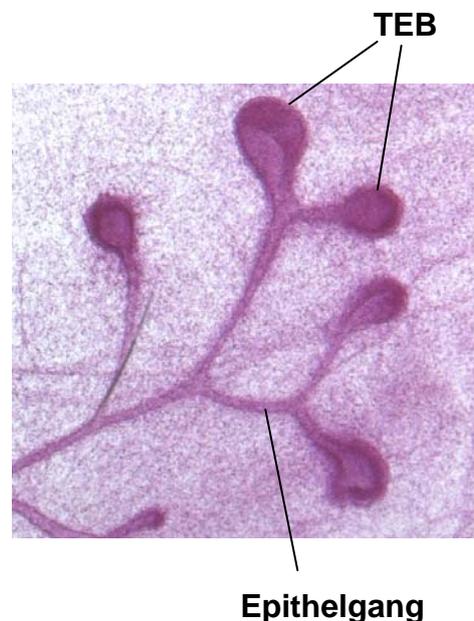


Abbildung 3. Vergrößerte Darstellung der TEB-Strukturen aus einer Whole mount-Präparation einer Mausbrustdrüse.

TEBs bestehen zum einen aus einer Ansammlung an dem Lumen zugewandten Body-Zellen, zum anderen aus Cap-Zellen, welche die Body-Zellen als äußere Zellschicht umgeben (Smalley und Ashworth, 2003; Sternlicht, 2006). Cap-Zellen werden als undifferenzierte Vorläuferzellen für luminale Epithelzellen als auch Myoepithelzellen angesehen (Williams und Daniel, 1983), und zusammen mit ihrer hohen proliferativen Aktivität für die den TEBs zugesprochene Stammzellaktivität verantwortlich gemacht. Nachdem durch die Aktivität der TEBs das Brustgewebe vollständig von

Epithelgängen besiedelt ist, werden sie am Ende der pubertären Wachstumsphase zurückgebildet (*Richert et al., 2000*). Eine Stammzellaktivität ist in den Epithelgängen der Brust allerdings auch danach weiterhin vorhanden.

Der erste Hinweis darauf wurde bereits in den fünfziger Jahren erbracht, als durch Transplantation von adultem, TEB-freiem Brustepithel die vollständige Rekonstitution einer Mausbrust erreicht werden konnte (*DeOme et al., 1959*). Damit wurde gezeigt, dass Stammzellen nicht nur in Terminal End Buds sondern auch in den Epithelgängen selbst lokalisiert sind. Diese Stammzellen sind über die gesamte Lebensdauer hinweg und in jeder Entwicklungs- bzw. Differenzierungsphase der Brust vorhanden (*Smith und Medina, 1988*).

Trotz der durch funktionelle Analysen untermauerten Hinweise auf ihre Existenz erwies sich die morphologische Identifikation von Bruststammzellen als kompliziert. Ultrastrukturelle bzw. histologische Untersuchungen lieferten eine erste Beschreibung und identifizierten Brustepithelstammzellen als sogenannte small light cells (SLCs), die in der luminalen Schicht eine suprabasale bis basale, d.h. eine dem Myoepithel angenäherte Position einnehmen (*Smalley und Ashworth, 2003*).

In vor kurzem durchgeführten Studien wurde durch die Zuhilfenahme der Expression von Oberflächenmarkern eine detailliertere Analyse des Brustepithels und infolgedessen die Charakterisierung und anschließende Isolation von Brustepithelstammzellen möglich. Als besonders nützlich hat sich hierfür die Expression von CD24 erwiesen. Sie trennt den nicht-epithelialen CD24-negativen (CD24^{neg}), vom myoepithelialen, schwach CD24-positiven (CD24^{low}) und vom luminalen, stark CD24-positiven (CD24^{high}) Anteil. In der FACS-Analyse hat die Trennung der zwei Epithelpopulationen gleichzeitig die Anreicherung der Stammzellaktivität zur Folge, die hauptsächlich in der CD24^{low}-Fraktion beobachtet wird. Zellen aus der luminalen CD24^{high}-Population zeigten in Transplantationsversuchen hingegen nur eine eingeschränkte Rekonstitutionsfähigkeit (*Sleeman et al., 2006*). In weiteren Studien konnte die Expression von CD24 auf Stammzellen bestätigt werden, allerdings wurde sie dort nicht als CD24^{low} sondern als allgemein CD24-positiv (CD24⁺) beschrieben (*Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006*).

Weitere FACS-Analysen konnten darüber hinaus auch CD29 (= β_1 -Integrin) (*Shackleton et al., 2006*) und CD49f (= α_6 -Integrin) (*Stingl et al., 2006*) eine Rolle als Marker zuweisen, da beide Moleküle auf Brustepithelstammzellen stark exprimiert werden (CD29^{high}CD49f^{high}-Phänotyp). Das üblicherweise als Stammzellantigen bekannte

Protein Sca-1 (Stem cell antigen 1) wird in dieser Population allerdings nur schwach exprimiert (Sca-1^{low}) (Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006). Der Phänotyp von Maus-Brustepithelstammzellen lässt sich deshalb insgesamt als CD24^{low} (Sleeman et al., 2006) bis CD24⁺ (Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006) und als CD29^{high}CD49f^{high} sowie Sca-1^{low} (Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006) beschreiben. Durch Transplantation einer einzelnen Zelle gingen morphologisch normale, aus Myoepithel und luminalem Epithel bestehende und zur funktionellen Differenzierung in milchbildendes Epithel befähigte Drüsengänge hervor (Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006). Die Tatsache, dass nicht alle mittels der identifizierten Marker isolierten Zellen zur Rekonstitution der Brust fähig waren (Shackleton et al., 2006), deutet darauf hin, dass die Stammzellpopulation auf diese Weise angereichert, jedoch nicht ausreichend beschrieben werden kann. Für die genauere Charakterisierung von Brustepithelstammzellen sind daher weitere Marker notwendig. Weiterhin offen bleibt auch die Frage, in wieweit die identifizierten Markerproteine eine für Stammzellen essenzielle Rolle spielen, oder ob sie lediglich als phänotypisches Erkennungsmerkmal dienen.

Tiermodelle als Grundlage der Tumorigeneseforschung *in vivo*

CD24 ist als Tumor-und Metastasierungs-assoziiertes Protein bekannt, seine genaue Rolle in diesem pathologischen Kontext allerdings noch weitgehend unklar. So wurde bisher in humanen Tumoren auf histologischer Ebene eine Korrelation der CD24-Expression mit der Progression der Tumoren gezeigt. Experimentelle Daten über die funktionelle Beteiligung von CD24 an der Tumorprogression wurden allerdings hauptsächlich mit syngenem (*Baumann et al., 2005*) und xenogenem (*Friederichs et al., 2000*) Impftumoren erhalten. Da es sich hierbei um die Injektion bereits entarteter Tumorzellen handelt, können in diesem Fall Aspekte der frühen Tumorigenese (Transformation) und Tumorprogression sowie die mögliche funktionelle Rolle von CD24 in diesen Prozessen allerdings nicht erforscht werden.

Aus diesem Grund sind *in vivo*-Studien mit etablierten Maustumormodellen von besonderer Bedeutung. In diesen Modellen werden durch Manipulation des Genoms oftmals Gene bzw. Mutationen eingeführt, die in der Entstehung und der Progression von humanen Tumoren eine Rolle spielen, wie z.B. BRCA1/2, c-Myc und APC (*Holland, 2004*). Als Folge der Expression dieser Gene (und zusätzlicher transformierender Ereignisse) können im Tier spontane Tumoren entstehen, die den Verlauf der Krebserkrankung im Menschen widerspiegeln und daher Rückschlüsse auf die humane Tumorbilogie erlauben. Darüber hinaus können an Tumormodellen auch die frühen Stadien der Tumorentstehung untersucht werden, was entscheidend zum Verständnis der Tumorigenese beiträgt.

Um einen erweiterten Einblick in die Rolle von CD24 in der Tumorigenese und der Tumorprogression zu bekommen, wurden daher im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Tumormodelle untersucht. Für die Tumorentstehung in den Modellen sind zum einen die Mutation eines Gens (APC^{+1572T}-Modell) und zum anderen transformierende, virale genetische Elemente (TRAMP-Modell, MMTV-PyVMT-Modell) verantwortlich. Im Folgenden werden die Tumormodelle kurz vorgestellt.

Das TRAMP-Prostatakarzinommodell

Das Prostatakarzinom ist der am häufigsten diagnostizierte Tumor bei Männern und ist mit jährlich 11.000 Todesfällen in Deutschland an zweiter Stelle krebsbedingter Todesursachen (*Deutsche Krebsgesellschaft e.V.*). Zu den Hauptmerkmalen von Prostata Tumoren zählen ihre starke Heterogenität, die variierende Progression als auch die Entwicklung eines hormonunabhängigen (Androgen) Wachstums. Prostatakrebs gilt als humanspezifische Erkrankung und tritt nur in seltenen Fällen spontan in Tieren auf. Die Etablierung transgener Tiermodelle zur Nachahmung und Erforschung des Krankheitsverlaufes im Menschen ist daher von großem Interesse (*Maroulakou et al., 1994; Greenberg et al., 1995; Gingrich et al., 1996*).

Eines der am häufigsten studierten Prostata Tumormodelle ist das TRAMP-Modell (Transgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate Model). In TRAMP-Mäusen kommt es zur prostataspezifischen Expression des SV40 large tumor T Antigens (kurz SV40 Tag). Die Gewebespezifität wird dabei durch den Promotor des Probasin-Gens erreicht, der durch seine androgen-gesteuerte Regulation ausschließlich in der Prostata aktiv ist (*Greenberg et al., 1995; Gingrich et al., 1996*). Die transformierende Aktivität des SV40 Tag basiert vor allem auf seiner Interaktion mit Proteinen wie Rb und p53, die zentrale Regulatoren des Zellzyklus sind und als Tumorsuppressoren gelten. Eine Inaktivierung von Rb und p53 durch Bindung des SV40 Tag führt zur Deregulation des Zellzyklus und letztlich zur malignen Transformation der Zelle (*Ali und De Caprio, 2001*). Im TRAMP-Modell hat dies zunächst die Bildung sogenannter intraepithelialer Neoplasien (*Greenberg et al., 1995*) und im weiteren Verlauf deren Entwicklung zum soliden Prostatakarzinom mit metastatischem Wachstum zur Folge (*Gingrich et al., 1996; Gingrich et al., 1999*). Da intraepitheliale Neoplasien auch beim Menschen als Vorläufer des malignen Prostatakarzinoms gelten (*Bostwick, 2000*), rekapituliert das TRAMP-Modell damit den progressiven Charakter der Krankheit.

Die Expression von CD24 ist in humanen Prostata Tumoren bereits von mehreren Studien gezeigt worden (*Kristiansen et al., 2004a; Liu et al., 2004; Kristiansen et al., 2005; Schostak et al., 2006*) und ist gegenüber der Expression in gutartigem Prostatagewebe erhöht (*Kristiansen et al., 2004b; Liu et al., 2004; Schostak et al., 2006*). Die Expression von CD24 in Prostata Tumoren gilt als prognostischer Marker, der negativ mit der Überlebensrate der Patienten korreliert (*Kristiansen et al., 2004b; Kristiansen et al., 2005*). Die Rolle von CD24 in Prostata Tumoren ist allerdings noch unklar, da zum einen die

prognostische Funktion nur für einen Teil der Tumoren gilt (*Kristiansen et al., 2004b*) und zum anderen nicht alle Tumoren eine progressionsassoziierte CD24-Expression zeigen (*Schostak et al., 2006*).

Das MMTV-PyVMT-Brusttumormodell

Das MMTV-PyVMT-Modell wurde 1992 von Guy et al. etabliert und basiert, ähnlich wie das TRAMP-Modell auf der transformierenden Aktivität eines viralen Onkoproteins, in diesem Fall dem Polyomavirus middle T Antigen (PyVMT). Folge davon ist die relativ rasche Entstehung multifokaler Brustkarzinome und im weiteren Verlauf die Bildung von Metastasen, insbesondere in der Lunge (*Guy et al., 1992*). Die brustspezifische PyVMT-Expression wird dabei durch den hormonell regulierten Long Terminal Repeat (LTR)-Teil des aus dem Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) stammenden Promotors erreicht (MMTV-LTR-Promotor). Die brustspezifische Aktivität des MMTV-Virus wurde bereits 1936 entdeckt, und zeigte sich durch dessen Weitergabe über die Muttermilch und seiner Fähigkeit zur spezifischen Induktion von Brusttumoren in infizierten Mäusen (*Hennighausen, 2000a*). Diese Gewebepreferenz wurde in der Zwischenzeit bereits vielfach genutzt, um mit der MMTV-LTR-Promotor gesteuerten Expression von Onkogenen gezielt die Transformation des Brustgewebes zu erreichen und damit transgene Mausmodelle zur Erforschung von Brusttumoren zu etablieren (*Hennighausen, 2000b*).

Die Grundlage der transformierenden Aktivität des PyVMT ist dessen Interaktion mit verschiedensten Proteinen, unter anderem solchen, die das Zellwachstum begünstigen. So kann PyVMT z.B. Mitglieder der Src-Familie binden und ihre Aktivierung fördern (*Ichaso und Dilworth, 2001*). Im MMTV-PyVMT-Modell wurde gezeigt, dass diese Aktivierung von c-Src für die Entwicklung von PyVMT-induzierten Brusttumoren *in vivo* notwendig ist (*Guy et al., 1994*). Eine erhöhte Aktivität von c-Src wird dabei auch in vielen humanen Brustkarzinomen beobachtet und trägt durch die Beeinflussung verschiedenster tumorfördernder Signalwege und Prozesse entscheidend zur Tumorprogression bei. Diese erhöhte Aktivität von c-Src in Brusttumoren ist jedoch selten auf eine aktivierende Mutation bzw. eine erhöhte Expression von c-Src zurückzuführen (*Ishizawa und Parsons, 2004*). Eine interessante Beobachtung ist dabei, dass CD24, das als aktivitätsfördernder Interaktionspartner

von c-Src gilt, ebenfalls in vielen Brustkarzinomen stark exprimiert ist (Fogel et al., 1999; Kristiansen et al., 2003a; Bircan et al., 2006; Lim und Oh, 2005).

Das APC^{+1572T}-Modell

Das Protein APC (Adenomatous Polyposis Coli) ist in die Regulation des Wnt-Signalweges involviert, und für die Inaktivierung von β -Catenin verantwortlich. Die Deregulation des Wnt-Signalweges und der Funktion von β -Catenin sind von großer Bedeutung für die Tumorigenese, weshalb APC als Tumorsupressor gilt. Mutationen im APC-Gen stellen daher oftmals ein frühes Ereignis insbesondere in der Entstehung von Darmtumoren dar und sind in der Mehrheit aller sporadischen Kolorektalkarzinome zu finden. Tritt eine Mutation des APC-Gens in Zellen der Keimbahn auf, kann es zur Entstehung einer erblichen Form von Darmtumoren, der Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP) kommen (Gaspar und Fodde, 2004).

Zur Erforschung der Rolle von APC in der Tumorentstehung wurden verschiedene APC-Tumormodelle generiert. Ihnen gemeinsam sind Mutationen im APC-Gen, welche die Expression verschiedener, verkürzter APC-Proteinvarianten und damit den tumorsuppressiven Funktionsverlust von APC zur Folge haben. Dadurch kommt es beispielsweise im APC^{+Min}-Modell hauptsächlich zur Entwicklung von Darmtumoren, im APC^{+1572T}-Modell unter anderem zur Entstehung von Brust- und Lebertumoren (Gaspar und Fodde, 2004).

Zielsetzung dieser Arbeit

CD24 ist als nahezu ubiquitär exprimiertes Protein beschrieben, seine Rolle ist bislang jedoch nur für wenige Gewebe bzw. Zelltypen bekannt. Dies gilt auch für das Brustgewebe, in dem die CD24-Expression zur Identifikation und Isolation von Brustepithelstammzellen herangezogen wird.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Expression und Funktion von CD24 in der Mausbrustdrüse um damit Erkenntnisse über die Rolle von CD24 in diesem Gewebe zu erlangen. In diesem Zusammenhang ist insbesondere auch die Frage nach der funktionellen Rolle von CD24 auf Mausbruststammzellen von Bedeutung. Durch die Erforschung von CD24 in der normalen Brustphysiologie soll damit zu einem besseren Verständnis der Brustbiologie beigetragen werden.

In einem weiteren Ansatz soll die tumorassoziierte Rolle von CD24 genauer erforscht werden. Hierzu sollen verschiedene Maustumormodelle charakterisiert und die mögliche funktionelle Beteiligung von CD24 an der Tumorprogression untersucht werden.

Material und Methoden

Material

Antikörper

Ratte Anti-Maus CD24, Klon M1/69	Becton Dickinson, Heidelberg
Maus Anti-glattes Muskelaktin (ascites fluid)	Sigma, Taufkirchen
Ziege Anti-Ratte Alexa 546	Molecular Probes/Invitrogen (USA)
Ziege Anti-Maus Alexa 488	Molecular Probes/Invitrogen (USA)
Kaninchen Anti-Ratte HRP	DAKO, Glostrup, Dänemark
Kaninchen Anti-Ratte FITC	DAKO, Glostrup, Dänemark
Kaninchen Anti-Ratte Biotin	DAKO, Glostrup, Dänemark

Seren, Medien und Zellkulturartikel

Einfrierröhrchen	Greiner, Nürtingen
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe
Kaninchenserum	DAKO, Glostrup, Dänemark
RPMI-1640	Gibco BRL, Eggenstein
Ziegenserum	DAKO, Glostrup, Dänemark
Zellkulturschalen/flaschen	Greiner, Nürtingen

Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid/ N,N-Methylenbisacrylamid (37,5:1; Roth, Karlsruhe Rotiphorese 30)	
Agarose	Biozym Diagnostik, Hameln
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Bacto-Agar	Difco-Laboratories, Augsburg
Bacto-Trypton	Difco-Laboratories, Augsburg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg

Material und Methoden

Calciumacetat-Hydrat	Fluka, Neu-Ulm
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma, Taufkirchen
Denhardts	Sigma, Taufkirchen
Desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTPs)	PeqLab, Erlangen
Dexamethason	Sigma, Taufkirchen
D-Glucose	Roche Diagnostics, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Neu-Ulm
Dithiothreitol (DTT, f. Reverse Transkription)	Gibco BRL, Eggenstein
EDTA (Ethylen-diamin-tetraacetat)	Roth, Karlsruhe
Eisessig	Merck, Darmstadt
Eosin	Roth, Karlsruhe
Epidermal Growth Factor (EGF)	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Formaldehyd (37 %)	Merck, Darmstadt
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glyzerin (86%)	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Hämatoxyllin-Lösung	Sigma, Taufkirchen
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Herings-bzw. Lachssperma DNA	Sigma, Taufkirchen
Insulin (bovine pancreas)	Sigma, Taufkirchen
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Karminrot	Sigma, Taufkirchen
Lubrol	Uniqema, Schottland
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid (MgCl)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Roth, Karlsruhe

Methylenblau	Fluka, Neu-Ulm
Methylsalicylat	Sigma, Taufkirchen
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-tetramethylenethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40 (NP40)	Fluka, Neu-Ulm
PBS	Gibco BRL, Eggenstein
PeqGold	PeqLab, Erlangen
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Polyvinylalkohol	Sigma, Taufkirchen
Prolactin	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Sigma, Taufkirchen
Puromycin	Cayla, Toulouse, Frankreich
RNA-Ladepuffer	Sigma, Taufkirchen
SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat)	Roth, Karlsruhe
SSC (Standard Saline Citrate)	Roth, Karlsruhe
Tris-Base bzw. Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Tween20	Roth, Karlsruhe
[32P]-dCTP (370 Mbq/ml)	Perkin Elmer, Maanstrat, Belgien

Verwendete Kits

Biotin-Blockierungskit	DAKO, Glostrup, Dänemark
ECL Western Blotting detection reagents	Amersham, Freiburg
Fuchsin (Farbsubstrat)	DAKO, Glostrup, Dänemark
Levamisol (Alk. Phos. Inhibitor)	DAKO, Glostrup, Dänemark
Microspin Säulchen	Amersham, Freiburg
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Düsseldorf
Rediprime Random Primer Labeling Kit	Amersham, Freiburg
Vectastain Alkalische Phosphatase Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wizard PCR clean up kit	Promega, Heidelberg

Enzyme, Reaktionspuffer und Größenstandards

Ein Großteil der Enzyme und Reaktionspuffer wurde von der Firma Promega, Mannheim bezogen. Das Enzym NheI als auch der Molekulargewichtsstandard für die Protein-Gelelektrophorese wurden von New England Biolabs (NEB), Frankfurt bezogen. Der Molekulargewichtsstandard für die DNA-Gelelektrophorese stammte von PeqLab, Erlangen.

Geräte und sonstige Verbrauchsmaterialien

Axio-Cam	Carl Zeiss, Jena
Beckmann Swingout Zentrifuge	Beckmann, Stuttgart
Beckmann Zentrifuge J2-HS	Beckmann, Stuttgart
Binokular (Wild)	Carl Zeiss, Jena
Cryostat	Leica, Bensheim
Deckgläser	Labonord, Mönchengladbach
Durchflusszytometer FACS-can	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme	Kodak, New Haven, USA
Gene Porter™ Transfektionsreagenz	PeqLab, Erlangen
Greiner-Röhrchen	Greiner, Nürtingen
Hybond N+ Nylon-Membran	Amersham, Freiburg
Hyperfilm XR (MP & ECL)	Amersham, Freiburg
Immunfluoreszenzmikroskop Axiovision 2000	Carl Zeiss, Jena
Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Laufkammern für DNA-und Proteingele	PeqLab, Erlangen
Menzel Superfrost Objektträger	Labonord, Mönchengladbach
Nanodrop	PeqLab, Erlangen
Neubauer Zählkammer	VWR, Bruchsal
OCT	Labonord, Mönchengladbach
PCR-Cycler, MJ-Research	Biozym, Oldendorf
PVDF Immobilon P-Membran	Millipore, Eschbronn
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Stuttgart

Ultra-Thorax	IKA Labortechnik, Staufen
UV-crosslinker	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Western Blot Transferkammern	BioRad Laboratories, München
Whatmann 3MM-Filterpapier	Bender und Hobein, Karlsruhe

Plasmide, Primer und Sequenzierung

CD24 silencing DNA-Oligos	Metabion, Martinsried
Genotypisierungsprimer	Proligo, Frankreich
	Metabion, Martinsried
Oligo-dT Primer (RT-PCR)	Gibco BRL, Eggenstein
Sequenzierung von Plasmiden	GATC, Konstanz
pMSG-CD24-Vektor	Arbeitsgruppe Sleeman, ITG
pSuperRetro-Vektor	Oligo Engine, Seattle, USA
β-Casein Sonde	Arbeitsgruppe Sleeman, ITG

Bezugsquelle der in dieser Arbeit verwendeten Mausstämmen

B6,Tg(TRAMP)8247Ng(T/+):	Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA)
CD24 knock-out Mäuse:	Peter Altevogt (DKFZ Heidelberg)
FVB/MMTV-PyVMT-Mäuse:	Eugene Lukanidin (Danish Cancer Society, Copenhagen, Dänemark)
B6/APC ^{+1572T} :	Ricardo Fodde (Erasmus University Medical Center, Niederlande)
C57Bl/6J (Wildtyp):	ITG, FZK Karlsruhe
Balb/c (nude):	Charles Rivers Laboratories (Wilmington, USA)

Mikrosatelliten-DNA-Analyse von Mausstämmen

Die Reinheitsbestimmung des genetischen Hintergrundes der in dieser Arbeit verwendeten Mausstämmen wurde bei der Firma Elchrom Scientific AG, Cham, Schweiz in Auftrag gegeben. Die Analyse umfasste 96 Bl/6 stammspezifische DNA-Mikrosatellitenmarker.

Methoden

Histologische Methoden und Präparation von Geweben

Immunhistochemie/Immunfluoreszenz

Für den immunhistologischen Nachweis von CD24 auf Gewebeschnitten wurden Gefrierschnitte hergestellt. Hierzu wurde das entnommene Gewebematerial (z.B. Tumor oder normales Brustdrüsengewebe etc.) in OCT auf Trockeneis eingebettet und bis zur Verwendung als Gefrierblock bei -80°C gelagert. Vor der Herstellung der Schnitte wurden die Blöcke ca. 1 Stunde im Cryostaten auf Schneidetemperatur äquilibriert (z.B. Brust: -27 bis -30°C). Die eingestellte Schnittdicke betrug je nach Art des Gewebes zwischen 8 und 12 μm . Die Schnitte wurden auf Menzel Superfrost plus Objektträger aufgezogen, über Nacht im Kühlschrank gelagert und am folgenden Tag in kaltem Aceton (100%) für 10 - 15 Minuten auf Eis fixiert. Im Anschluss daran wurden unspezifische Bindestellen abgesättigt (10 - 15 Minuten bei RT mit PBS mit 10% Ziegerserum, 1% FCS und 1% Kaninchenserum = Blockierungslösung).

Für die Visualisierung des Antigens wurden z.T. unterschiedliche Methoden verwendet, z.B. Detektion des Antigens durch fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (Immunfluoreszenz) bzw. durch Enzym-vermittelte Farbreaktion („normale“ Immunhistochemie). Die für die jeweilige Methode verwendeten Protokolle sind im Folgenden aufgeführt:

Immunfluoreszenz-Methode

Nach dem Blockieren wurde/n der/die Primärantikörper (Ratte Anti-Maus CD24, Klon M1/69 in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ und Maus Anti-glattes Muskelaktin in einer Verdünnung von 1:500, beide Antikörper in Blockierungslösung; Inkubation beider Antikörper gleichzeitig möglich) für 1 Stunde bei RT (oder wahlweise über Nacht bei 4°C) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Schnitte mit PBS/0,05% TritonX100 wurden die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper 30 Minuten bei RT eingesetzt (Ziege Anti-Ratte Alexa 488 sowie Ziege Anti-Maus Alexa 546 1:1000 in PBS, entspricht einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$). Zur Färbung der Zellkerne wurde

parallel dazu DAPI (Verdünnung von 1:1000, entspricht einer Konzentration von 10 µg/ml) verwendet. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Schnitte mit PVA (Polyvinylalkohol-basiertes, mit PBS angesetztes Eindeckmedium) und Deckgläsern versiegelt und bis zur Analyse lichtgeschützt und trocken aufbewahrt.

Immunhistochemie-Methode

Nach dem Blockieren unspezifischer Proteinbindestellen wurde ein Biotin-blockierungsschritt durchgeführt. Dieser soll verhindern, dass später zusätzlich zum Biotin-markierten Sekundärantikörper potentiell vorhandenes gewebeeigenes Biotin vom Avidin-Anteil des chromogenumsetzenden Enzyms erkannt und bei der Farbreaktion ein falsch-positives Signal verursacht wird. Die Absättigung von gewebeeigenem Biotin wurde durch ein Biotin-Blockierungskit erreicht.

Die Inkubation des Primärantikörpers (Anti-Maus CD24, Klon M1/69 in einer Konzentration von 1 µg/ml in Blockierungslösung) erfolgte für 1 Stunde bei RT (oder wahlweise über Nacht bei 4°C). Nach mehrmaligem Waschen der Schnitte mit PBS/0,05% TritonX100 wurde ein Biotin-gekoppelter Sekundärantikörper (Ziege Anti-Ratte Biotin, 1:600, entspricht einer Konzentration von 1,16 µg/ml) für 30 Minuten bei RT inkubiert. Während dieser Zeit wurde der Enzymkomplex vorbereitet (alkalische Phosphatase). Anschließend wurde erneut mehrfach gewaschen und der Enzymkomplex für weitere 30 Minuten bei RT auf den Schnitten inkubiert. Nach dem Waschen wurde das aufbereitete Farbsubstrat (Fuchsin, inklusive Levamisol als Inhibitor endogener Alkalischer Phosphatase-Aktivität) auf die Schnitte pipettiert und bis zum Eintritt einer Farbreaktion inkubiert. Nach kurzem Waschen in PBS und H₂O dest. erfolgte die Gegenfärbung mit Meyers Hämatoxyllin-Lösung. Die Schnitte wurden mit PVA und Deckgläsern versiegelt und bis zur Analyse lichtgeschützt und trocken aufbewahrt.

Whole mount Präparation

Für die Herstellung von whole mount Präparaten wurde Mäusen die vierte Brustdrüse (inguinale Brustdrüse) entfernt, auf einem Glasobjektträger flach ausgebreitet und über Nacht bei RT in Methanol, Chloroform und Eisessig (Mischungsverhältnis 6:3:1) fixiert. Die Präparate wurden für mehrere Stunden in 70% Ethanol überführt, kurz in H₂O dest. gespült und anschließend in Karminrot-

Lösung gefärbt. Danach wurden die Präparate schrittweise in 70%, 95% sowie 100% Ethanol entfärbt und zur Klärung sowie Langzeitaufbewahrung in Methylsalicylat überführt.

Karminrot-Lösung: 0,2% Karminrot, 10,5 mM Aluminiumkaliumsulfat

DNA-Methoden

Herstellung kompetenter Bakterien

1. Chemisch kompetente Bakterien:

Zur Herstellung chemisch kompetenter wurden die Bakterienstämme auf einer LB-Agarplatte ohne Selektionsantibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurden 100 ml LB-Medium (ohne Selektionsantibiotika) mit einem Einzelklon der Platte angeimpft und unter Schütteln (300 rpm) über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 800 ml LB-Medium mit der Vorkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 - 0,4 unter Schütteln inkubiert. Nach Abkühlung der Bakterien auf Eis wurden sie anschließend für 10 Minuten bei 3500 g und 4°C abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mit eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung gewaschen (10 ml pro 50 ml Ausgangskultur) und in eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert (10 ml pro 50 ml Ausgangskultur). Nach 1 Stunde Inkubationszeit auf Eis wurden die Bakterien erneut zentrifugiert und in 1/30 bis 1/50 des Originalvolumens in 50 mM CaCl₂-Lösung mit 15% Glycerin resuspendiert. 50 - 100 µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2. Elektrokompente Bakterien:

1 ml SOB-Medium (ohne Selektionsantibiotika) wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (300 rpm) inkubiert. 300 ml SOB-Medium (ohne Selektionsantibiotika) wurden mit dieser Vorkultur angeimpft und bei 18 - 20°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 - 0,4 inkubiert. Anschließend wurde die gesamte Kultur für 5 Minuten bei 37°C inkubiert

(„Hitzeschock“) und dann für weitere 20 Minuten bei 18 - 20°C inkubiert. Die Bakterienlösung wurde anschließend zentrifugiert (3500 g, 10 Minuten, 4°C) und das Pellet in 50 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Dieser Vorgang wurde insgesamt drei mal durchgeführt, bevor dann das Pellet in 800 µl eiskaltem Wasser mit 7% DMSO resuspendiert, in 40 µl Aliquots verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Die elektrokompetenten Bakterien wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

SOB-Medium: 1% Bacto-Trypton; 0,25% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 25 mM KCl

Transformation von kompetenten Bakterien

Durch sogenannte Transformation können DNA-Moleküle (z.B. Plasmide) in Bakterien eingebracht werden, um diese dann als „Wirt“ zur Vermehrung der transformierten DNA zu nutzen. Aufgrund der kurzen Generationszeit (für *E.coli* z.B. 20 Minuten) erhält man innerhalb weniger Stunden die gewünschte DNA in ausreichender Menge.

Üblicherweise wurden die *E.coli*-Stämme XL-1, XL-1 blue und DH5 α verwendet. Zur Vermehrung des pSuperRetro-Vektors wurde der speziell für hairpin-Vektoren geeignete *E.coli*-Stamm GT116 verwendet (Invitrogen).

1. Transformation elektrokompetenter Bakterien:

Für jeden Transformationsansatz wurde ein bei -80°C aufbewahrtes Aliquot des entsprechenden Bakterienstammes langsam auf Eis aufgetaut. 10 - 100 ng DNA wurden zur Bakteriensuspension pipettiert und diese dann in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Mit Hilfe eines Elektroporationsgerätes wurde eine Spannung von 1,6 kV angelegt, welche zur kurzfristigen Porenbildung in der Bakterienmembran führt, über die die DNA-Moleküle aufgenommen werden. Direkt im Anschluss an die Elektroporation wurde die Bakteriensuspension mit 1 ml SOC-Medium versehen und in einem Eppendorfgefäß für ca. 1 - 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Regenerationsphase wurden die Bakterien pelletiert (3 Minuten, 2500 rpm) und in 100 - 200 µl LB-Medium resuspendiert.

Verschiedene Mengen an Suspension wurden auf Ampicillin-haltigen (50 - 100 µg/ml) LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2. Transformation chemisch kompetenter Bakterien:

Nach Auftauen des Aliquots auf Eis wurden 10 - 100 ng DNA zur Bakteriensuspension pipettiert, diese durchmischt und für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock durchgeführt (90 Sekunden bei 42°C). Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien sofort für weitere 5 Minuten auf Eis transferiert bevor 1 ml LB-Medium hinzugegeben und die Kultur für 1 Stunde bei 37°C und 230 rpm geschüttelt wurde. Anschließend wurde wie für die Transformation elektrokompetenter Bakterien beschrieben verfahren.

Kulturmedien für Bakterien:

LB-Medium:	1% Bacto-Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl
LB-Agar:	1% Bacto-Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; 1,5% Bacto-Agar
SOC-Medium:	1% Bacto-Trypton; 0,25% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 25 mM KCl; 2 mM MgSO ₄ ; 2 mM MgCl; 4 mM Glucose

Plasmid-DNA Minipräparation

Einzelbakterienkolonien wurden in jeweils 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsmarker (z.B. Ampicillin 50 -100 µg/ml) über Nacht bei 37°C und 230 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml der Kultur in ein Eppendorfgefäß überführt und für 3 Minuten bei 3000 rpm in einer Eppendorf bzw. Heraeus-Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl Puffer P1 resuspendiert, mit 200 µl Puffer P2 (= Lysispuffer) versetzt und gut durchmischt. Nach 5 Minuten Inkubation bei RT wurde die Lyse mit 150 µl kaltem Puffer P3 und 5 Minuten Inkubation auf Eis gestoppt. Anschließend wurde das Bakterienlysat für 15 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand vollständig in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Aus dem Überstand wurde durch Zugabe von 1 ml 100% Ethanol und Inkubation bei -20°C für 20 Minuten die enthaltene Plasmid-DNA gefällt. Nach Zentrifugation (30 Minuten, 14.000 rpm, 4°C) wurde das DNA-Pellet mit kaltem, 70%igem Ethanol gewaschen, anschließend bei RT für einige Minuten getrocknet

und dann in 50 - 80 µl H₂O dest. oder TE-Puffer (pH 8,0) gelöst. Alle für die Minipräparation verwendeten Puffer (P1 - P3) stammen aus dem QIAGEN Maxi-Kit.

Puffer P1: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A

Puffer P2: 0,2 M NaOH, 1% SDS

Puffer P3: 3 M Kalium-Acetat, (pH 5,5)

TE-Puffer: 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) ; 10 mM EDTA (pH 8,0)

(10 x, pH 8,0)

Plasmid-DNA Maxipräparation

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab wurden 150 - 200 ml LB-Medium inklusive Selektionsantibiotikum mit dem gewünschten Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C und 230 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die gesamte Bakterienkultur bei 5.000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge). Das Bakterienpellet wurde in 10 ml Puffer P1 resuspendiert, anschließend in 10 ml Puffer P2 für 5 Minuten bei RT lysiert und nach Zugabe von 10 ml kaltem Puffer P3 für weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (9.000 rpm, 30 Minuten, 4°C) wurden die ausgefallenen Proteine sowie durch die Lyse entstandene Bakterienzelltrümmer pelletiert, wonach das geklärte Plasmid-haltige Lysat auf eine mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-tip AX-500-Säule gegeben wurde. Das weitere Vorgehen erfolgte laut Herstellerprotokoll. Die von der Säule eluierte Plasmid-DNA wurde mit dem 0,7-fachen Volumen an 100% Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (9.000 rpm, 30 Minuten, 4°C; Beckman Swingout Zentrifuge) pelletiert. Nach Waschen mit 70% Ethanol und kurzer Trocknung wurde das DNA-Pellet in H₂O dest. oder TE-Puffer (pH 8,0) gelöst.

Fällung von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren aus einer gegebenen Lösung auszufällen wurde diese mit 1/10 ihres Volumens an 3 M Natriumacetat (pH 4,8 - 5,2) sowie mit dem 2,5 fachen Volumen an 100% Ethanol versetzt. Die Fällung wurde durch Inkubation bei -20°C (20 Minuten bis mehrere Stunden oder über Nacht) unterstützt und die DNA für 30 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit

70% Ethanol gewaschen und nach Trocknung in H₂O dest. oder TE-Puffer (pH 8,0) gelöst.

Phenol-Chloroform-Extraktion

Um Nukleinsäuren von Kontaminationen mit z.B. Proteinen zu reinigen wurde die DNA-Lösung mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Mischungsverhältnis 25:24:1) versetzt und durch vortexen gemischt. Durch 20 - 30 minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm und RT wurden die beiden Phasen (wässrige und organische Phase) vollständig voneinander getrennt, wobei die Proteine in der sogenannten Interphase verbleiben. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und erneut mit dem gleichen Volumen an Chloroform versetzt. Nach wiederholter Zentrifugation wurde die in der oberen Phase enthaltene DNA in einem neuen Eppendorfgefäß ausgefällt (siehe Fällung von Nukleinsäuren).

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von gelösten Nukleinsäuren (DNA bzw. RNA) wurde mittels spektralphotometrischer Methode bestimmt. Nukleinsäuren weisen ein typisches Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm auf, was einer Nukleinsäurehaltigen Lösung ihre sogenannte optische Dichte (OD) verleiht. Eine OD₂₆₀-Einheit von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA bzw. 40 µg/ml für RNA.

Verunreinigungen von Nukleinsäurelösungen mit z.B. Proteinen oder Phenol verursachen eine weitere Absorption bei 280 nm. Über das Verhältnis der OD₂₆₀ zur OD₂₈₀ lässt sich der Grad der Verunreinigung ermitteln. Reine Nukleinsäurelösungen besitzen im Fall von DNA einen Wert von 1,8 und bei RNA einen Wert von 2,0. Die Messung von Nukleinsäurekonzentrationen wurde am Nanodrop durchgeführt.

Elektrophoretische Auftrennung von DNA

DNA-Fragmente verschiedener Größe wurden mittels Elektrophorese in 0,7 - 1,5%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die entsprechende Menge an Agarose wurde mit 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und nach Abkühlen auf ca. 60°C mit

3 µl Ethidiumbromidlösung pro 100 ml Gel-Volumen versetzt (= 30 µg Ethidiumbromid). Die Gel-Lösung wurde in die mit dem Probenkamm vorbereitete Laufkammer gegossen und nach Erstarren mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Die mit DNA-Ladepuffer versehenen DNA-Proben wurden nach Beladen der Geltaschen durch Anlegen einer Spannung von 60 - 90 Volt im Gel aufgetrennt. Da Ethidiumbromid in die DNA-Struktur interkaliert und im UV-Bereich fluoresziert, können die einzelnen DNA-Fragmente im UV-Licht sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert werden.

TAE-Puffer (1 x) : 40 mM Tris (pH 8,3); 40 mM Natriumacetat ; 2 mM EDTA (pH 8,0)
 DNA-Ladepuffer: 10 mM EDTA; 10% Glycerin; 0,1% SDS; 0,02% Bromphenolblau

Aufreinigung/Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für verschiedenste Zwecke (z.B. Klonierung oder Gewinnung von Hybridisierungs-Sonden für Northern Blot Analyse) ist es notwendig, DNA-Fragmente nach ihrer Auftrennung im Agarosegel aus diesem zu extrahieren und aufzureinigen. Dafür wurde ein Extraktionskit (Wizard PCR clean up kit) benutzt. Die Extraktion erfolgte laut Herstellerprotokoll.

Allgemeiner Restriktionsverdau von DNA

Für einen Restriktionsverdau wurde die gewünschte Menge an DNA mit einer für das Enzym geeigneten Pufferlösung versehen. Pro µg DNA wurden 2 - 3 Units an Enzym eingesetzt, wobei der Anteil des durch die Enzymlösung eingebrachten Glycerins nicht mehr als 10% des kompletten Verdauvolumens betrug. Der Ansatz wurde bei der für das Enzym empfohlenen Temperatur (üblicherweise 37°C) für 1 Stunde inkubiert, anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht dokumentiert. Bei größeren Mengen an DNA (z.B. 10 µg) wurde der Verdau für mehrere Stunden bzw. über Nacht durchgeführt.

Klonierung des CD24pSuperRetro-Vektors zur stabilen RNA-Interferenz (RNAi)

Neben der transienten RNA-Interferenz (RNAi), welche nur einen zeitlich begrenzten Effekt vermitteln kann, besteht die Möglichkeit mittels sogenannter hairpin-Vektoren eine dauerhafte RNA-Interferenz in Zellen herbeizuführen. Durch Transfektion und

anschließende Selektion wird der hairpin-Vektor mit dem entsprechenden siRNA-Oligo (hier vorliegend als doppelsträngige DNA-Sequenz) stabil im Genom eukaryontischer Zellen verankert. Vorteil der stabilen RNA-Interferenz ist die Auswahl von Klonen, die den größtmöglichen knock-down des gewünschten Proteins zeigen. Für die Klonierung eines solchen hairpin-Vektors zum Zweck der stabilen RNAi von CD24 wurde das von der Firma Oligo Engine (Seattle, USA) entwickelte pSuper-System benutzt, welches unter anderem den pSuperRetro-Vektor beinhaltet. Eine zuvor in transienten Transfektionen als wirksam ermittelte CD24 siRNA-Sequenz wurde als einzelsträngiges DNA-Oligo (sense und antisense) zur Synthese in Auftrag gegeben. Das Oligo umfasst die siRNA-Sequenz inklusive die für die Klonierung in den pSuperRetro-Vektor benötigten Schnittstellensequenzen am 5'- bzw. 3'-Ende (Bgl II und HindIII) sowie eine hairpin-Sequenz, welche sense und antisense-Sequenz voneinander trennt.

Zunächst wurden 10 µg pSuperRetro-Vektor mit HindIII und Bgl II verdaut, was zur Entfernung der sogenannten ‚stuffer‘-Sequenz (1 kb Länge) führte. Nach Aufreinigung des Restriktionsverdau über ein 1% TAE-Gel und anschließender Extraktion der linearisierten Vektor-Bande aus dem Gel erfolgte die Dephosphorylierung des Vektors mit SAP (= Shrimp Alkaline Phosphatase; Reaktion mit 40 µl aufgereinigtem Vektor, 5 µl SAP und 5 µl 10 x SAP-Puffer, Inkubation bei 37°C für 30 Minuten, anschließend Inaktivierung der SAP bei 65°C für 15 Minuten). Die Vektor-DNA wurde ausgefällt und das Pellet in 15 µl H₂O dest. gelöst.

Die einzelsträngigen CD24-Oligos (sense und antisense) wurden vor der Ligation in einer ‚annealing‘-Reaktion miteinander verbunden. In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden jeweils 3 µg beider einzelsträngiger Oligos zusammen mit annealing-Puffer (50 mM HEPES pH 7,4; 100 mM NaCl) für 1 - 2 Minuten bei 94°C inkubiert und anschließend langsam auf RT abgekühlt. Um die Ligation in den dephosphorylierten Vektor zu ermöglichen, wurden die nun doppelsträngigen Oligos phosphoryliert (44 µl Oligos aus der zuvor durchgeführten annealing-Reaktion, 5 µl 10 x T4-Polynukleotidkinasepuffer, 1 µl T4 Polynukleotidkinase; 30 Minuten bei 37°C). Für die Ligation wurden 0,5 µg des dephosphorylierten Vektors mit 2 µl an phosphorylierten, doppelsträngigen Oligos, 1 µl 10 x Ligasepuffer und 1 µl T4-Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 µl über Nacht bei RT ligiert. Die Ligationsreaktion wurde in den chemisch kompetenten *E.coli*-Stamm GT116 transformiert (4 µl Ligationsansatz in 50 µl Bakteriensuspension). Verschiedene Mengen an Suspension wurden auf LB-

mit Hilfe eines Ultra-Thorax weiter aufgeschlossen. Nach kurzer Inkubation bei RT wurde das Lysat mit 0,2 ml Chloroform pro eingesetztem ml peqGold versetzt und mehrere Sekunden gevortext. Die anschließende Zentrifugation (15 Minuten, 10.500 rpm, 4°C) führte zur Phasentrennung, wonach die in der oberen, wässrigen Phase enthaltene RNA mit jeweils 0,5 ml 100% Isopropanol pro ursprünglich eingesetztem ml peqGold ausgefällt wurde. Die Fällung wurde durch 1 bis 2-stündige Inkubation auf Eis unterstützt. Nach erneuter Zentrifugation (15 Minuten bei 10.500 rpm und 4°C) wurde das RNA-Pellet mit RNase-freiem, 70% Ethanol gewaschen, in RNase-freiem, destilliertem Wasser gelöst und bei -80°C gelagert.

2. RNA-Gewinnung aus Zellen:

Zur Gewinnung von RNA aus Gewebekulturzellen wurde das Medium sorgfältig abgesaugt und die peqGold-Lösung ohne vorheriges Waschen der Zellen auf den Monolayer pipettiert (sterile Einmalplastikpipetten). Das Zell-Lysat wurde in ein Greiner-Röhrchen überführt und mittels Ultra-Thorax aufgeschlossen. Im Anschluss wurde wie für die Isolierung von RNA aus Gewebe bereits beschrieben verfahren.

Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Für die Reverse Transkription wurde Gesamtzell-RNA aus Mausbrustgewebe zunächst einem DNase-Verdau unterzogen. Dieser Schritt entfernt genomische DNA, welche als Kontamination bei der RNA-Präparation auftreten kann.

In einem Endvolumen von 10 µl wurden 5 µg Gesamtzell-RNA zusammen mit 1 µl 10 x DNase-Puffer und 5 µl RQ1-DNase (5 Units) zunächst für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Der DNA-Verdau wurde durch Zugabe von 1 µl DNase stop solution und 10 Minuten Inkubation bei 65°C beendet. Anschließend wurde die Reaktion mit H₂O dest. auf 100 µl aufgefüllt und die RNA mit 250 µl 100% Isopropanol und 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) über Nacht bei -20°C wieder gefällt. Nach Zentrifugation (30 Minuten bei 14.000 rpm, 4°C) wurde das Pellet mit 70% RNase-freiem Ethanol gewaschen und nach kurzer Trocknung in 10 µl RNase-freiem, destilliertem Wasser gelöst. Für die anschließende Reverse Transkription (RT) wurde die gelöste RNA gleichermaßen auf zwei Eppendorfgefäße aufgeteilt und folgendermaßen behandelt:

Für die + RT-Reaktion sowie für die - RT-Reaktion wurden jeweils 5 µl Gesamtzell-RNA zusammen mit 1 µl Oligo-dT primer und 6 µl H₂O dest. (Endvolumen 12 µl) 10 Minuten bei 70°C denaturiert und anschließend kurz auf Eis gelagert. Jeder Ansatz wurde mit 4 µl first strand buffer (5 x), 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl dNTP-Mix (10 mM) versetzt und für 2 Minuten bei 42°C inkubiert.

Durch Zugabe von 1 µl Superscript II (= Reverse Transkriptase) in die + RT-Reaktion (nicht in die - RT-Reaktion, diese dient als Kontrolle) wurde die Reverse Transkription gestartet. Die cDNA-Synthese wurde bei 42°C für 50 Minuten durchgeführt und dann für 15 Minuten bei 70°C gestoppt. Nach kurzer Lagerung auf Eis wurde jeder Ansatz mit H₂O dest. auf 50 µl aufgefüllt und entweder direkt für PCR-Reaktionen eingesetzt oder bei -20°C aufbewahrt.

Northern Analyse

1. Northern Gel:

Für die Expressionsanalyse mittels Northern Blot wurde ausschließlich Gesamtzell-RNA (total RNA) in einer Menge von 10 µg eingesetzt. Alle Proben wurden mit 1/3 Volumen RNA-Ladepuffer (Endvolumen der Probe: 30 µl) versehen, 10 Minuten bei 70°C denaturiert und anschließend über ein 1%iges, formaldehydhaltiges, mit 1 x MOPS-Puffer angesetztes Agarosegel bei mittlerer Spannung (40 - 50 Volt) für mehrere Stunden aufgetrennt.

MOPS-Puffer (10 x):	200 mM MOPS (pH 7,0); 20 mM Natriumacetat (pH 4,8); 10 mM EDTA
RNA-Gel:	1% Agarose in 1 x MOPS und 6% Formaldehyd
RNA-Ladepuffer:	62,5% deionisiertes Formamid; 1,14 M Formaldehyd; 1,25 x MOPS-EDTA-Natriumacetat Puffer; 200 µg/ml Bromphenolblau; 200 µg/ml Xylencyan; 50 µg/ml Ethidiumbromid; (Sigma)

2. Northern Blot:

Nach erfolgter Auftrennung wurde die RNA mittels Kapillartransfer aus dem Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N+) übertragen. Als Transfermedium wurde 20 x SSC-Puffer (pH 7,0) verwendet. Die Transferdauer betrug mindestens 12 - 16 Stunden. Nach dem Transfer wurde die RNA durch UV-Bestrahlung auf der Membran fixiert (cross-linking) und zur Überprüfung der gleichmäßigen Spurbeladung mit Methyleneblaulösung gefärbt (Entfärben mit H₂O dest.).

SSC-Puffer: 3 M NaCl; 0,3 M Natriumacetat
Methyleneblaulösung: 0,04% Methyleneblau; 0,5 M Natriumacetat (pH 5,2)

3. Herstellung von Sonden für die Northern Hybridisierung:

Für Northern Hybridisierung eingesetzte DNA-Sonden wurden entweder durch PCR aus cDNA (für die Cytokeratin 18- und CD52-Sonde) oder durch Restriktionsverdau von Plasmiden (für CD24-Sonde) generiert. Die β -Casein Sonde wurde von Frau Dr. Baumann (Arbeitsgruppe Sleeman, ITG) bereitgestellt.

Herstellung der CD24 Northern-Sonde mittels Restriktionsverdau

10 μ g des Plasmids pMSG-CD24 wurden mit den Enzymen NheI und XhoI bei 37°C für mehrere Stunden bzw. über Nacht verdaut. Anschließend wurde der Verdau über ein 1%iges TAE-Agarosegel aufgetrennt und das entsprechende Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert (siehe Extraktion von DNA aus Agarosegelen).

Herstellung der Cytokeratin 18-Sonde und der CD52-Sonde mittels PCR aus cDNA

Cytokeratin 18-Sonde:

Jeweils 1 μ l Cytokeratin 18 forward-primer (mCK18for, 10 pMol/ μ l), 1 μ l Cytokeratin 18 reverse-primer (mCK18rev, 10 pMol/ μ l) sowie 10 μ l GoTaq-Polymerasepuffer (5 x), 0,5 μ l dNTPs (10 mM), 1 μ l GoTaq-Polymerase und 1 μ l cDNA (aus Mausbrustgewebe) wurden in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und mit H₂O dest. auf ein Endvolumen von 50 μ l aufgefüllt.

CD52-Sonde:

Jeweils 1 µl CD52 forward-primer (mCD52for, 10 pMol/µl), 1 µl CD52 reverse-primer (mCD52rev, 10 pMol/µl) sowie 10 µl GoTaq-Polymerasepuffer (5 x), 0,5 µl dNTPs (10 mM), 1 µl GoTaq-Polymerase und 1 µl cDNA (aus Mausbrustgewebe) wurden in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und mit H₂O dest. auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt.

Primer für Cytokeratin 18 (Maus):

mCK18for: 5' GCT ACC TAG ACA AGG TGA AGA GC 3'

mCK18rev: 5' GCC AGC TCT GAC TCC AGA TGC 3'

Primer für CD52 (Maus):

mCD52for: 5' GCC CAG GAA GAT TTC AGG ATG AA 3'

mCD52rev: 5' GCT GCG CCT TCA CCT CAG CTG A 3'

PCR-Programme:

	T_{m1}	T_{m2}	T_a	T_s	Zyklen	E
CK18	94°C, 1 Minute	94°C, 1 Minute	65°C, 30 Sekunden	72°C, 1 Minute 30 Sekunden	33	72°C, 5 Minuten
CD52	94°C, 1 Minute	94°C, 1 Minute	60°C, 1 Minute	72°C, 1 Minute	34	72°C, 5 Minuten

T_{m1}: initiale Schmelztemperatur

T_{m2}: Schmelztemperatur template/primer

T_a: annealing-Temperatur der primer

T_s: Synthesetemperatur

E: finale Verlängerungszeit (Extension)

Das PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel aufgereinigt und war nach der Extraktion aus dem Gel als Sonde für die Northern Analyse einsetzbar.

4. Northern Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA-Sonde:

Zu Beginn wurde die Membran mit Northern-Hybridisierungspuffer (je nach Größe der Membran 10 - 20 ml) bei 65 - 68°C inkubiert, wobei unspezifische Bindestellen durch Zugabe von aufgekochter/denaturierter (95°C, 5 Minuten) Herings- bzw. Lachssperma-DNA abgesättigt wurden. Diese sogenannte Prähybridisierung erfolgte für mindestens 30 Minuten bis einige Stunden. Für die anschließende Hybridisierung wurden je nach Größe der Membran 25 - 50 ng DNA-Sonde eingesetzt, welche mit Hilfe eines Kits (redi-prime) wie im Folgenden beschrieben radioaktiv markiert wurde: nach 5-minütigem Aufkochen bei 95°C wurde die Sonde für 2 Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend zum Markierungsmix (enthält Klenow-Enzym, alle dNTPs außer dCTP, Puffer, etc.) pipettiert. Nach Zugabe von ³²P-markiertem dCTP (pro Sonde 50 µCi) wurde die Reaktion je nach Basenpaarlänge für 10 - 25 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Hinzufügen von 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) wurde die Markierungsreaktion gestoppt und die Sonde anschließend über eine Säule aufgereinigt (Microspin-column). Nach 5-minütigem Aufkochen der aufgereinigten Sonde bei 95°C und kurzem Abkühlen auf Eis wurde die Sonde zusammen mit der Membran über Nacht bei 65 - 68°C unter Rotation inkubiert.

Northern-Hybridisierungspuffer: 6 x SSC; 5 x Denhardts; 0,5% SDS
Herings- bzw. Lachssperma-DNA: 10 mg/ml (Endkonzentration: 0,1 mg/ml)

Zellkultur, Transfektion und in vitro-Differenzierung von HC11-Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchte kultiviert. Sämtliche Arbeiten an und mit Zellen erfolgten - wenn notwendig - unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumbank.

Verwendete Medien

HC11: RPMI/10% FCS (hitze-inaktiviert), 5 µg/ml Insulin
Stabile HC11 RNAi-Klone: RPMI/10% FCS (hitze-inaktiviert), 5 µg/ml Insulin
+ 6 µg/ml Puromycin

Auf die Zugabe von Penicillin und Streptomycin wurde verzichtet.

Passagieren von Zellen

Zur Erhaltung der Zellen in Kultur wurden adhärenente Zellen kurz mit PBS (w/o Ca/Mg) gewaschen und mit Hilfe einer 0,25%igen Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C von der Kulturschale/flasche abgelöst. Dieser Vorgang wurde nach einigen Minuten durch Zugabe von Vollmedium abgestoppt und die Zellsuspension wurde in der gewünschten Verdünnung auf neue Kulturgefäße verteilt.

Einfrieren von Zellen

Zur Langzeitlagerung von Zelllinien wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in Vollmedium aufgenommen und zentrifugiert (1.300 rpm, 3 Minuten). Das erhaltene Zellpellet wurde in 90% FCS mit 10% DMSO resuspendiert, in Einfrierröhrchen aliquottiert und bei -80°C aufbewahrt.

Auftauen von Zellen

Die gefrorene Zellsuspension wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, und anschließend schnellstmöglich in Kulturmedium überführt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension 3 Minuten bei 1.300 rpm abzentrifugiert, in frischem, vorgewärmtem Medium aufgenommen und in einer der Zellpelletgröße entsprechenden Kulturschale bzw.-flasche ausgesät.

Stabile Transfektion von HC11-Zellen

Die Zellen wurden am Tag zuvor auf 15 cm-Schalen ausgesät und am nächsten Tag (80 - 90% Konfluenz) mit dem Transfektionsreagenz Gene Porter™ nach Angaben des Herstellers transfiziert.

Dazu wurden in einem Reaktionsgefäß 15 µg Plasmid-DNA in 5 ml serumfreiem Medium verdünnt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 80 µl Gene Porter™ in ebenfalls 5 ml serumfreiem Medium verdünnt. Die Ansätze wurden vereint und zur Komplexbildung für ca. 30 Minuten bei RT inkubiert. Vor der Transfektion wurden die Zellen kurz mit serumfreiem Medium gewaschen und dann mit dem Transfektionsmix für 3 - 5 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml RPMI/20% FCS wurde die normale Endkonzentration von 10% FCS im Medium eingestellt. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit frischem Kulturmedium

versehen und nach einem weiteren Tag auf insgesamt zehn 10 cm-Schalen verteilt. Am darauf folgenden Tag wurde Selektionsmedium (RPMI/10% FCS, 5 µg/ml Insulin und 6 µg/ml Puromycin) eingesetzt, was nach mehreren Tagen zum Absterben der untransfizierten und zum Heranwachsen von erfolgreich transfizierten, isolierten Einzelzellklonen führte.

In vitro-Differenzierung von HC11-Zellen

Die aus der murinen Brustepithelzelllinie Comma-D hervorgegangene HC11-Linie (Ball et al., 1988) wurde für die *in vitro*-Differenzierung ausgehend von einer 50%igen Konfluenz zunächst für zwei bis drei Tage in An- bzw. Abwesenheit von 10 ng/ml EGF kultiviert. Nach Erreichen der 100%igen Konfluenz wurden die Zellen mit RPMI/2% FCS und 5 µg/ml Insulin für zwei Tage gehungert. Die Induktion der Differenzierung erfolgte durch Zugabe von Dexamethason (Endkonzentration: 0,1 µM) und Prolactin (Endkonzentration 5 µg/ml) in RPMI/2% FCS und 5 µg/ml Insulin. Nach vier Tagen wurde das Medium durch frisches Induktionsmedium ersetzt und die Zellen wurden für weitere vier Tage inkubiert. Nach Abschluss der Differenzierung wurde das Medium durch RPMI/2% FCS mit 5 µg/ml Insulin und 10 ng/ml EGF ersetzt. Gesamtzell-RNA als auch Protein-Lysat wurde von HC11-Zellen im subkonfluenten (in An- bzw. Abwesenheit von EGF kultiviert), im konfluenten (in An- bzw. Abwesenheit von EGF kultiviert), im gehungerten, als auch im differenzierten Zustand (8 Tage nach Induktion), sowie zwei Tage nach Abschluss der Differenzierung präpariert.

*Proteinbiochemische Methoden*Präparation von Protein-Lysaten aus HC11 Zellen

Vor der Herstellung von Protein-Lysaten wurden die Zellen in den genannten Differenzierungsstadien kurz mit PBS (w/o Ca/Mg) gewaschen, anschließend mit PBS/10 mM EDTA geerntet und gezählt. Jeweils 1×10^6 Zellen wurden in 100 μ l eiskaltem Lysispuffer für 30 Minuten auf Eis lysiert, mehrmals mit einer 26G-Nadel/Kanüle geschert und mit 100 μ l 2 x Laemmli-Probenpuffer (nicht-reduzierend und ohne SDS!) versetzt.

Lysispuffer: 1% Lubrol; 25 mM HEPES (pH 7,4); 150 mM NaCl; 10 mM MgCl;
1 mM PMSF
2 x Laemmli-Probenpuffer: 125 mM Tris (pH 6,8); 20% Glycerin

Protein-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der in den Lysaten befindlichen Proteine wurde ein 10%iges SDS-freies Polyacrylamid-Gel benutzt. Die Lysate wurden für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht und die Zelldebris sowie ausgefallene Proteine kurz bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass CD24 auch nach dem Erhitzen im Überstand des Lysats verbleibt und somit mittels Western Blot detektiert werden kann. Pro Tasche wurden 100 μ l Lysat (entspricht 500.000 Zellen) geladen. Nach der Auftrennung wurden die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen (Western Blot).

Trenngel: 10% Acrylamid; 0,32% N,N-Methylenbisacrylamid; 375 mM Tris-HCl (pH 8,8);
0,1% APS; 0,1% TEMED
Sammelgel: 4% Acrylamid; 0,1% N,N-Methylenbisacrylamid; 125 mM Tris-HCl (pH 6,8);
0,1% APS; 0,1% TEMED
Laufpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 0,1% SDS

Western Blot

Nach der Auftrennung im Polyacrylamidgel wurden die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen (Western Blot). Hierzu wurde das Gel zwischen insgesamt 6 Lagen mit Blottingpuffer getränkten Whatman Filterpapieren luftblasenfrei auf die zuvor mit 100% Methanol aktivierte PVDF-Membran gelegt. Der Aufbau (Sandwich) wurde in einer speziellen Vorrichtung fixiert und in einer mit Transferpuffer gefüllten Transferkammer eingespannt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes (25 - 35 Volt) wurden die Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert (über Nacht, bei 4°C).

Transferpuffer: 48 mM Tris-Base, 39 mM Glyzin, 10% Methanol

Western Blot Analyse von CD24

Nach dem Blotten wurden unspezifische Bindestellen auf der Membran durch 30-minütige Inkubation mit Milchpuffer abgesättigt und der CD24-Antikörper (Ratte Anti-Maus CD24, Klon M1/69) in einer Konzentration von 1 µg/ml in Milchpuffer für 48 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen des Blots mit Milchpuffer wurde der Meerrettichperoxidase-gekoppelte Sekundärantikörper (Kaninchen Anti-Ratte HRP) in einer Verdünnung von 1:1.000 (entspricht einer Konzentration von 1,3 µg/ml) in Milchpuffer für weitere 1 - 2 Stunden bei RT inkubiert.

Danach wurde der Blot drei mal mit Milchpuffer und anschließend noch drei mal mit TBS-Puffer gewaschen, bevor die Proteinbanden mit Hilfe von ECL (Amersham) und dem Chemolumineszenz-Verfahren sichtbar gemacht wurden.

Milchpuffer: 4% Magermilchpulver (Hersteller Saliter) in TBS-Puffer mit 0,5% Tween 20

TBS: 20 mM Tris; 150 mM NaCl; (pH 7,6)

Sonstige Methoden

CD24 FACS-Färbung und anschließende Analyse

Für die Detektion von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie (FACS) wurden adhärente Zellen kurz mit PBS (w/o Ca/Mg) gewaschen und anschließend mit PBS/10 mM EDTA bei 37°C von der Schale abgelöst. Nach kurzer Zentrifugation (3 Minuten, 1.300 rpm, 4°C) wurden die Zellen in einer 96-well Rundbodenplatte in 50 - 100 µl PBS/10% FCS inklusive Primärantikörper (Ratte Anti-Maus CD24, Klon M1/69, 5 µg/ml) resuspendiert und 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit kaltem PBS/10% FCS wurden die Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Kaninchen Anti-Ratte FITC, 1:120) für weitere 30 Minuten bei 4°C inkubiert, bevor sie nach erneutem 3-maligem Waschen analysiert wurden (FACS-can, Becton Dickinson). Erfolgte die Messung nicht direkt im Anschluss, wurden die Zellen in Formalin (3,7%ige, PBS-gepufferte Formaldehyd-lösung) für 10 - 15 Minuten im Dunkeln bei RT fixiert und bis zur Messung lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt.

Transplantation von Brustgewebe in epithelfreies Empfängerbrustgewebe

Die Transplantation von murinen Brustgewebestücken nach der Methode von Young (*Young L.J.T., 2000*) wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Jean-Paul Thiéry und Marina Glukhova am Institut Marie Curie in Paris durchgeführt.

Zunächst wurde 16 Wochen alten CD24 *-/-* (knock-out) Mäusen und 12 Wochen alten weiblichen C57Bl/6J-Mäusen (Wildtyp, Kontrolle) unter sterilen Bedingungen operativ ein Stück Brustgewebe mit darin enthaltenen Brustdrüsengängen entfernt und bis zum Transfer in die Empfänger-Maus in sterilem Medium auf Eis aufbewahrt. Als Empfänger für die Gewebestücke dienten 3 Wochen alte weibliche Nacktmäuse des Stammes Balb/c. Diese wurden vor dem Eingriff anästhesiert und unter sterilen Bedingungen eröffnet. Nach Freilegung der inguinalen Brust (Brustdrüse Nr. 4) wurde das endogene Drüsengewebe unter Zuhilfenahme eines Kauters entfernt. Dieses sogenannte „fat pad clearing“ ist wichtig, da es sonst zu einer Vermischung der heranwachsenden Brustepithelgänge des Empfängergewebes mit den ebenfalls frisch auswachsenden Epithelgängen des Spendergewebes kommt und eine eindeutige Zuordnung später nicht mehr möglich ist.

Nach Entfernung des betreffenden Gewebes wurde im verbliebenen fat pad (Brustfettgewebe) eine kleine Tasche geschaffen, in die das Spendergewebe eingebettet wurde. Jede Balb/c Empfängermaus erhielt - aus ventraler Sicht - in das linke inguinale fat pad Spendergewebe einer Wildtypmaus und in das rechte inguinale fat pad Spendergewebe einer CD24 ^{-/-} Maus. Danach wurde der Schnitt mit einer Naht verschlossen und die Mäuse wurden bis zum Erwachen auf eine Wärmeplatte gelegt. Um das Auswachsen neuer Drüsengänge und den Grad der Besiedlung des Fettgewebes des Empfänger fat pads zu dokumentieren, wurden 9 Wochen nach der Operation whole mounts der Transplantate von 3 Balb/c-Spendermäusen präpariert.

Zur Überprüfung der Kompetenz zur funktionellen Differenzierung des Spendergewebes wurden Transplantate von 3 erfolgreich verpaarten Balb/c Mäusen im letzten Drittel der Schwangerschaft auf die Ausbildung charakteristischer Strukturen wie Alveoli untersucht. Zusätzlich wurden von einigen Transplantaten Gefrierschnitte einer CD24-Färbung unterzogen, was die eindeutige Identifikation des Gewebes (Wildtyp-Transplantat zeigt Färbung des Drüsenepithels, CD24 k.o.-Transplantat zeigt keine Färbung) ermöglicht.

Genotypisierung genetisch veränderter Mausstämme

Der Genotyp (Transgen bzw. knock-out) genetisch veränderter Mausstämme wurde durch sogenannte tail-PCR mit spezifischen Primern bestimmt. Hierzu wurde den Tieren zunächst die Schwanzspitze entfernt und in Lysispuffer über Nacht bei 55°C verdaut. Da die Art der Lyse und anschließende Aufbereitung der Probe zum Teil einen Einfluss auf die Qualität der PCR hatte, wurden je nach Genotypisierung unterschiedliche Lysispuffer und Aufbereitungsmethoden eingesetzt.

- Lysispuffer für Genotypisierung von MMTV-PyVMT- und APC^{+1572T}-Mäusen:

PBND-Puffer: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,5); 2,5 mM MgCl₂·6H₂O; 0,1 mg/ml Gelatine; 0,45% v/v NP40; 0,45% v/v Tween 20; 100 ng/ml Proteinase K

Jede Probe wurde in 200 µl PBND-Puffer über Nacht bei 55°C verdaut, danach für 10 - 15 Minuten im Wasserbad aufgeköcht (Inaktivierung der Proteinase K) und nach dem Abkühlen als template für die PCR eingesetzt.

- Lysispuffer für Genotypisierung der Verpaarung von TRAMP- mit CD24 knock-out Mäusen:

SNET-Puffer: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 5 mM EDTA (pH 8,0); 400 mM NaCl; 1% SDS, Proteinase K

Jede Probe wurde in 400 µl SNET-Puffer inklusive Proteinase K über Nacht bei 55°C verdaut, danach mit 400 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, mehrfach invertiert und für 30 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit und RT abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 2,5 Volumeneinheiten 100% Isopropanol gefällt. Danach wurde die DNA für 30 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C pelletiert, in 70% Ethanol gewaschen und nach kurzer Trocknung in 50 µl H₂O dest. gelöst (mehrere Stunden bei 4°C). Aus dieser DNA-Lösung wurden mit H₂O dest. Verdünnungen angesetzt (1:100 bis 1:200), welche als template für die PCR dienten.

TRAMP-Mäuse aus der Verpaarung mit CD24 knock-out Mäusen

Um CD24-defiziente TRAMP-Mäuse zu erzeugen, wurden zunächst transgene TRAMP-Tiere mit CD24 ^{-/-} Tieren verpaart. Alle Tiere der F1-Generation waren somit für das CD24-Allel heterozygot, bzw. trugen ein CD24 knock-out Allel. Aus der F1 wurde dann in einem Intercross aus einem für TRAMP transgenen und für CD24 heterozygoten Tier (T/⁺, CD24 +/-) mit einem für TRAMP nicht transgenen und für CD24 heterozygoten Tier (T/⁻, CD24 +/-) eine Verpaarung angesetzt, so dass in einem Teil der F2-Generation ein vollständiger CD24 knock-out transgener TRAMP-Mäuse erreicht wurde.

Mögliche Genotypen in der F2-Generation der Verpaarung von TRAMP mit CD24 ^{-/-}

Nicht transgen für TRAMP, Wildtyp für CD24:	T/ ⁻ , CD24 +/+
Nicht transgen für TRAMP, heterozygot für CD24:	T/ ⁻ , CD24 +/-
Nicht transgen für TRAMP, knock-out für CD24:	T/ ⁻ , CD24 -/-
Transgen für TRAMP, normaler Wildtyp für CD24:	T/ ⁺ , CD24 +/+
Transgen für TRAMP, heterozygot für CD24:	T/ ⁺ , CD24 +/-
Transgen für TRAMP, knock-out für CD24:	T/ ⁺ , CD24 -/-

Verwendete Genotypisierungsprimer

TRAMP:

MCCaseinF (forward), interne Kontrolle 5' GAT GTG CTC CAG GCT AAA GTT 3'
McaseinR (reverse), interne Kontrolle 5' AGA AAC GGA ATG TTG TGG AGT 3'
Tagrev (Transgen) 5' CTC CTT TCA AGA CCT AGA AGG TCC A 3'
PB1for (Transgen) 5' CCG GTC GAC CGG AAG CTT CCA CAA GTG CAT TTA 3'

CD24 Wildtypallel:

X62pcr3 (forward) 5' GGC CAT GGG CAG AGC GAT GG 3'
X62ko2 (reverse) 5' AAA GAC TTT GCC CCT CCT 3'
MCCaseinF (forward) und McaseinR (reverse) als interne Kontrolle (siehe TRAMP)

CD24 knock-out-Allel

X62ko1 (forward) 5' CCT AGG TCC GGT TGG ATG 3'
X62ko2 (reverse) 5' AAA GAC TTT GCC CCT CCT 3'
MCCaseinF (forward) und McaseinR (reverse) als interne Kontrolle (siehe TRAMP)

MMTV-PyVMT:

PymT3p (Transgen) 5' CGG CGG AGC GAG GAA CTG AGG AGA G 3'
PymT4m (Transgen) 5' TCA GAA GAC TCG GCA GTC TTA GGC G 3'
Plg-in2-3' (interne Kontrolle) 5' TGT GGG CTC TAA AGA TGG AAC TCC 3'
Plg-ex2-5' (interne Kontrolle) 5' GAC AAG GGG ACT CGC TGG ATG GCT A 3'

APC^{+/1572T}

APC-C2 5' GGA AAA GTT TAT AGG TGT CCC TTC T 3'
APC-A3 5' CTA GCC CAG ACT GCT TCA AAA T 3'
APC-pN3 5' GCC AGC TCA TTC CTC CAC TC 3'

PCR-Programme für die Genotypisierung:

Mausmodell	Tm1	Tm2	Ta	Ts	Zyklen	E
TRAMP	94°C, 1 Minute	94°C, 1 Minute	58°C, 2 Minuten	72°C, 3 Minuten	35	72°C, 5 Minuten
APC^{+1572T}	94°C, 2 Minuten	94°C, 30 Sek.	58°C, 30 Sek.	72°C, 1 Minute	33	72°C, 5 Minuten
PyVMT	94°C, 1 Minute	94°C, 45 Sek.	60°C, 45 Sek.	72°C, 45 Sek.	33	72°C, 10 Minuten
CD24 -/- (k.o. Allel)	94°C, 1 Minute	94°C, 40 Sek.	56°C, 30 Sek.	72°C, 1 Minute 20 Sek.	35	72°C, 5 Minuten
CD24 -/- (Wildtypallel)	94°C, 1 Minute	94°C, 1 Minute	60°C, 30 Sek.	72°C, 30 Sek.	32	-

Tm1: initiale Schmelztemperatur

Tm2: Schmelztemperatur template/primer

Ta: annealing-Temperatur der primer

Ts: Synthesetemperatur

E: finale Verlängerungszeit (Extension)

Alle PCR-Reaktionen zur Genotypisierung wurden in einem Endvolumen von 25 µl durchgeführt. Für jede Reaktion wurden je 0,6 µl der jeweiligen primer (10 pMol/µl), 5 µl Taq-Polymerase Puffer (5 x), 0,5 µl dNTPs (10 mM), 0,25 µl GoTaq-Polymerase und 2 - 3 µl template pipettiert und mit H₂O dest. aufgefüllt.

Die PCR-Produkte wurden anschließend im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht dokumentiert.

PCR-Produkte

TRAMP	interne Kontrolle (Casein-Gen):	500 bp
	TRAMP-Transgen:	600 bp
CD24 Wildtypallel	interne Kontrolle (Casein-Gen):	500 bp
	Wildtypallel:	160 bp
CD24 k.o.-Allel	interne Kontrolle (Casein-Gen):	500 bp
	knock-out-Allel:	1100 bp
MMTV-PyVMT	interne Kontrolle:	268 bp
	PyVMT-Transgen:	160 bp
APC ^{+1572T}	Wildtypbande:	180 bp
	mutiertes APC-Gen:	250 bp

Mikrosatelliten DNA-Analyse zur Bestimmung der Reinheit des genetischen Hintergrundes

Das TRAMP-Modell, das APC^{+1572T}-Modell, sowie die CD24 ^{-/-} Mäuse wurden ursprünglich auf einem C57Bl/6-Mausstammhintergrund generiert, allerdings sind bedingt durch Inzuchthaltung genetische Unterschiede zwischen den von verschiedenen Instituten und auch kommerziell erwerbbaaren Bl/6-Kolonien möglich (genetischer Drift). Zur Vereinheitlichung des genetischen Hintergrundes (und der späteren Vergleichbarkeit der Ergebnisse) wurden daher alle in dieser Arbeit verwendeten Maus-Modelle auf den im Institut für Toxikologie und Genetik vorhandenen Bl/6-Hintergrund rückgekreuzt. Dies war insbesondere für das MMTV-PyVMT-Modell notwendig, das ursprünglich auf einem FVB-Hintergrund generiert worden war und daher einen komplett anderen Mausstamm darstellt. Der Fortschritt der Rückkreuzungen wurde auf genetischer Ebene regelmäßig durch PCR-basierte DNA-Mikrosatelliten-Analyse von Bl/6-stammspezifischen genetischen Markern überprüft (durchgeführt und ausgewertet von Elchrom Scientific, Cham, Schweiz). Im Anschluss an jede Analyse konnten dann diejenigen Tiere mit den geringsten Unterschieden zum institutseigenen Bl/6-Stamm für die weitere, gezielte Rückkreuzung ausgewählt werden.

Ergebnisse

Analyse der CD24-Expression in der Mausbrustdrüse

CD24 RNA-Expression

Um einen ersten Überblick über das Expressionsmuster von CD24 zu gewinnen, wurden verschiedene Organe einer adulten Maus (acht Wochen alt) mittels Northern Blot analysiert. Eine CD24-spezifische DNA-Sonde wurde zur Detektion der mRNA-Transkripte eingesetzt. Von den untersuchten Organen exprimiert die überwiegende Zahl (Niere, Lunge, Speicheldrüse, Brustdrüse, Milz und Uterus) variierende Mengen an CD24. In Herz und Leber ist keine CD24-Transkription festzustellen (Abbildung 4). Dieses Expressionsmuster stimmt mit jenem aus der Ratte überein (Akashi *et al.*, 1994). Die mRNA für CD24 besitzt in ihrem 3'-untranslatierten Ende ein zweites, alternatives Polyadenylierungssignal, wodurch zwei Transkripte mit unterschiedlicher Länge generiert werden können (Zhou *et al.*, 1998). Beide Transkripte wurden nachgewiesen, wobei die größere mRNA-Sequenz vorherrschend ist.

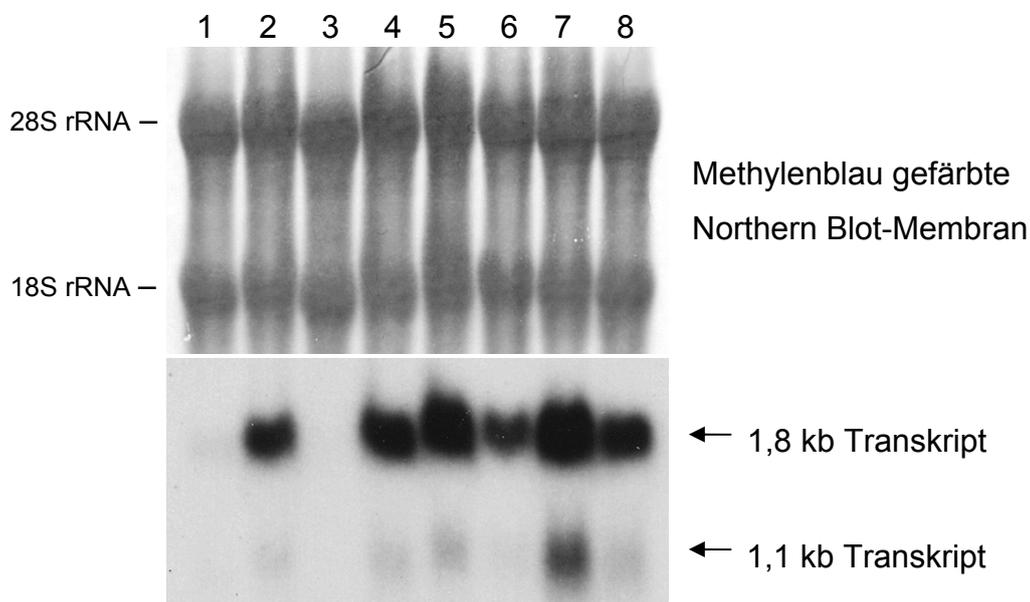


Abbildung 4. CD24 mRNA-Expression in verschiedenen Organen der Maus. 10 µg Gesamt-RNA verschiedener Gewebe aus der Maus wurden über ein Northern-Gel aufgetrennt, auf eine Membran gebロットet und zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung mit Methylenblau gefärbt. CD24 mRNA wurde über eine spezifische, radioaktiv markierte cDNA-Sonde detektiert.

1 = Herz, 2 = Niere, 3 = Leber, 4 = Lunge, 5 = Speicheldrüse, 6 = Brustdrüse, 7 = Milz, 8 = Uterus

Zu den Geweben mit aktiver CD24-Transkription zählt auch die Mausbrustdrüse, in welcher innerhalb dieser Arbeit die Funktion von CD24 genauer untersucht werden soll.

Eine Fragestellung war, ob sich die Expression von CD24 zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung und des Wachstums der Brust verändert, was erste Hinweise auf die Funktion von CD24 liefern könnte. Wichtige Entwicklungsphasen sind die Zeit vor der Pubertät (Zeitpunkt der Geburt bis zum Alter von vier Wochen), die Pubertät (ab einem Alter von ca. vier Wochen bis ca. acht Wochen) und die vollständige Geschlechtsreife (ab ca. acht Wochen). Allerdings hat sich gezeigt, dass die RNA-Analyse für diese Art der Fragestellung nicht geeignet ist. Die Gesamt-RNA der Brust stellt eine Mischung aus RNAs verschiedener Zelltypen (Epithel, Fettzellen, Stroma) dar, wobei der Anteil jedes Zelltyps vom jeweiligen Entwicklungszustand der Brust abhängig und daher veränderlich ist. Durch einen in der pubertären Wachstumsphase steigenden Gehalt an Epithelzellen könnte so beispielsweise die Regulation eines epithelspezifischen Transkripts vorgetäuscht werden. Dieser Effekt konnte in dieser Arbeit beispielhaft an Hand von Cytokeratin 18, einem von luminalen Epithelzellen exprimierten Marker (*Taylor-Papadimitrou et al., 1987*), demonstriert werden. Die Expression von Cytokeratin 18 scheint in der Pubertät stark zu steigen, ist aber auf eine wachstumsbedingte Zunahme des Epithelanteils der Brust zurückzuführen. Ein ähnliches Bild ergab sich in der Northern Analyse auch für CD24 (siehe Abbildung 5), dessen vermeintliche Regulation daher auf dem selben Effekt zu beruhen scheint.

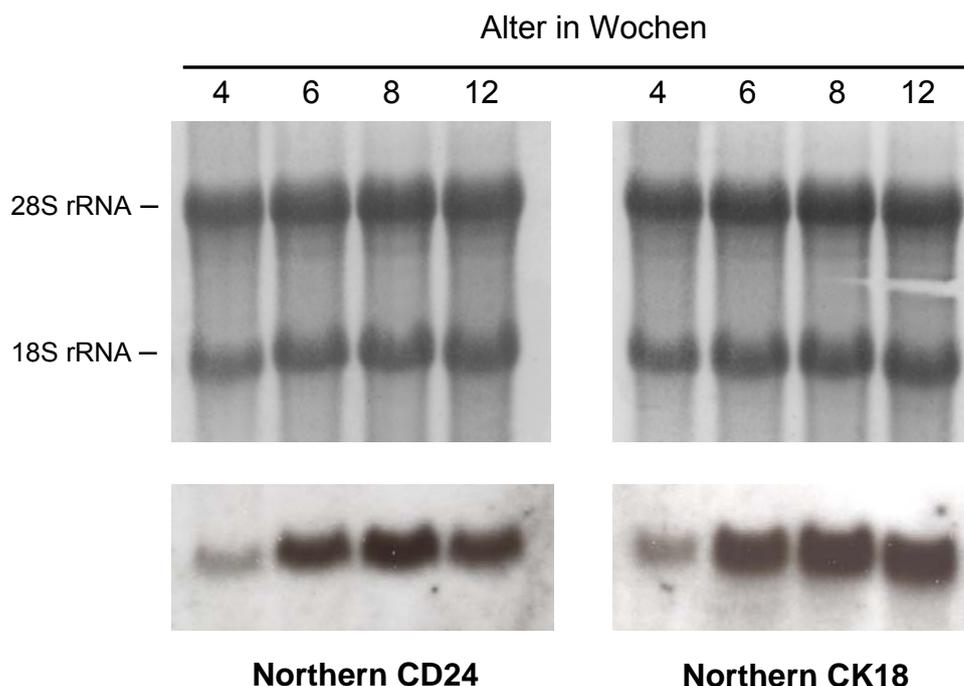


Abbildung 5. Northern Analyse der CD24- und Cytokeratin 18-Expression (CK18) im Brustgewebe von Mäusen verschiedenen Alters. 10 µg Gesamt-RNA aus Brustgewebe wurden über ein Northern-Gel aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung mit Methylenblau gefärbt. CD24-mRNA und CK18-mRNA wurden mittels spezifischer, radioaktiv markierter cDNA-Sonden detektiert. Der vermeintliche Anstieg der CK18-Expression als auch der CD24-Expression ist durch den in der Pubertät stark zunehmenden epithelialen Anteil der Brust zu erklären.

Immunhistologische Analyse der CD24-Proteinexpression in der Mausbrust

Für eine zuverlässige Aussage über den aktuellen Expressionsstatus von CD24 in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Brust ist die Untersuchung auf Proteinebene notwendig. Zur Expressionsanalyse von CD24 in der Mausbrustdrüse wurden daher immunhistologische Methoden angewendet. Dadurch kann die Expression eines Proteins durch Erhaltung der morphologischen Struktur im Gesamtkontext eines Gewebes untersucht werden.

Für die Untersuchung wurden zwei unterschiedliche Methoden zum Vergleich herangezogen. Zum einen wurden die Schnitte durch enzymvermittelte Umsetzung eines Farbsubstrates, zum anderen mittels Immunfluoreszenz gefärbt.

Da Brustdrüsengänge aus zwei unterschiedlichen Epitheltypen (Myoepithel und luminales Epithel) aufgebaut sind (*Richert et al., 2000*), wurde zudem untersucht, ob CD24 in beiden oder bevorzugt in einer der beiden Epithelschichten exprimiert ist. Beide Schichten können durch die Expression von Markerproteinen eindeutig identifiziert werden. Neben dem von luminalen Epithelzellen exprimierten Cytokeratin 18 (*Taylor-Papadimitrou et al., 1987*), sind Myoepithelzellen durch die Expression von glattem Muskelaktin charakterisiert (*Radnor, 1972*). In der Immunfluoreszenzanalyse wurde eine Doppelfärbung mit einem CD24-Antikörper und einem Antikörper gegen glattes Muskelaktin durchgeführt.

Darüber hinaus wurde die CD24-Expression auch in den Terminal End Buds untersucht, welche in der Pubertät durch ihre Stammzellaktivität für das Wachstum und die Entwicklung der Drüsengänge verantwortlich sind (*Richert et al., 2000*).

Die Spezifität des CD24-Antikörpers wurde durch das Mitführen einer Isotypkontrolle als auch durch Färbung von Gewebeschnitten aus CD24 k.o.-Mäusen verifiziert (Daten nicht gezeigt). In den folgenden Abbildungen sind die Resultate der histologischen Untersuchungen zusammengefasst.

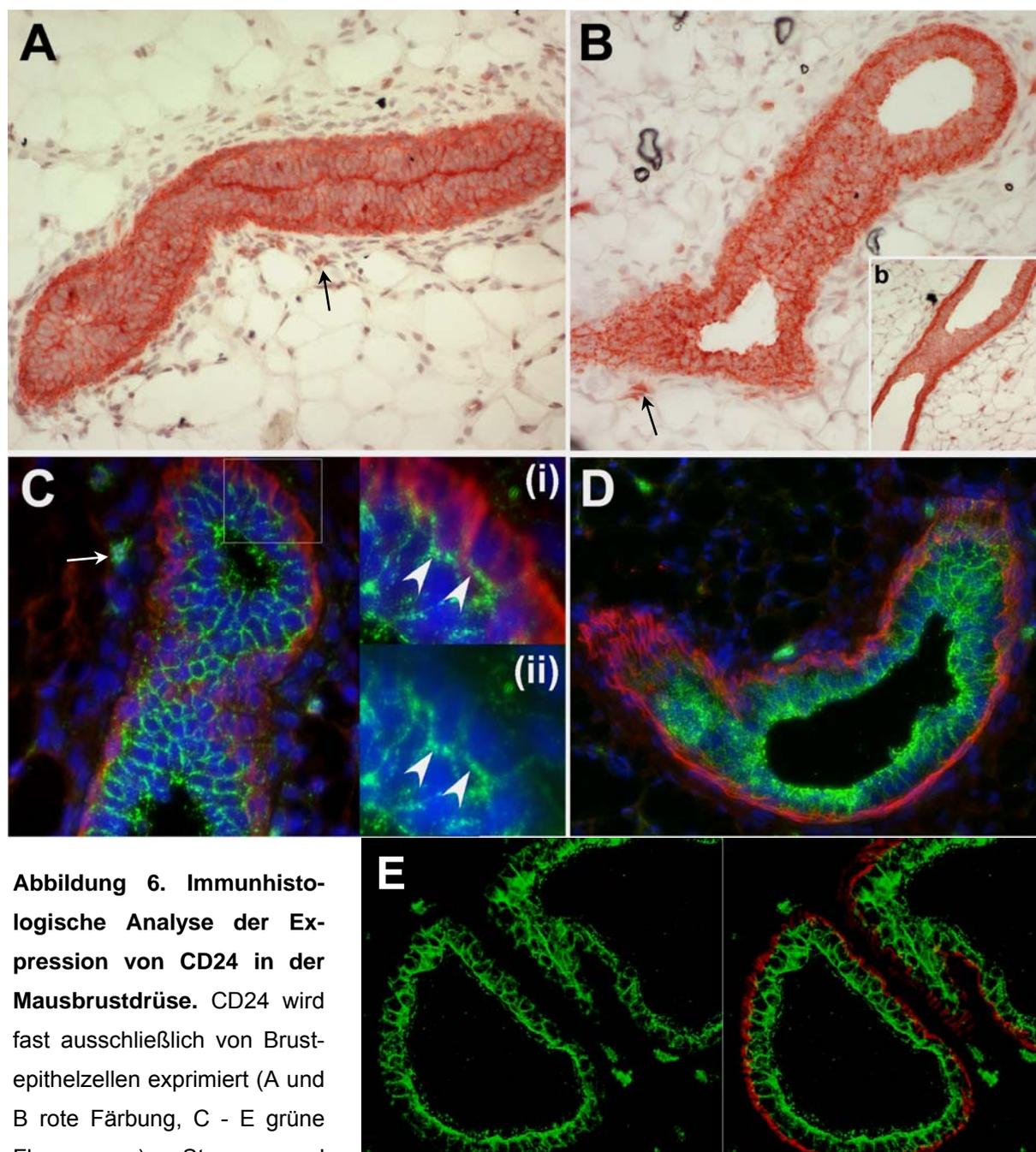


Abbildung 6. Immunhistologische Analyse der Expression von CD24 in der Mausbrustdrüse. CD24 wird fast ausschließlich von Brustepithelzellen exprimiert (A und B rote Färbung, C - E grüne Fluoreszenz); Stroma und Adipozyten sind CD24-negativ; Ausnahme sind migratorische hemopoetische Zellen (Pfeil in A, B und C). Die in C, D und E dargestellte Immunfluoreszenzanalyse zeigt die Verteilung der CD24-Expression innerhalb der Brustepithelschichten. Luminales Epithel weist eine starke CD24-Expression auf, im durch glattes Muskelaktin gekennzeichneten Myoepithel (rote Fluoreszenz) ist die CD24-Expression nicht eindeutig nachweisbar (E). Suprabasale Zellen zeigen eine polarisierte, apikale Expression von CD24 (C (i) und (ii), Pfeilspitzen). Allgemein bleibt die Expression von CD24 während der Pubertät konstant. A und C: vier Wochen alte Brust, prä-pubertär; B, b, D und E: sechs Wochen alte Brust, pubertär.

Grüne Fluoreszenz = CD24, rote Fluoreszenz = glattes Muskelaktin, blaue Fluoreszenz = DAPI, Färbung der Zellkerne

Grüne Fluoreszenz = CD24, rote Fluoreszenz = glattes Muskelaktin, blaue Fluoreszenz = DAPI, Färbung der Zellkerne

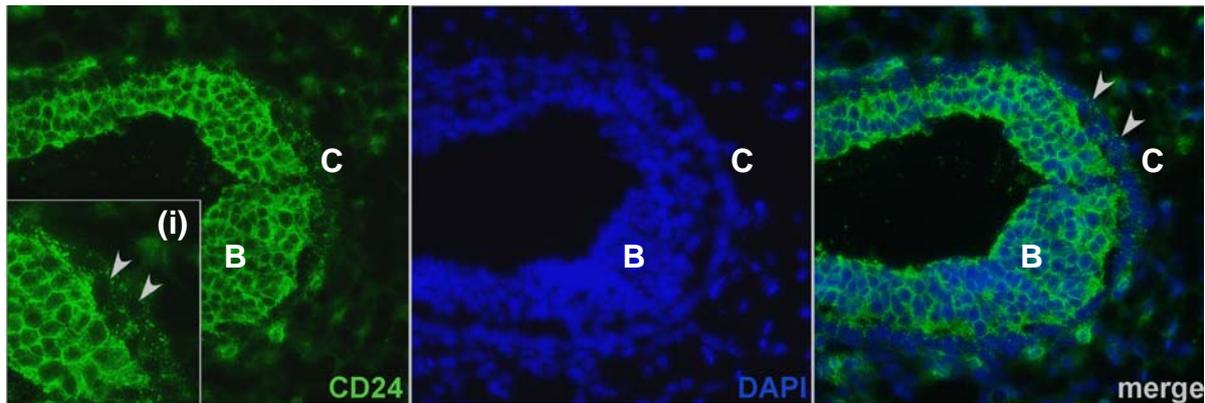


Abbildung 7. Differenzielle CD24-Färbung in einem Terminal End Bud einer vier Wochen alten Brustdrüse. Im Querschnitt des TEB ist die zum Lumen gerichtete Ansammlung aus Body-Zellen (B) zu sehen, die von einer äußeren Schicht an Cap-Zellen (C) umschlossen wird. Während die Body-Zellen eine starke CD24-Expression aufweisen, sind die Cap-Zellen nur sehr schwach CD24-positiv (Pfeilspitzen in (i)); Grüne Fluoreszenz = CD24, blau = DAPI, Färbung der Zellkerne

Die mit dem CD24-Antikörper (M1/69) gefärbten Gefrierschnitte erlauben folgende Aussagen:

(i) CD24 wird hauptsächlich auf Brustdrüsenepithelzellen exprimiert; andere in der Brust vorkommende Zelltypen wie z.B. Adipozyten (Fettzellen) oder Bindegewebe zeigen keine Expression. Zu den wenigen Ausnahmen mit CD24-Expression zählen einige migratorische hemopoetische Zellen (Marie-Ange Deugnier, Institut Curie, Paris, unveröffentlichte Daten). **(ii)** Beide Färbemethoden (Chromogen-Methode und Immunfluoreszenz) zeigen eindeutig und spezifisch eine Expression von CD24 in der Zellmembran und bestätigen somit die für CD24 erwartete Lokalisation. **(iii)** Die histologische Analyse mittels Immunfluoreszenz zeigt, dass die CD24-Expression im Brustepithel differenziell verteilt ist. Luminale Epithelzellen weisen im allgemeinen eine stärkere Färbung auf, in Myoepithelzellen ist keine eindeutige Expression von CD24 zu detektieren. Diese Verteilung ist allerdings mittels der chromogen-basierten Färbemethode nicht immer zu erkennen. In einigen Fällen wurde eine ausgeprägte CD24-Färbung in der Myoepithelschicht festgestellt (siehe Abbildung 6, b). Bei geschlossenem Lumen ist die Expression von CD24 auf den aneinandergrenzenden luminalen Epithelschichten teilweise besonders ausgeprägt (Abbildung 6 A). **(iv)** Zum Teil wurde auf suprabasal lokalisierten Epithelzellen eine polarisierte, apikale Expression von CD24 beobachtet (C (i) und (ii)). **(v)** CD24 wird sowohl vor als auch

während der Pubertät in konstanter Stärke exprimiert und daher entgegen der RNA-Analyse nicht mit Beginn der Pubertät hochreguliert. **(vi)** In Terminal End Buds sind Cap-Zellen nur sehr schwach CD24-positiv, während die luminalen Body-Zellen eine starke Expression von CD24 zeigen.

Die CD24-Expression während Schwangerschaft, Laktation und Involution der Brust

Nach Erreichen der Geschlechtsreife kann der Eintritt des Brustepithels in weitere wichtige Phasen, die umfassende morphologische und funktionelle Veränderungen zur Folge haben, erfolgen. In der Schwangerschaft werden beispielsweise Alveoli gebildet, welche später als terminal differenzierte, funktionelle Einheiten dienen. Sie produzieren Milch und werden nach Abschluss der Laktation in der Involutionsphase wieder zurückgebildet. Schwangerschaft, Laktation und Involution bilden den vollständigen Funktionszyklus einer Brust und können mehrfach wiederholt werden (Richert et al., 2000).

Obwohl CD24 sowohl vor als auch nach der Pubertät konstant exprimiert wird, kann eine Regulation z.B. während der Schwangerschaft, Laktation oder Involution nicht zwingendermaßen ausgeschlossen werden. Um diesem möglichen Hinweis nach einer potentiellen funktionellen Rolle von CD24 in der Brust nachzugehen, wurden von allen Phasen des Funktionszyklus zu verschiedenen Zeitpunkten Gefrierschnitte angefertigt und erneut einer immunhistologischen Analyse unterzogen. Das Ergebnis dieser Expressionsstudie ist durch repräsentative Schnitte aller untersuchten Phasen in Abbildung 8 dargestellt.

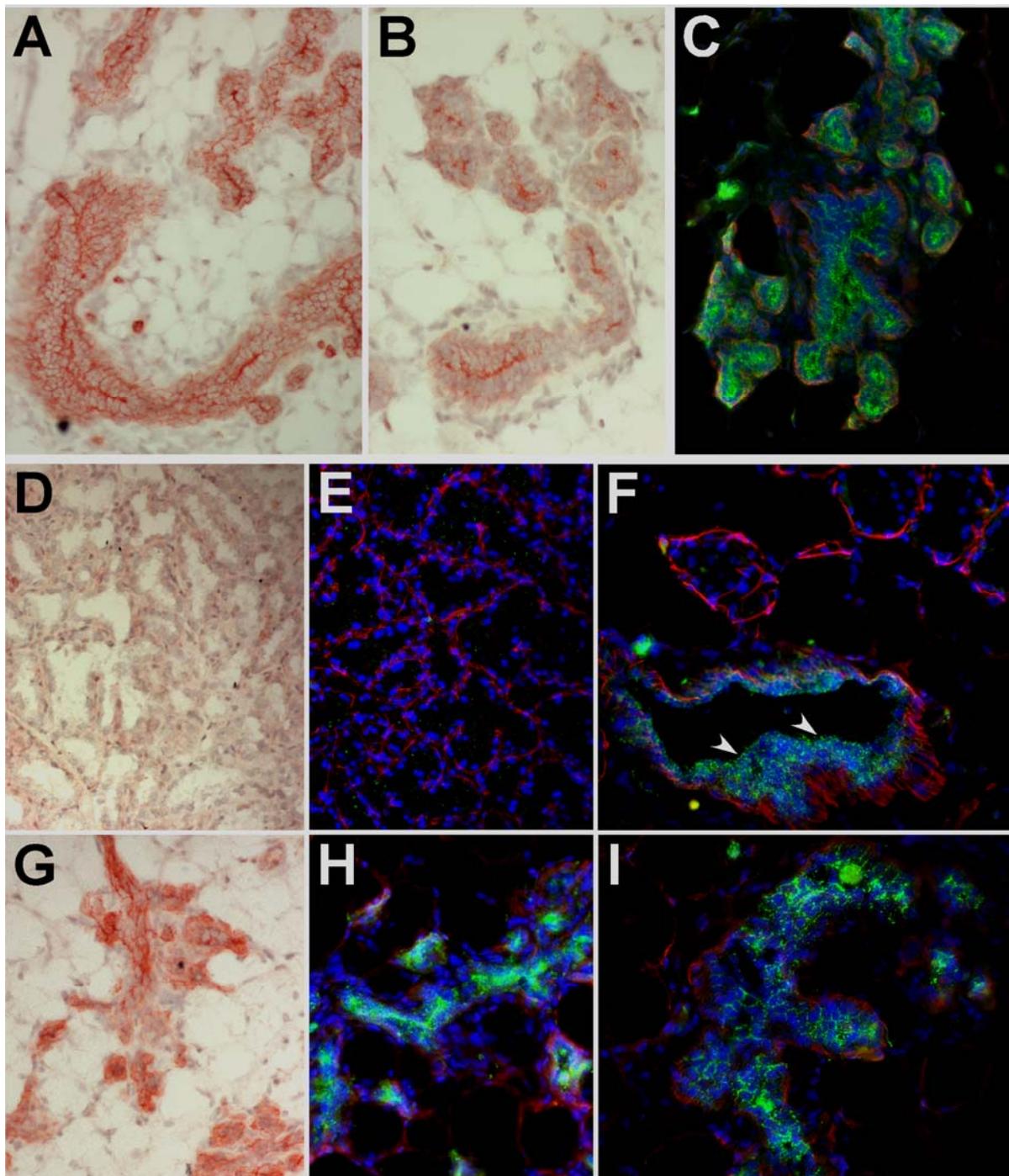


Abbildung 8. CD24-Expression in der Brust während Schwangerschaft, Laktation und Involution. Die Expression von CD24 nimmt mit fortschreitender Schwangerschaft ab (A, B und C) und ist während der Laktation im vollständig funktionell differenzierten Brustgewebe nicht mehr zu detektieren (D, E und F). Nicht differenziertes Brustepithel weist im Gegensatz dazu eine Expression auf (Pfeilspitzen in F). Nach Abschluss der Laktation stellt sich die ursprüngliche CD24-Expression wieder ein (G, H und I). A 10 Tage schwanger, B 15 Tage schwanger, C 15 Tage schwanger, D 5 Tage laktierend, E 5 Tage laktierend, F 10 Tage laktierend, G 5 Tage Postlaktation/Involution, H 5 Tage Postlaktation/Involution, I 10 Tage Postlaktation/Involution

Während des Schwangerschaftsverlaufes und der damit einhergehenden Ausbildung der Alveoli kommt es zu einer schrittweisen Reduktion der CD24-Expression (siehe Abbildung 8 A und B rote Färbung, C grüne Fluoreszenz). Das zu Beginn der Schwangerschaft vorhandene Färbemuster ist im letzten Drittel der Schwangerschaft kaum noch vorhanden, die funktionell differenzierten Alveoli weisen nun insbesondere im Bereich direkt aneinander grenzender luminaler Epithelschichten eine Färbung auf. Zudem ist das Farbsignal im Vergleich zu funktionell undifferenziertem, normalem Brustepithel schwächer. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Differenzierung des Brustepithels sowohl mit einer Reduktion der Expression des Proteins als auch mit seiner veränderten Lokalisation einhergeht.

Im Anschluss an die Schwangerschaft beginnt die Laktationsphase, in der ein äußerst schwaches bis kein CD24-Signal mehr detektiert werden kann (Abbildung 8 D, E und F). Die Ausnahme bilden Brustepithelgänge, welche nicht der Milchproduktion, sondern der Sammlung und dem Transport der sekretierten Milch dienen. Hier wird CD24 weiterhin exprimiert (siehe Hinweispeile in Abb. 8, F). Nach Abschluss der Laktationsphase wird das milchbildende Gewebe vollständig abgebaut und der Zustand der Brust vor der Schwangerschaft wieder hergestellt. Diese als Involution bezeichnete Periode ist hauptsächlich durch Apoptose und Gewebeumstrukturierungsprozesse charakterisiert. In dieser Phase wird die CD24-Expression wieder erhöht, so dass bereits einige Tage nach Laktationsende wieder das ursprüngliche Expressionsniveau erreicht ist (Abbildung 8, G, H und I).

Insgesamt zeigen die immunhistologischen Untersuchungen, dass CD24 während der Pubertät und Reifung des Brustgewebes konstant exprimiert wird, dessen Expression jedoch mit Zunahme der funktionellen Differenzierung während der Schwangerschaft stetig abnimmt und mit Beginn der Laktation auf Proteinebene nicht mehr detektierbar ist. Nach Abschluss der Laktation wird das ursprüngliche CD24-Expressionsniveau wieder hergestellt.

***In vitro*-Untersuchungen zur funktionellen Rolle von CD24 im Brustepithel**

Das HC11-Zellkulturmodell

Um die Vermutung einer möglichen Rolle von CD24 während der funktionellen Differenzierung des Mausbrustepithels genauer zu untersuchen, wurde ein *in vitro*-System gewählt. Für die vorliegende Fragestellung bietet sich die HC11-Zelllinie an, da sie ein etabliertes Modell zur Nachahmung des Differenzierungsprozesses von normalem Brustepithel in milchbildendes Epithel ist.

HC11-Zellen sind ein immortalisiertes, klonales Derivat von ursprünglich aus einer schwangeren Maus isolierten Brustepithelzellen (*Ball et al. 1988*). Sie besitzen stammzell- bzw. vorläuferzellähnliche Eigenschaften und sind nach Transplantation in eine Brust in der Lage, diese morphologisch als auch funktionell zu rekonstituieren (*Humphreys und Rosen, 1997*). Darüber hinaus lassen sich HC11-Zellen durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren und Hormonen *in vitro* zur funktionellen Differenzierung induzieren, was die Produktion typischer Milchproteine wie z.B. β -Casein zur Folge hat. Abbildung 9 fasst die experimentelle Durchführung der *in vitro*-Differenzierung von HC11-Zellen schematisch zusammen.

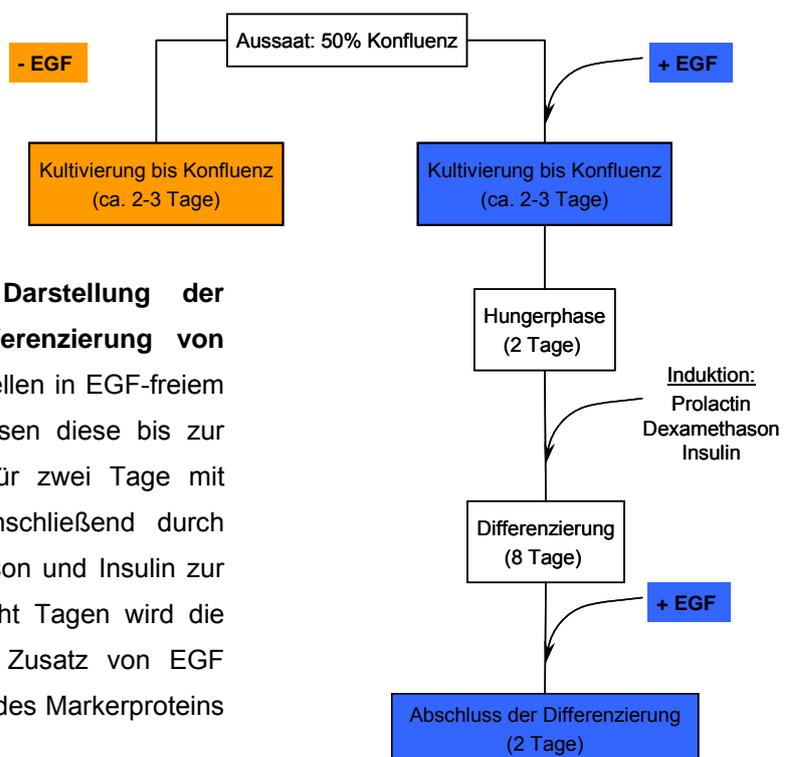


Abbildung 9. Schematische Darstellung der Durchführung der *in vitro*-Differenzierung von HC11-Zellen. Nach Aussaat der Zellen in EGF-freiem bzw. EGF-haltigem Medium wachsen diese bis zur Konfluenz heran, werden dann für zwei Tage mit Hungermedium versehen und anschließend durch Zugabe von Prolactin, Dexamethason und Insulin zur Differenzierung induziert. Nach acht Tagen wird die Differenzierungsphase durch den Zusatz von EGF abgeschlossen und die Produktion des Markerproteins β -Casein wird eingestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass HC11-Zellen CD24 auf ihrer Oberfläche exprimieren (FACS-Analyse) und sich daher für die Untersuchung der potentiellen Rolle von CD24 während der Differenzierung von Brustepithelzellen eignen.

Die *in vitro*-Differenzierung wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt und RNA-sowie Proteinproben verschiedener Differenzierungsstadien aufbereitet. Der Verlauf der CD24-Expression als auch der Erfolg der Induktion (Nachweis des β -Casein Transkriptes) wurde zunächst mittels Northern Blot untersucht. Wie in der Northern Analyse (Abbildung 10) zu sehen, ist im Zustand der Konfluenz die CD24-Expression im Vergleich zur Subkonfluenz reduziert. Dieser Effekt wird durch die Anwesenheit von EGF zusätzlich verstärkt. Während der zweitägigen Hungerphase erreicht die CD24-Expression ihr Minimum, kehrt jedoch nach erfolgter funktioneller Differenzierung (Zugabe von Prolactin, Dexamethason und Insulin, dadurch Induktion von β -Casein, siehe Abbildung 11 rechte Seite) zur ursprünglichen Stärke zurück. Durch Entzug des hormonhaltigen Induktionsmediums und Zugabe von EGF wird in der letzten Phase die Synthese von β -Casein eingestellt.

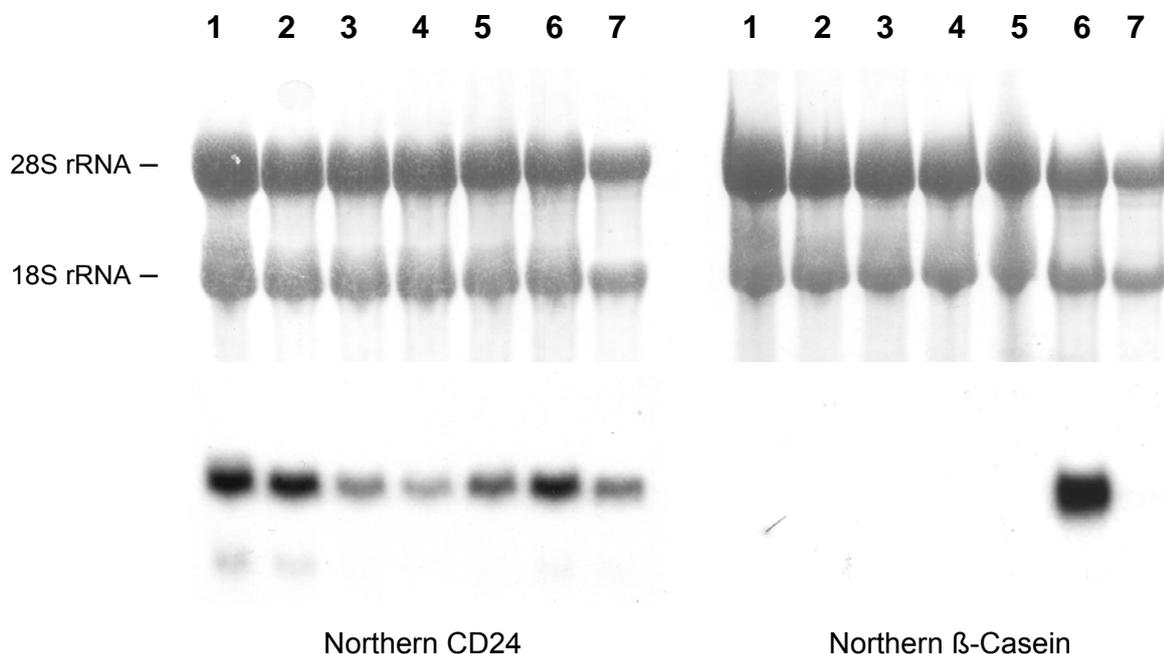


Abbildung 10. Northern Analyse verschiedener *in vitro*-Differenzierungsphasen von HC11-Zellen. Der Nachweis des CD24-bzw. β -Casein Transkripts erfolgte mit spezifischen, radioaktiv markierten cDNA-Sonden. Die gleichmäßige Beladung der Northern-Membran wurde durch Färbung mit Methylenblau überprüft. Links ist der Verlauf der CD24-Expression, rechts die Expression des Differenzierungsmarkers β -Casein zu sehen. β -Casein wird ausschließlich nach erfolgreicher Induktion durch entsprechende Hormone exprimiert.

Ergebnisse

- 1 = subkonfluente HC11-Zellen in EGF-freiem Medium
- 2 = subkonfluente HC11-Zellen in EGF-haltigem Medium
- 3 = konfluente HC11-Zellen in EGF-freiem Medium
- 4 = konfluente HC11-Zellen in EGF-haltigem Medium
- 5 = HC11-Zellen nach zweitägiger Hungerphase
- 6 = differenzierte HC11-Zellen (Zugabe von Prolactin, Dexamethason und Insulin)
- 7 = zwei Tage nach abgeschlossener Differenzierung und Kultivierung in EGF-haltigem Medium

Parallel zur Northern Analyse wurde der Verlauf der CD24-Expression auch auf Proteinebene untersucht. Wie in Abbildung 11 zu sehen, spiegelt die Analyse mittels Western Blot der Zell-Lysate der verschiedenen Differenzierungsstadien die auf RNA-Ebene beobachtete Regulation der CD24-Expression wieder. Durch die starke und außergewöhnlich variable Glykosilierung von CD24 entsteht ein breites Spektrum an CD24-Molekülen mit unterschiedlichem Molekulargewicht, welches auf einem Western Blot als typischer „Schmier“ erscheint.

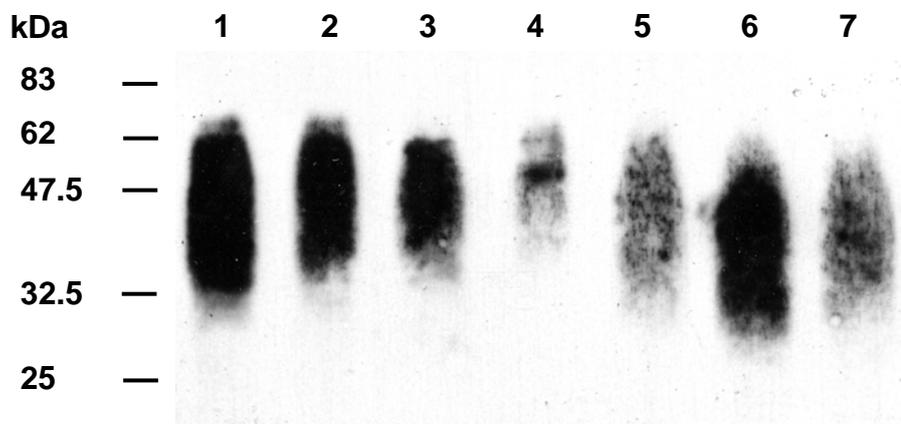


Abbildung 11. Western Blot Analyse der CD24-Expression während der *in vitro*-Differenzierung von HC11-Zellen. Die Detektion von CD24 erfolgte durch einen spezifischen CD24-Antikörper (M1/69) und anschließender Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Anti-Ratte HRP). Durch intensive und stark variierende Glykosilierung entsteht ein breites Spektrum an CD24-Molekülen, welches typische „Schmier“-Banden erzeugt. Das Molekulargewicht ist durch die Markerbanden auf der linken Seite angezeigt.

- 1 = subkonfluente HC11-Zellen in EGF-freiem Medium
- 2 = subkonfluente HC11-Zellen in EGF-haltigem Medium
- 3 = konfluente HC11-Zellen in EGF-freiem Medium
- 4 = konfluente HC11-Zellen in EGF-haltigem Medium
- 5 = HC11-Zellen nach zweitägiger Hungerphase
- 6 = differenzierte HC11-Zellen (Zugabe von Prolactin, Dexamethason und Insulin)
- 7 = zwei Tage nach abgeschlossener Differenzierung und Kultivierung in EGF-haltigem Medium

CD24-RNAi in HC11-Zellen

Die erhöhte Expression von CD24 während der funktionellen Differenzierung von HC11-Zellen könnte ein Hinweis auf eine potentielle Rolle von CD24 innerhalb dieses Prozesses sein. Über die Ausschaltung der CD24-Expression kann untersucht werden, ob die Fähigkeit von HC11-Zellen zur Differenzierung und damit zur β -Casein Produktion in direkter Weise von CD24 abhängt. Eine Möglichkeit die Expression von Proteinen zu manipulieren, ist die RNA-Interferenz, kurz RNAi. Durch diese Technik wird die Translation eines Proteins verhindert, in dem kurze, zur Ziel-mRNA komplementäre, doppelsträngige siRNA-Oligos den Abbau des betreffenden Transkriptes einleiten. Man spricht dabei auch von einem knock-down bzw. einem silencing des Proteins.

In Vorversuchen wurden zunächst durch transiente Transfektion von HC11-Zellen verschiedene CD24 siRNA-Oligos getestet. Um den knock-down von CD24 über die gesamte Dauer des Differenzierungsexperimentes zu gewährleisten, wurden in einer stabilen Transfektion mit dem pSuperRetro-CD24-Plasmid und einem pSuperRetro-nonsilencing Plasmid HC11-Klone erzeugt. Abbildung 12 zeigt die nach der FACS-Analyse getroffene Auswahl an Klonen, die für die Differenzierungsstudie eingesetzt wurden.

non-silencing Klone :

silencing Klone :

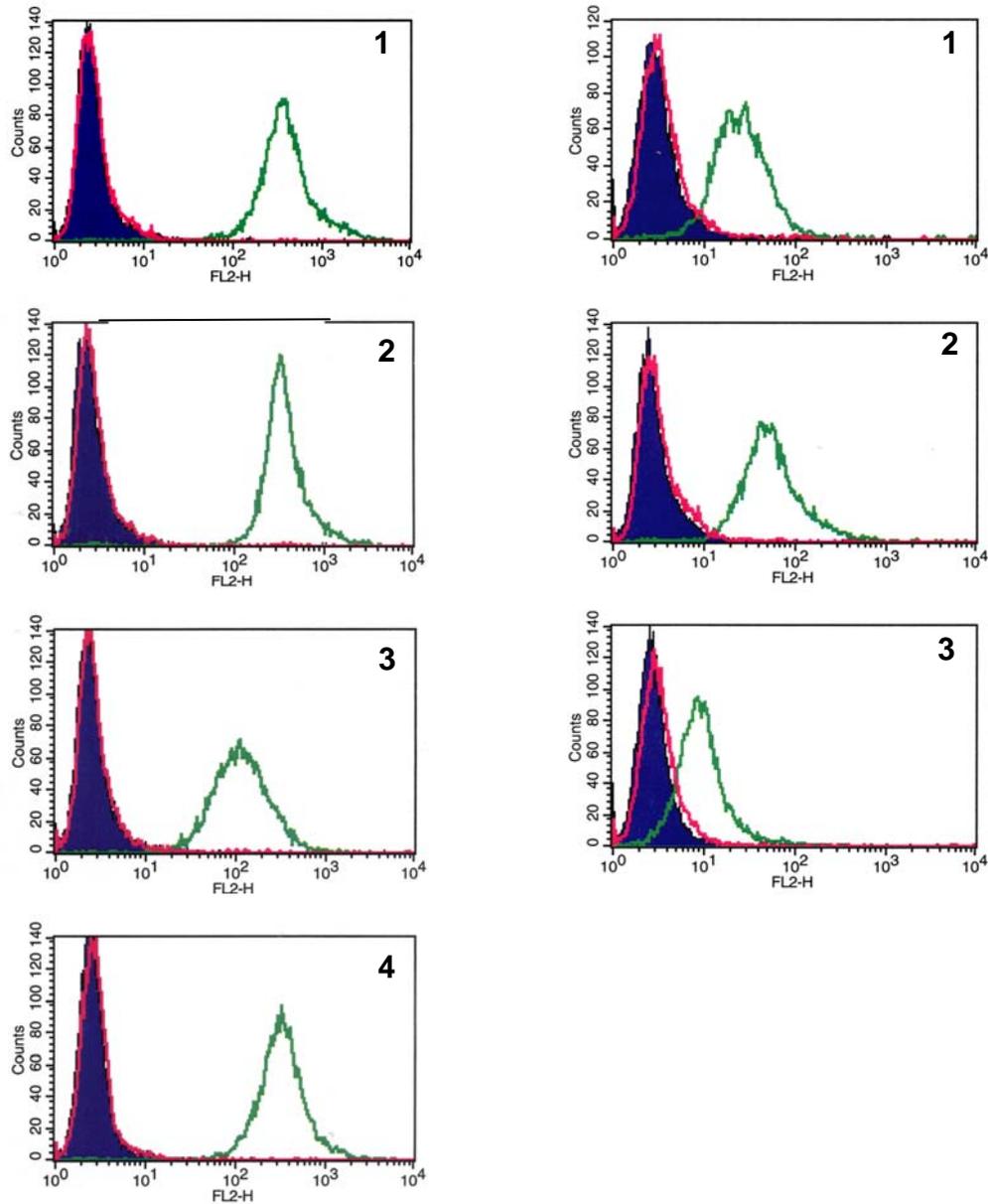


Abbildung 12. FACS-Analyse von stabilen RNAi-Klonen der HC11-Zelllinie. Die aus der stabilen Transfektion mit den entsprechenden pSuperRetro-Konstrukten hervorgegangenen Klone wurden mit einem spezifischen CD24-Antikörper (M1/69) und anschließend mit einem Sekundärantikörper (Anti-Ratte, FITC-gekoppelt) gefärbt. Als Kontrolle dienten ungefärbte HC11-Zellen (violett ausgefüllter Graph), sowie zur Ermittlung unspezifischer Bindungsaktivitäten nur mit Sekundärantikörper gefärbte Zellen (roter Graph). Durch Expression des siRNA-Oligos für CD24 ist in den silencing Klonen (rechte Seite) die Expression von CD24 im Vergleich zu den Kontrollklonen (linke Seite) reduziert (grüner Graph).

Um die Frage zu klären, ob sich die verminderte Expression von CD24 durch silencing auf die Fähigkeit zur Produktion des Differenzierungsmarkers β -Casein auswirkt, wurden die gewählten Klone wie bereits zuvor beschrieben kultiviert und die Transkription von β -Casein durch Zugabe von Dexamethason, Prolactin und Insulin induziert. In diesem Kontext ist nur der differenzierte Zustand von Interesse und wurde deshalb für die Northern-Analyse verwendet. Wie in Abbildung 13 dargestellt, zeigen die stabilen Klone stark unterschiedliche β -Casein Expressionslevel. Eine Aussage über die Korrelation der CD24-Expression mit dem Differenzierungspotential von HC11-Zellen ist daraus nicht abzuleiten.

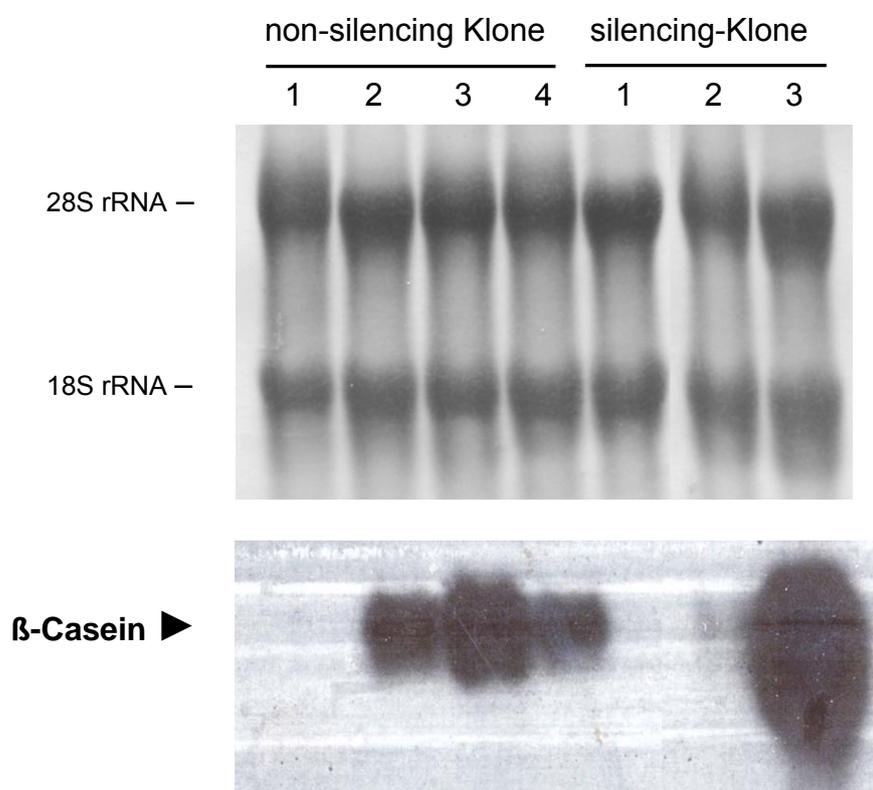


Abbildung 13. Northern Analyse der β -Casein Expression verschiedener CD24-RNAi Klone. Zum Zeitpunkt der Differenzierung wurde von non-silencing und silencing-Klonen Gesamtzell-RNA präpariert, über ein Northern-Gel aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung mit Methylenblau gefärbt. Der Nachweis des β -Casein Transkripts erfolgte mit einer spezifischen, radioaktiv markierten cDNA-Sonde.

Analyse von CD24 k.o.-Mäusen

Whole mount Analyse

Die Frage nach der funktionellen Rolle eines Proteins kann auf vielfältige Weise untersucht werden. So stehen für *in vitro*-Studien die ektopische Überexpression eines Gens oder die bereits erwähnte RNA-Interferenz zur Verfügung.

In vivo kann die Funktion eines Gens bzw. Proteins unter anderem mit Hilfe der knock-out Maus erforscht werden. Die Effekte des Expressionsverlustes können in jedem beliebigen Organ oder Gewebe untersucht werden und erlauben Rückschlüsse auf die Rolle des Proteins im jeweiligen Kontext.

Um einen Einblick in die potentielle Funktion von CD24 im Brustgewebe zu erhalten, wurden daher CD24 knock-out Mäuse im Vergleich zu normalen Wildtypmäusen untersucht. Der Fokus lag dabei auf der Analyse eventuell vorhandener morphologischer Unterschiede zwischen knock-out und Wildtyp-Brustgewebe.

Eine einfache, aber bewährte Methode das Brustgewebe und die darin eingebetteten Epithelgänge in ihrer Gesamtstruktur darzustellen, ist die Präparation von Whole mounts. Dafür wurde die inguinale Brustdrüse auf einem Glasobjektträger flach ausgebreitet und nach der Fixierung mit Karminrotlösung gefärbt, wodurch die Drüsenepithelgänge als auch der charakteristische inguinale Lymphknoten sichtbar werden. Die Präparate wurden unter einem Binokular fotografiert und ausgewertet. Die in die Untersuchung aufgenommenen Alters- bzw. Differenzierungsstadien und die jeweilige Anzahl der untersuchten Mäuse ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Pro Tier wurde jeweils eine inguinale Brust für die Whole mount Präparation verwendet, die andere für die histologische Analyse in Paraffin eingebettet.

Alter/Stadium	Anzahl CD24 k.o.-Mäuse	Anzahl Wildtypmäuse
3 Wochen alt	2	2
4 Wochen alt (P)	8	6
6 Wochen alt (P)	16	8
8 Wochen alt (G)	7	6
12 Wochen alt	4	4
20 Wochen alt	4	2
2 Tage schwanger	4	2
5 Tage schwanger	4	2
10 Tage schwanger	10	10
15 Tage schwanger	4	4
2 Tage laktierend	2	2
5 Tage laktierend	2	2
10 Tage laktierend	2	2
15 Tage laktierend	2	2
2 Tage Post- Laktation	2	2
5 Tage Post-Laktation	2	2
10 Tage Post-Laktation	2	2
15 Tage Post-Laktation	2	2

Tabelle 1. Übersicht über die mit Whole mount Präparation untersuchten Alters-bzw. Entwicklungsstadien der Brust von CD24 k.o.-und Wildtypmäusen.

(P) = Pubertät, (G) = Geschlechtsreife

Von allen untersuchten Entwicklungsstadien wurde nur in der Pubertät ein deutlicher Unterschied festgestellt. Hier zeigen CD24 k.o.-Mäuse im Alter von 6 Wochen ein dichteres Netzwerk an Brustepithelgängen als gleichaltrige Wildtyp-Kontrolltiere. Zur höheren Dichte im k.o.-Gewebe tragen sowohl häufigere Verzweigungen der für das Wachstum verantwortlichen Terminal End Buds (TEBS, siehe Abbildung 14), als auch sekundäre Seitenverzweigungen der Hauptgänge bei. Der Unterschied in der Verzweigungsdichte ist in Abbildung 14 an Hand eines repräsentativen Vergleichspaares (6 Wochen alte Wildtyp bzw. k.o.-Brust) gezeigt.

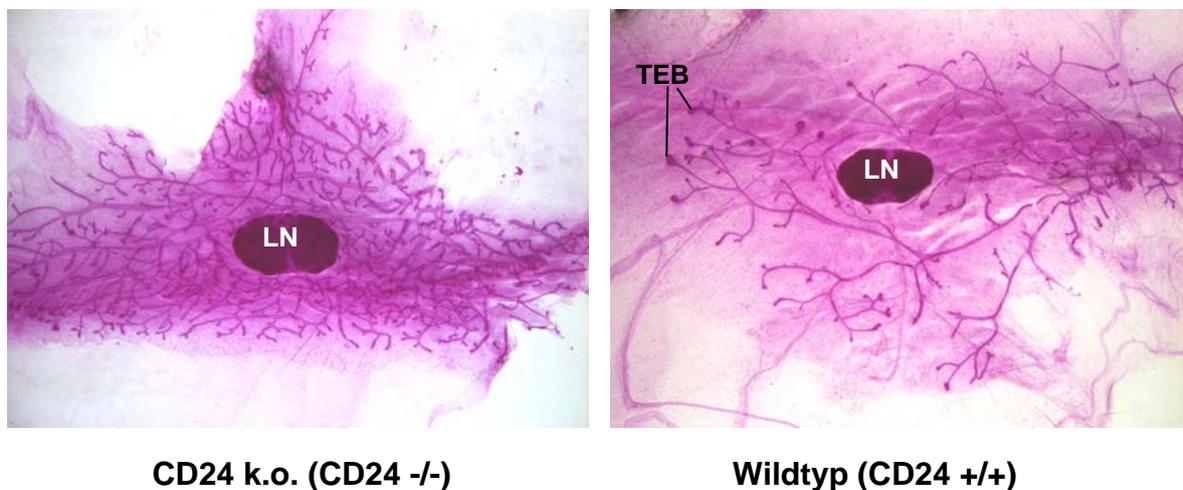
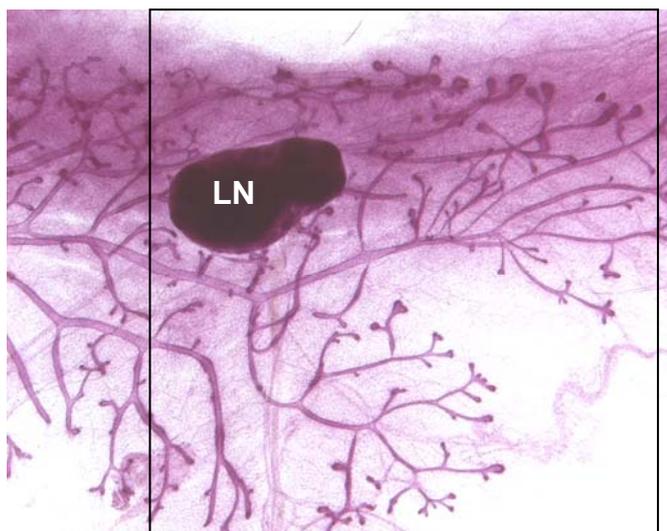


Abbildung 14. Brustgewebe Whole mounts einer sechs Wochen alten CD24 k.o.-Maus (links) und einer sechs Wochen alten Wildtypmaus (rechts). Drüsenepithelgänge und inguinaler Lymphknoten sind durch die Karminrotlösung angefärbt. LN = Lymphknoten; TEB = Terminal End Bud

Die verstärkte Verzweigung wurde durch Zählen der Endpunkte der Drüsengänge quantifiziert. In die Quantifizierung gingen nur Endpunkte ein, welche mindestens auf der Höhe des inguinalen Lymphknotens lagen bzw. über diesen hinausgewachsen waren (siehe Beispielbild, Abbildung 15.)

Abbildung 15. Darstellung der Vorgehensweise zur Ermittlung der Verzweigungsdichte. Alle in die Untersuchung eingegangenen Präparate wurden mit der gleichen Vergrößerung fotografiert. Gezählt wurden alle Endpunkte, welche auf der Höhe des Lymphknotens (LN) lagen bzw. darüber hinaus gewachsen waren (mit Rahmen markierter Bereich).



Die in Abbildung 16 als Histogramm dargestellte Quantifizierung von zehn CD24 k.o.- und sieben Wildtypmäusen spiegelt die signifikant (Mann-Whitney Test, $p < 0,001$) erhöhte Zahl an Endpunkten und damit die Verzweigungsintensität der CD24 k.o.-Drüsengänge wieder.

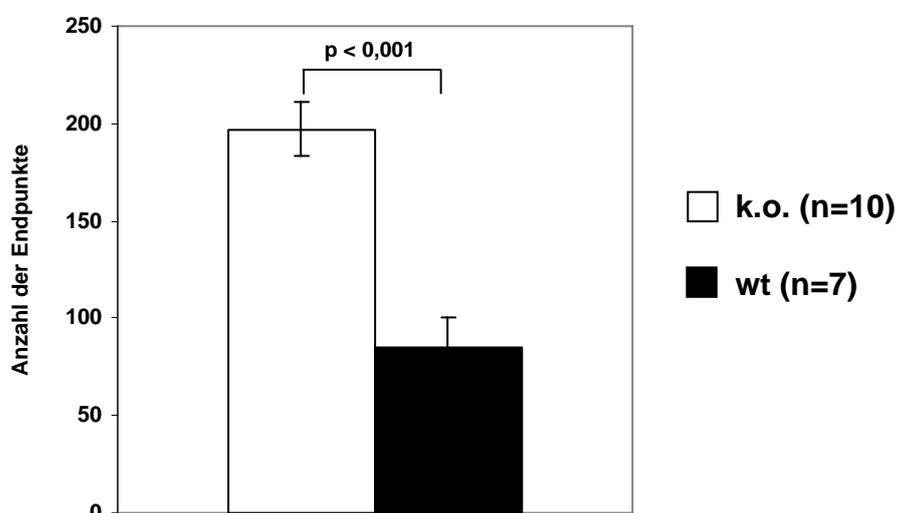


Abbildung 16. Quantifizierung der Verzweigung der Epithelgänge von Wildtyp- und CD24 -/- Mäusen. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney Test ermittelt ($p < 0,001$). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte wieder.

Die erhöhte Epitheldichte ist jedoch nur in der Pubertätsphase zu beobachten. Prä- als auch postpubertäre Brustdrüsen zeigen keine merklichen Unterschiede hinsichtlich der Verzweigungsdichte. Der Verlust der CD24-Expression führt daher nur in einem zeitlich begrenzten Rahmen zu einer verstärkten Verzweigung der Epithelgänge. Zum Zeitpunkt der Geschlechtsreife, d.h. nach Abschluss der Pubertät ist dieser zeitliche Vorsprung im Wildtypgewebe wieder eingeholt. Alle anderen Phasen des Brustwachstums bzw. der Brustentwicklung zeigen keine signifikanten Unterschiede zum Wildtypgewebe (Daten nicht gezeigt).

Für eine eingehendere morphologische Begutachtung der Brust wurden Paraffinschnitte beider Gruppen (CD24 k.o. und Wildtyp) zusätzlich einer H&E-Färbung unterzogen. In keinem der untersuchten Stadien konnten Unterschiede im Aufbau oder der Struktur der Drüsen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

CD24 und Brustepithelstammzellen

Die Existenz von Brustepithelstammzellen wurde bereits in den fünfziger Jahren durch serielle Transplantation kleiner Brustgewebestücke demonstriert (*siehe Einleitung; DeOme et al., 1959*). Durch die in den Epithelgängen vorhandenen Stammzellen kommt es zu einer Neubildung von Drüsengängen, welche das Empfängergewebe in der selben Weise wie das endogene Brustgewebe besiedeln können. Vor kurzem wurden Brustepithelstammzellen aus der Maus isoliert, die unter anderem durch die Expression von CD24 charakterisiert sind (*Sleeman et al., 2006; Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006*). Bislang blieb die Frage nach der funktionellen Rolle von CD24 in Brustepithelstammzellen unbeantwortet. Eine Möglichkeit diese Fragestellung zu untersuchen, bietet sich daher durch die CD24 k.o.-Maus.

Zu diesem Zweck wurde die Rekonstitutionsfähigkeit von CD24 k.o.-Stammzellen im Vergleich zu Wildtypstammzellen aus der Brust in einem Transplantationsexperiment untersucht. Hierzu wurden kleine brustepithelhaltige Gewebestücke in das inguinale Brustfettgewebe von 3 Wochen alten Balb/c Nacktmäusen transplantiert. Der zu diesem Zeitpunkt geringe Anteil an endogenem Brustepithel in den Empfängertieren wurde zuvor durch Hitzeverätzung entfernt. Dadurch kann das Rekonstitutionsverhalten des Transplantats ohne störende Einflüsse des ebenfalls heranwachsenden endogenen Gewebes untersucht werden. Eine Vermischung der endogenen mit den aus dem Transplantat rekonstituierten Drüsengängen wird vermieden. Die Gewebetransplantate wurden in einer kleinen Tasche im inguinalen Brustfettgewebe plziert. Pro Empfängermaus erhielt die (ventral betrachtet) linke inguinale Brust ein Wildtyp-Transplantat, die (ventral betrachtet) rechte inguinale Brust ein CD24 k.o.-Transplantat. Somit sind sowohl k.o.- als auch Kontrolltransplantat den selben Bedingungen innerhalb eines Versuchstieres ausgesetzt.

Insgesamt wurden zehn Nacktmäuse verwendet, was zehn unabhängigen k.o. als auch zehn unabhängigen Wildtyptransplantaten entspricht. Neun Wochen nach der Operation wurden Whole mount Präparate der inguinalen Brustdrüsen von zunächst drei Empfängertieren analysiert. In keinem der untersuchten Präparate konnte jedoch ein Unterschied in der Morphologie, der Dichte oder des allgemeinen Wachstums der Drüsengänge im Vergleich zum Wildtyptransplantat festgestellt werden (*siehe Abbildung 17*).

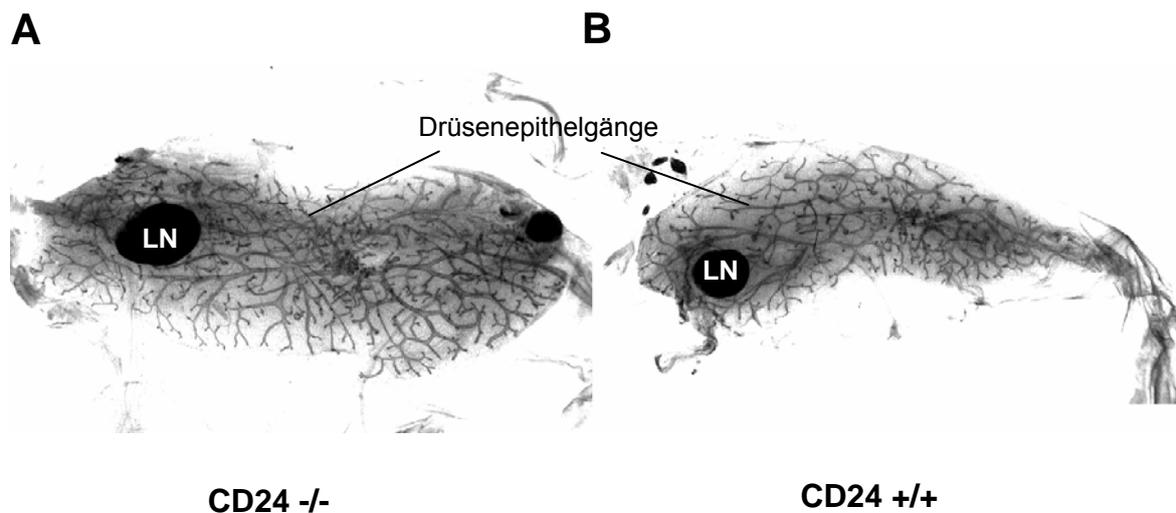


Abbildung 17. Untersuchung der Rekonstitutionsfähigkeit von CD24 k.o.-im Vergleich zu Wildtyp-Brustepithelstammzellen durch Gewebetransplantation. Repräsentative Whole mount Präparate eines CD24 k.o.- (A) und eines Wildtyp-Transplantats (B) 9 Wochen nach der Implantation in das inguinale Brustfettgewebe einer Balb/c Nacktmaus. Beide Transplantate zeigen eine vergleichbare Rekonstitution des Brustgewebes ohne erkennbare Unterschiede in der Morphologie oder Dichte des Drüsenepithels. Der für die inguinale Brustdrüse charakteristische Lymphknoten (LN) ist deutlich zu erkennen.

Zusätzlich zur Whole mount Analyse wurde die Identität der Transplantate durch Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten mit einem CD24-Antikörper bestätigt. Wie in Abbildung 18 dargestellt, ist das Drüsenepithel des Wildtyp-Transplantats positiv gefärbt (grüne Fluoreszenz) wohingegen das k.o.-Transplantat kein Signal aufweist. Positiv gefärbte Zellen im k.o.-Transplantat rühren vom Wildtyp-Stroma der Empfängermaus her und stellen aller Wahrscheinlichkeit nach migratorische Zellen des hemopoetischen Systems dar (unveröffentlichte Daten, persönliche Kommunikation mit Marie-Ange Deugnier, Institut Marie Curie, Paris).

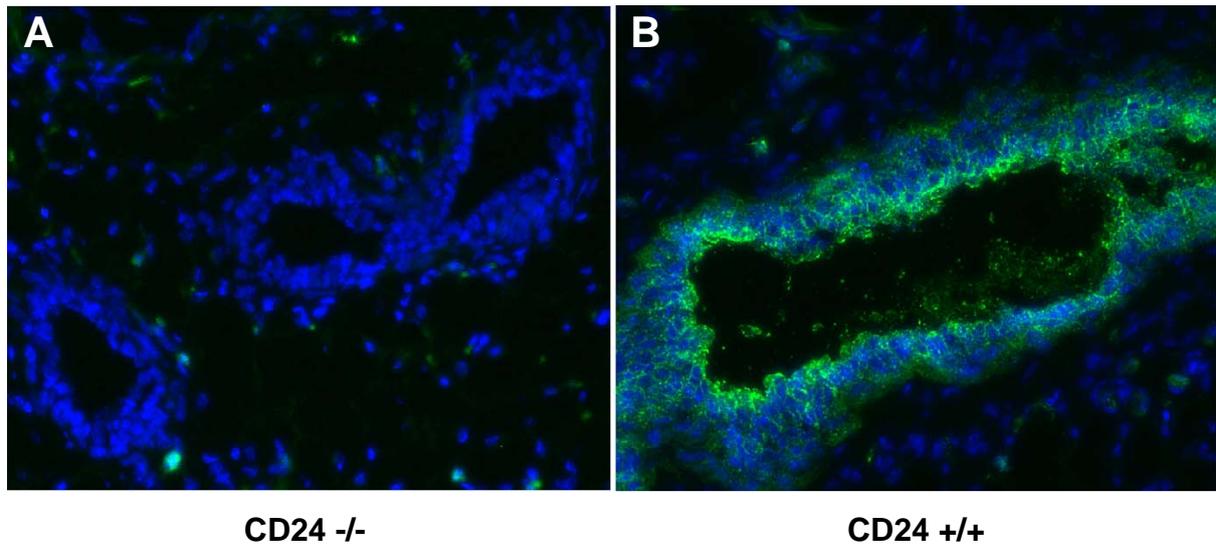


Abbildung 18. Immunhistologischer Nachweis von CD24 auf Gefrierschnitten eines CD24 k.o.- (A) und eines Wildtyp-Transplantats (B). Die Färbung erfolgte mit einem spezifischen CD24-Antikörper (M1/69) und einem Alexa-gekoppelten Sekundärantikörper. Das Wildtyp-Transplantat (B) zeigt eine eindeutige CD24-Färbung des Brustepithels (grüne Fluoreszenz) während für das k.o.-Epithel (A) kein Signal detektiert und dadurch die Identität der ursprünglich implantierten Brustgewebestücke bestätigt wird. Grüne Fluoreszenz = CD24-Färbung, Blaue Fluoreszenz = DAPI, Färbung der Zellkerne

Zusätzlich zur allgemeinen Rekonstitutionsfähigkeit wurden die Transplantate auf ihre Fähigkeit zur funktionellen Differenzierung untersucht, welche in der Brust mit der Ausbildung von Alveoli - der späteren funktionellen Einheit der laktierenden Brustdrüse - einhergeht und über schwangerschaftsbedingte Hormone induziert und gesteuert wird. Durch Verpaarung der Nacktmäuse wurde geprüft, ob die Transplantate in der Lage sind, auf diese hormonellen Signale zu reagieren und die Differenzierung des herangewachsenen Brustepithels einzuleiten.

Die Transplantate wurden im letzten Drittel der Schwangerschaft (E13.5 - E16.5) der Nacktmäuse entfernt und einer morphologischen Begutachtung durch Whole mount Präparation unterzogen. Sowohl im k.o.-als auch im Wildtyp-Transplantat kam es zu einer normalen funktionellen Differenzierung des Brustepithels durch die Bildung von Alveoli (siehe Abbildung 19 A und a, sowie B und b).

Durch die Färbung von Gefrierschnitten mit einem CD24-Antikörper konnte zusätzlich zur Identitätsbestätigung gezeigt werden, dass sich das Wildtyp-Transplantat hinsichtlich der CD24-Expression in der selben Weise verhält wie für normales Wildtypgewebe bereits zuvor in der Schwangerschaftsphase beobachtet wurde. Nicht differenziertes Brustepithel exprimiert CD24 in unveränderter Stärke (siehe Pfeilspitze in Abbildung 19 D), in den Alveoli kommt es jedoch zu einer Reduktion der CD24-Expression (siehe Pfeile in Abbildung 19 D). Die Lokalisation von CD24 ist in den Alveoli auf die apikale, dem Lumen zugewandte Seite beschränkt.

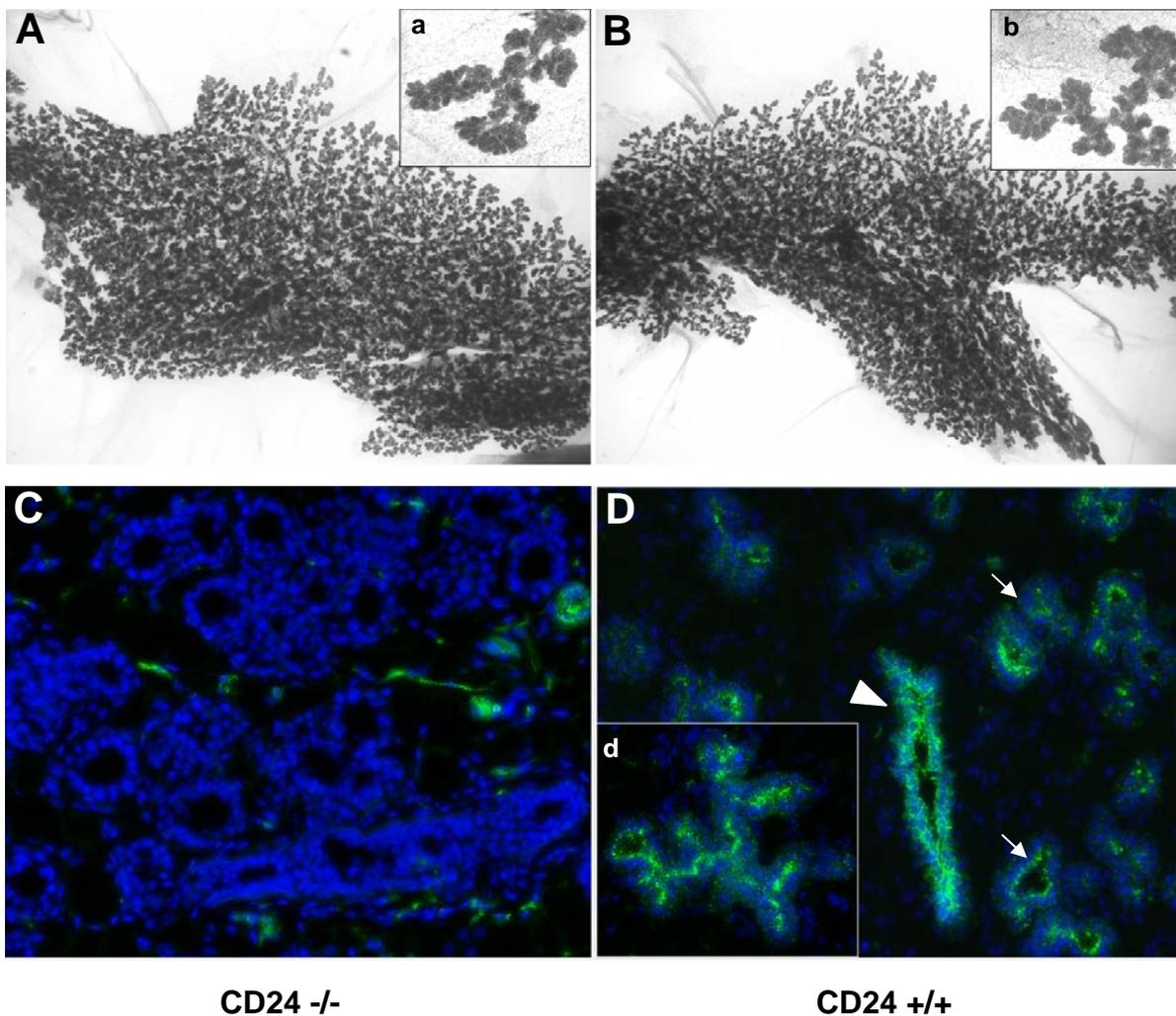


Abbildung 19. Funktionelle Differenzierung der CD24 k.o.- bzw. Wildtyp-Transplantate während der Schwangerschaft. Whole mount Präparation eines CD24 k.o.-Transplantats (A, Vergrößerung der Alveoli in a) und eines Wildtyp-Transplantats (B, Vergrößerung der Alveoli in b) Die Identität der Transplantate wurde an Hand der Färbung von Gefrierschnitten bestätigt (C, D). Im Wildtyp-Transplantat (D) ist im Vergleich zu funktionell undifferenziertem Epithel (siehe Pfeilspitze in D) eine reduzierte CD24-Expression (grüne Fluoreszenz) in den Alveoli (siehe Pfeile in D) zu beobachten.

Insgesamt wurde festgestellt, dass der Verlust der CD24-Expression auf Brustepithelstammzellen in der k.o.-Maus im Kontext des durchgeführten Transplantationsexperiments weder auf die Rekonstitutionsfähigkeit, noch auf die Differenzierungsfähigkeit erkennbare Auswirkungen hat.

CD52 als Substitutionsmolekül für CD24

Durch gezieltes Ausschalten (knock-out) einzelner Gene auf genomischer Ebene kann an Hand des daraus resultierenden Phänotyps ihre Funktion und Rolle *in vivo* demonstriert werden. Die Auswirkungen eines knock-outs können von diversen Organ- und Gewebeschäden bzw. Dysfunktionen bis hin zur Lethalität reichen. Jedoch ist nicht immer ein deutlicher Phänotyp zu beobachten, da der Verlust eines Gens/Proteins in vielen Fällen durch andere, oftmals aus der selben Familie stammende Gene/Proteine kompensiert wird. Ein Beispiel ist das Gen für *src*, dessen Funktionsverlust durch andere Familienmitglieder wie *fyn* und *lyn* ersetzt wird und ein deutlicher Phänotyp erst nach zusätzlichem Ausschalten dieser Gene zu beobachten ist (Stein et al., 1994).

Das Ausschalten von CD24 hat wie bereits zuvor beschrieben nur geringfügige Auswirkungen (Nielsen et al., 1997; Belvindrah et al., 2002). Um abzuklären, ob die Möglichkeit einer Kompensation durch ein anderes Protein gegeben ist, wurde zunächst in der Literatur nach potentiellen Kandidaten gesucht. Als vielversprechend erwies sich CD52, welches als kleines, GPI-verankertes und stark glykosiliertes Protein starke Homologien zu CD24 aufweist und das bislang einzige entdeckte Paralog zu CD24 im Säugetiergenom darstellt (Tone et al., 1999). Die Expression von CD52 wurde bisher für Lymphozyten (Hale et al., 1990), die Milz (Xia et al., 1991), und Teile des männlichen Reproduktionssystems (Hale et al., 1993; Kirchhoff et al., 1994) beschrieben.

Einen Hinweis auf eine kompensatorische Aktivität des Kandidatengenes CD52 kann dessen unter Umständen erhöhte Transkription im CD24 k.o.-Gewebe liefern, weshalb im Folgenden die Untersuchung auf RNA-Ebene stattfand. Dafür wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Stadien der Schwangerschaft, Laktation und Involution sowohl aus Wildtyp- als auch aus CD24 k.o.-Brustgewebe isoliert und einem direkten Vergleich mittels Northern Blot unterzogen. Die Detektion der CD52-

mRNA erfolgte durch Hybridisierung des Blots mit einer spezifischen Sonde. Wie in Abbildung 20 zu sehen, wird sowohl im Wildtyp-als auch im CD24 k.o.-Brustgewebe CD52 transkribiert und interessanterweise während der gesamten Laktationsphase vollständig unterbunden. Eine in den übrigen Phasen im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöhte Menge an CD52-mRNA kann im k.o.-Gewebe jedoch nicht beobachtet werden.

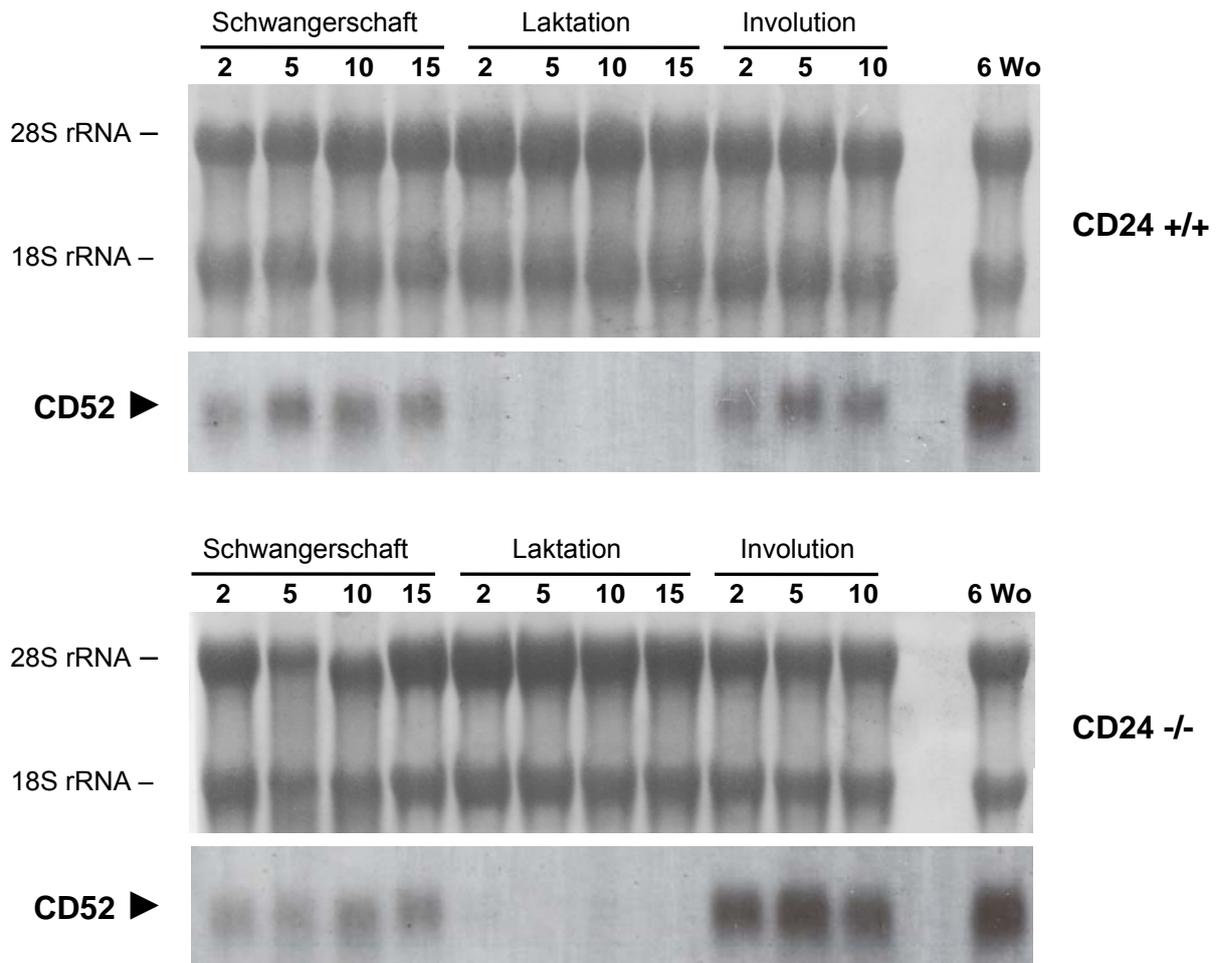


Abbildung 20. Northern Analyse der CD52-Expression in Wildtyp-und k.o.-Brustgewebe während der Schwangerschaft, Laktation und Involution. 10 µg Gesamt-RNA wurden über ein Northern-Gel aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung mit Methyleneblau gefärbt. Die Detektion des CD52-Transkripts erfolgte durch eine radioaktiv markierte CD52-spezifische cDNA-Sonde. Die Zahlen geben den Zeitpunkt in Tagen an, an dem das Brustgewebe in der jeweiligen Entwicklungsphase entnommen wurde (z.B. 2 Tage schwanger, 5 Tage schwanger etc.) 6 Wo: Brustgewebe einer sechs Wochen alten Maus (äußerste Spur rechts).

Ergebnisse der Tumormodellstudien

Um einen erweiterten Einblick in die Rolle von CD24 in der Tumorigenese und Metastasierung zu bekommen, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Tumormodelle charakterisiert. Hierfür wurden zum einen umfangreiche immunhistologische Analysen (CD24-Färbung, H&E-Färbung) durchgeführt, mittels derer ein Gesamtbild über die Expression und die Verteilung von CD24 in den verschiedenen Tumortypen und deren unterschiedlichen Entwicklungsstadien erstellt wurde. Als wichtige Frage stand dabei im Mittelpunkt, ob mit steigendem Malignitätsgrad eine Zunahme der CD24-Expression stattfindet, d.h. eine Korrelation der CD24-Expression mit der Progression der Tumoren existiert. Diese Korrelation wurde auf histologischer Ebene in humanen Tumoren bereits mehrfach gezeigt (siehe Einleitung).

Zur Untersuchung der funktionellen Beteiligung und des Einflusses der CD24-Expression auf die Tumorprogression, wurde die CD24-Expression in den Tumoren ausgeschaltet. Dies wurde durch Verpaarung der Tumormodelle mit CD24 knock-out Mäusen erreicht. Die Nachkommen der Verpaarungen wurden genotypisiert (siehe Material und Methoden, S. 46 - 49), in entsprechende Gruppen aufgeteilt (transgen und heterozygot bzw. knock-out für CD24) und in eine Überlebensstudie aufgenommen.

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse für jedes Tumormodell vorgestellt.

Histologische Analyse von Gewebeschnitten des TRAMP-Modells

Für die histologische Analyse wurde zunächst Prostatagewebe von TRAMP-Mäusen unterschiedlichen Alters (12 bis 28 Wochen alt) gesammelt, wodurch ein breites histologisches Spektrum an unterschiedlichen Stadien der Prostatakarzinomentstehung erfasst wurde und die Analyse der CD24-Expression in Zusammenhang mit der Tumorprogression möglich war. Zum Vergleich wurde Prostatagewebe aus Wildtypmäusen herangezogen. Nach der Färbung der Gefrierschnitte wurde allgemein eine starke Heterogenität der CD24-Färbung sowohl bei Wildtyp- (Daten nicht gezeigt) als auch bei TRAMP-Mäusen (Abbildung 21) beobachtet. Diese zeigte sich dadurch, dass sowohl zwischen Drüsenepithelien des selben Areals als auch Drüsenepithelien verschiedener Areale der Prostata eine Färbung festgestellt wurde (Abbildung 21). Darüber hinaus traten von Tier zu Tier starke Schwankungen in der Verteilung und der Intensität der Färbung auf (starke Färbung in einem Tier, nicht vorhandene Färbung in anderem, gleichaltrigem Tier). Wurde eine CD24-Färbung in der Prostata erkannt, so zeigte sich diese vorherrschend auf der apikalen Seite des Epithels (siehe Abbildung 21 A).

Eine Transformation des Prostataepithels konnte in TRAMP-Mäusen bereits ab einem Alter von 12 Wochen beobachtet werden. Dabei handelte es sich um sogenannte intraepitheliale Neoplasien, die durch mehrschichtiges Wachstum des normalerweise einschichtigen Prostataepithels gekennzeichnet sind (Abb. 21, Sterne in A - C). Diese Läsionen wiesen in einigen Fällen im Vergleich zu direkt angrenzendem, nicht hyperplastischem/neoplastischem Prostataepithel eine deutlich stärkere Färbung auf (Abb. 21, A und C, Pfeilspitzen). Allerdings zeigte sich dieses Muster nicht in allen intraepithelialen Neoplasien und auch nicht in allen untersuchten TRAMP-Tieren gleichermaßen, wodurch im Gesamtbild der Eindruck der starken Heterogenität bestätigt wurde. In älteren TRAMP-Mäusen kam es teilweise zur Progression der Neoplasien zu manifestierten Prostatakarzinomen. In den Karzinomen einiger Tiere konnte eine CD24-Färbung nachgewiesen werden (Abb. 21 E, Vergrößerung davon in F), in anderen Tieren allerdings nicht (G). In älteren Mäusen ohne Entwicklung eines Prostatakarzinoms zeigte der Großteil des Prostatagewebes fortgeschrittene intraepitheliale Neoplasien, welche wiederum von Tier zu Tier (D, H und I, bzw. J) und sogar innerhalb eines Tieres (H und J) eine stark schwankende Verteilung der CD24-Färbung aufwiesen.

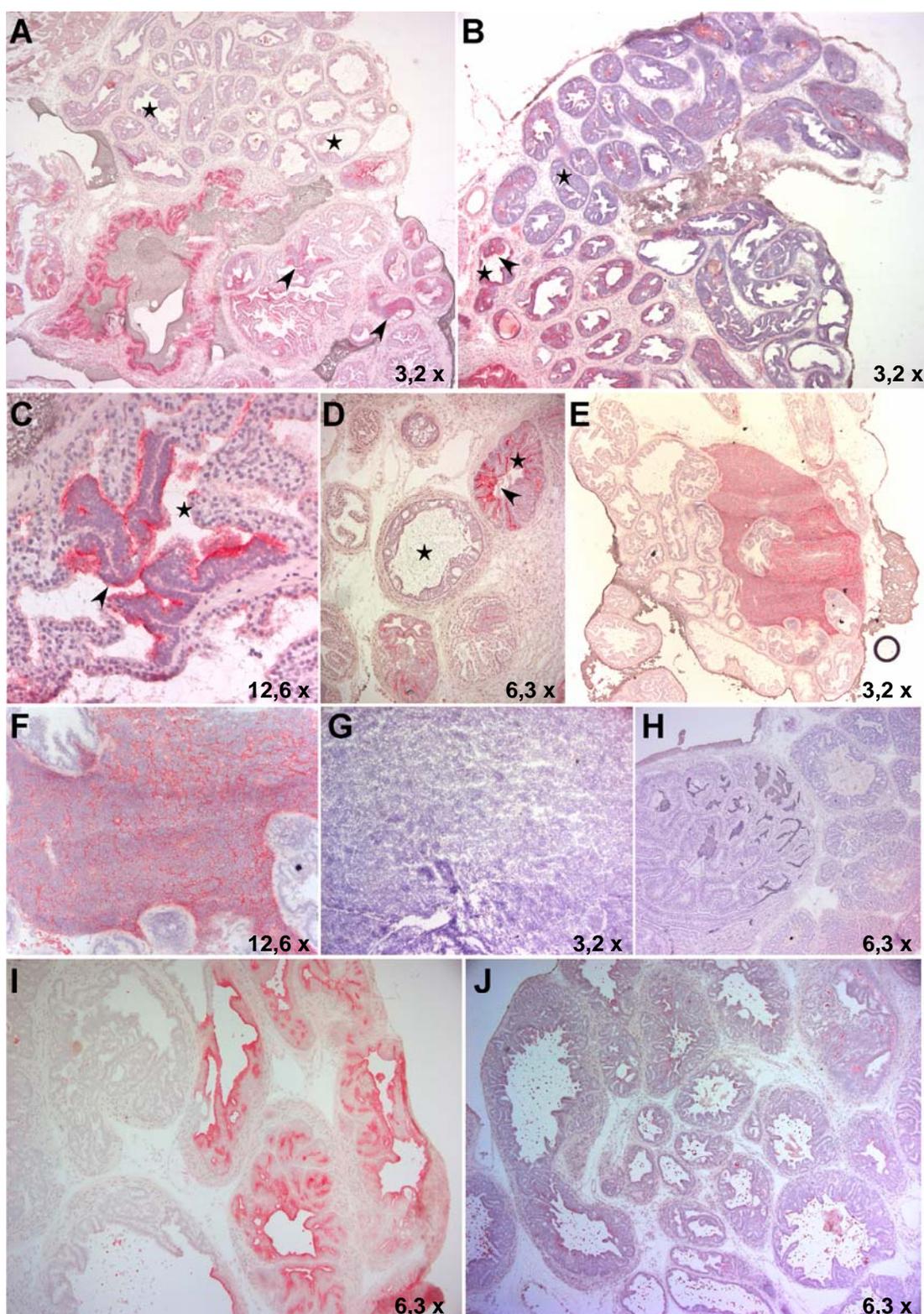


Abbildung 21. Immunhistologische Untersuchung der CD24-Expression in Prostata-Schnitten von TRAMP-Mäusen verschiedenen Alters. A - C, Prostata von 12 Wochen alten TRAMP-Mäusen mit intraepithelialen Neoplasien (Stern) und heterogener Verteilung der CD24-Expression (Pfeilspitzen). D 10 Monate alte TRAMP-Maus (Stern: intraepitheliale Neoplasie; Pfeilspitze: CD24-Färbung). E 16 Wochen alte TRAMP-Maus mit manifestiertem, CD24-gefärbtem Prostatakarzinom; das umgebende Prostataepithel zeigt keine Färbung; F Vergrößerung von E; G Prostatakarzinom ohne erkennbare CD24-Färbung; H 20 Wochen alte TRAMP-Maus; I, J 24 Wochen alte TRAMP-Maus mit zum Teil starker CD24-Färbung (I) bzw. keiner Färbung (J) von neoplastischem Prostataepithel.

Einfluss der CD24-Expression auf die Überlebensrate im TRAMP-Modell

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die CD24-Expression in Prostatatumoren prognostisch signifikant für die Überlebensrate der Patienten ist (Kristiansen et al., 2004a; Kristiansen et al., 2005). Dabei kommt es bei Patienten mit einem CD24-positiven Tumor nach der Entfernung des Tumors schneller zu einem Rückfall, als bei Patienten mit CD24-negativem Tumor, weshalb die CD24-Expression negativ mit dem progressionsfreien Krankheitsverlauf korreliert (Kristiansen et al., 2004a). Um die prognostische Relevanz und insbesondere die funktionelle Beteiligung der CD24-Expression an der Progression von Prostatatumoren zu untersuchen, wurde die CD24-Expression im TRAMP-Modell durch Verpaarung mit CD24 knock-out Mäusen ausgeschaltet. Der Einfluss der CD24-Expression auf den Krankheitsverlauf wurde in einem Langzeitversuch ermittelt, in dem die Überlebensrate CD24-heterozygoter TRAMP-Mäuse (TRAMP/+, CD24 +/-) mit der Überlebensrate von CD24 k.o. TRAMP-Mäusen (TRAMP/+, CD24 -/-) verglichen wurde. Das Ergebnis des Versuchs ist in Abbildung 22 als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Es zeigte sich, dass der Verlust der CD24-Expression im TRAMP-Modell eine erhöhte Überlebensrate der Tiere zur Folge hat (vgl. TRAMP/+, CD24 -/- mit TRAMP/+, CD24 +/-).

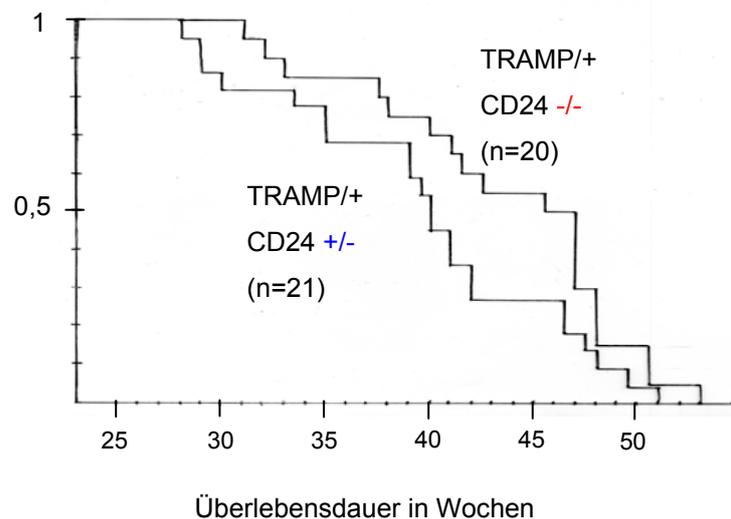


Abbildung 22. Kaplan-Meier-Analyse der Überlebensrate von CD24-heterozygoten TRAMP-Mäusen (TRAMP/+, CD24 +/-) im Vergleich zu CD24 k.o. TRAMP-Mäusen (TRAMP/+, CD24 -/-).

X-Achse: Überlebensrate, y-Achse: Überlebensdauer in Wochen

Histologische Analyse von Gewebeschnitten des APC^{+1572T}-Modells

Das APC^{+1572T}-Modell und dessen Tumorphistologie ist in der Literatur bislang nur ansatzweise beschrieben bzw. charakterisiert (Gaspar und Fodde, 2004). Um einen ersten histologischen Überblick über die im APC^{+1572T}-Modell entstehenden Tumoren zu bekommen, wurden daher zunächst Paraffinschnitte einer H&E-Färbung unterzogen. Dabei wurde festgestellt, dass die in APC^{+1572T}-Mäusen gebildeten Tumoren ein breites, histologisch heterogenes Spektrum aufweisen (Abbildung 23). So wurden innerhalb eines Tumors sowohl Adenokarzinome (K) als auch Tumoren mit konzentrisch angelegten, fibrillenartigen Ablagerungen in den ehemaligen Drüsengängen (f) beobachtet. Diese erinnern stark an die typischen, von Plattenepithelkarzinomen gebildeten Keratinablagerungen (keratin pearls) bzw. an Acanthome, Neoplasien in denen eine ähnliche squamöse Zelldifferenzierung mit Keratinablagerungen beobachtet wird. Häufiges Merkmal der Zellen, welche die Ablagerungen umgeben, ist ein stark vergrößerter Zellkern (siehe Pfeil in Abbildung 23, D). Des weiteren konnte zwischen den verschiedenen Tumoren eine starke Variation im Anteil des Tumorstromas beobachtet werden (vgl. Abbildung 23 A und C).

In einem weiteren Ansatz wurden die Tumorschnitte mit einem CD24-Antikörper gefärbt. Allgemein zeigte sich eine sehr heterogene Verteilung der Färbung, wobei die fibrillenumgebenden Strukturen ein sehr starkes Signal aufwiesen (Abbildung 24, C, D und F). In frühen Stadien dieses histologischen Erscheinungsbildes (A, B) konnte eine Tendenz zu leicht erhöhter CD24-Färbung von Drüsenepithel mit beginnendem hyperplastischem Wachstum und fibrillären Ablagerungen (hf in A und B) zu normalem Brustepithel (n in B) beobachtet werden. Karzinome zeigten ebenfalls eine Färbung, welche allerdings zum Teil etwas schwächer ausfiel (Abbildung 24, E). Eine zu den TRAMP-Karzinomen vergleichbare, membranöse Färbung (siehe Abbildung 21, E und F) konnte in den APC^{+1572T}-Karzinomen nicht festgestellt werden.

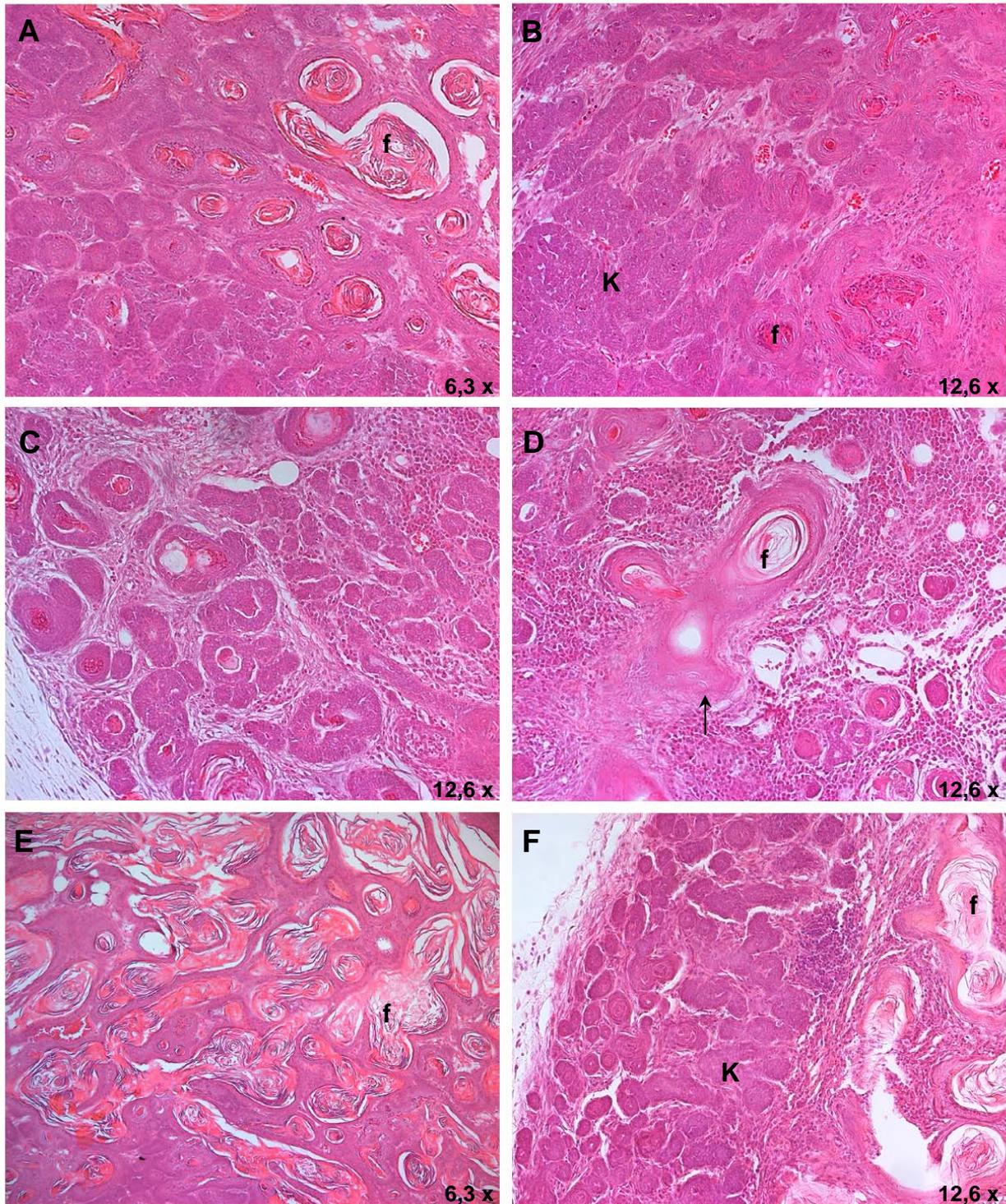


Abbildung 23. H&E-Färbung verschiedener APC^{+1572T}-Tumoren. Auf histologischer Ebene zeigen die APC^{+1572T}-Tumoren ein Spektrum verschiedenartiger Tumoren. So sind häufig fibrilläre Ablagerungen (in A, B, D, E und F mit f gekennzeichnet) als auch Karzinome (in A und F mit K gekennzeichnet) zu beobachten. Um die fibrillären Ablagerungen herum befinden sich Zellen mit stark vergrößertem Zellkern (Pfeil in D).

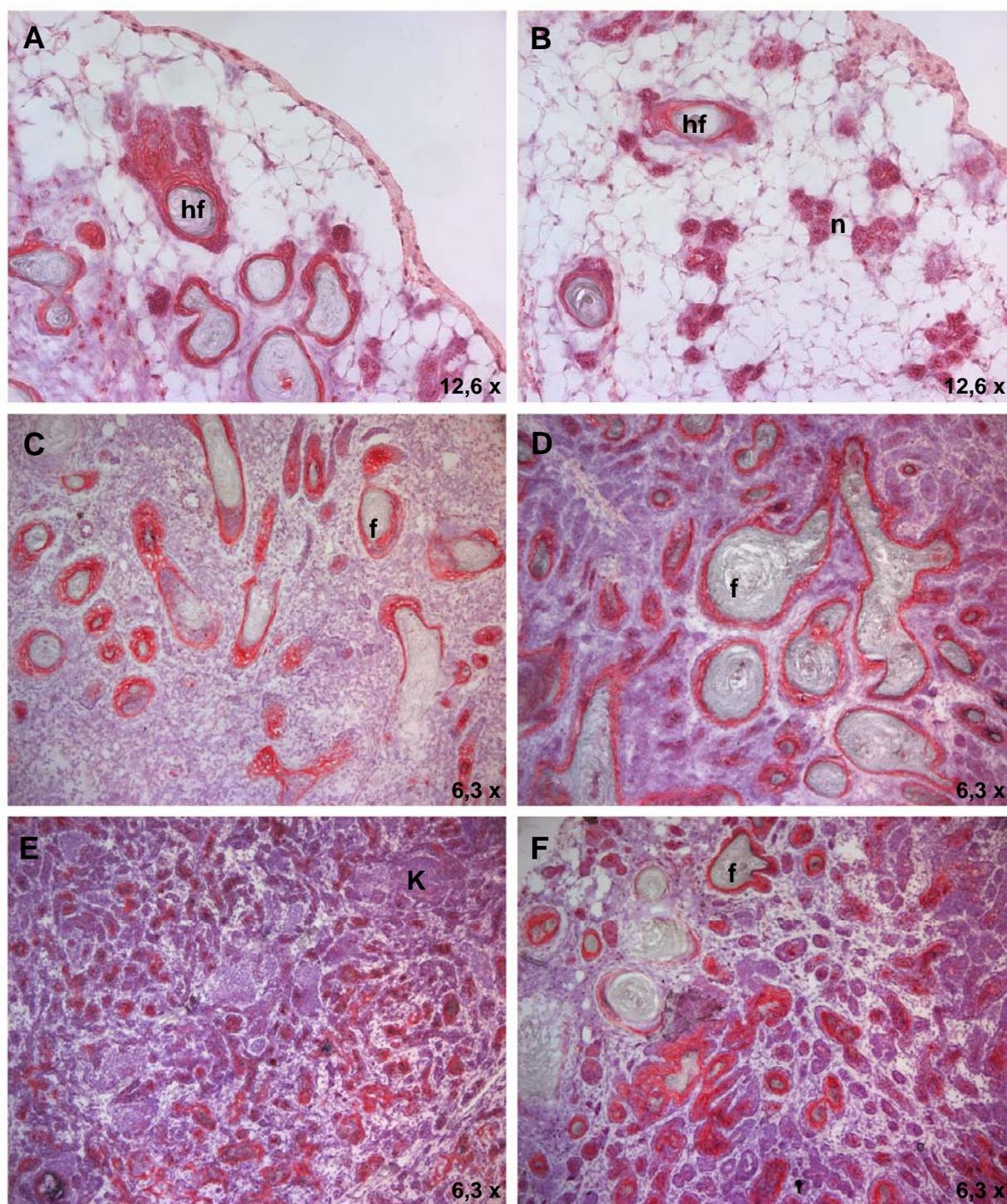


Abbildung 24. Immunhistologische Untersuchung der CD24-Expression in Brusttumoren von $APC^{+/1572T}$ -Mäusen. A, B Brustgewebe mit beginnendem, hyperplastischem Wachstum und fibrillären Ablagerungen im Drüsenlumen (hf). C - F fortgeschrittenere Tumoren mit ausgedehnten fibrillären Ablagerungen (f) und Bildung von Karzinomen (K). Eine starke CD24-Färbung ist vor allem auf den Strukturen, welche die Ablagerungen umgeben vorhanden.

Histologische Analyse von Gewebeschnitten des MMTV-PyVMT-Modells

Allgemein wurde in Tumorschnitten des MMTV-PyVMT-Modells eine ähnlich ausgeprägte heterogene CD24-Färbung beobachtet wie in den anderen Modellen zuvor (Abbildung 25). Dabei wurde in frühen Stadien (Hyperplasie/Adenom) eine starke Färbung festgestellt, die zum Teil auf bestimmte Bereiche des Gewebes beschränkt (A, Pfeile), in histologisch ähnlichem, benachbartem Gewebe allerdings nicht zu detektieren war (A, Kreuze). In fortgeschritteneren Stadien wurde ebenfalls eine Schwankung in der Intensität der Färbung sowohl zwischen verschiedenen Tieren (B, C, D) als auch innerhalb eines Tieres (B, Pfeil bzw. Kreuz) festgestellt. In Karzinomen zeigte sich ein ähnliches Bild mit zum Teil starker, relativ homogener Färbung (G, H), relativ schwacher, heterogener Färbung (I) und nicht detektierbarer Färbung (F).

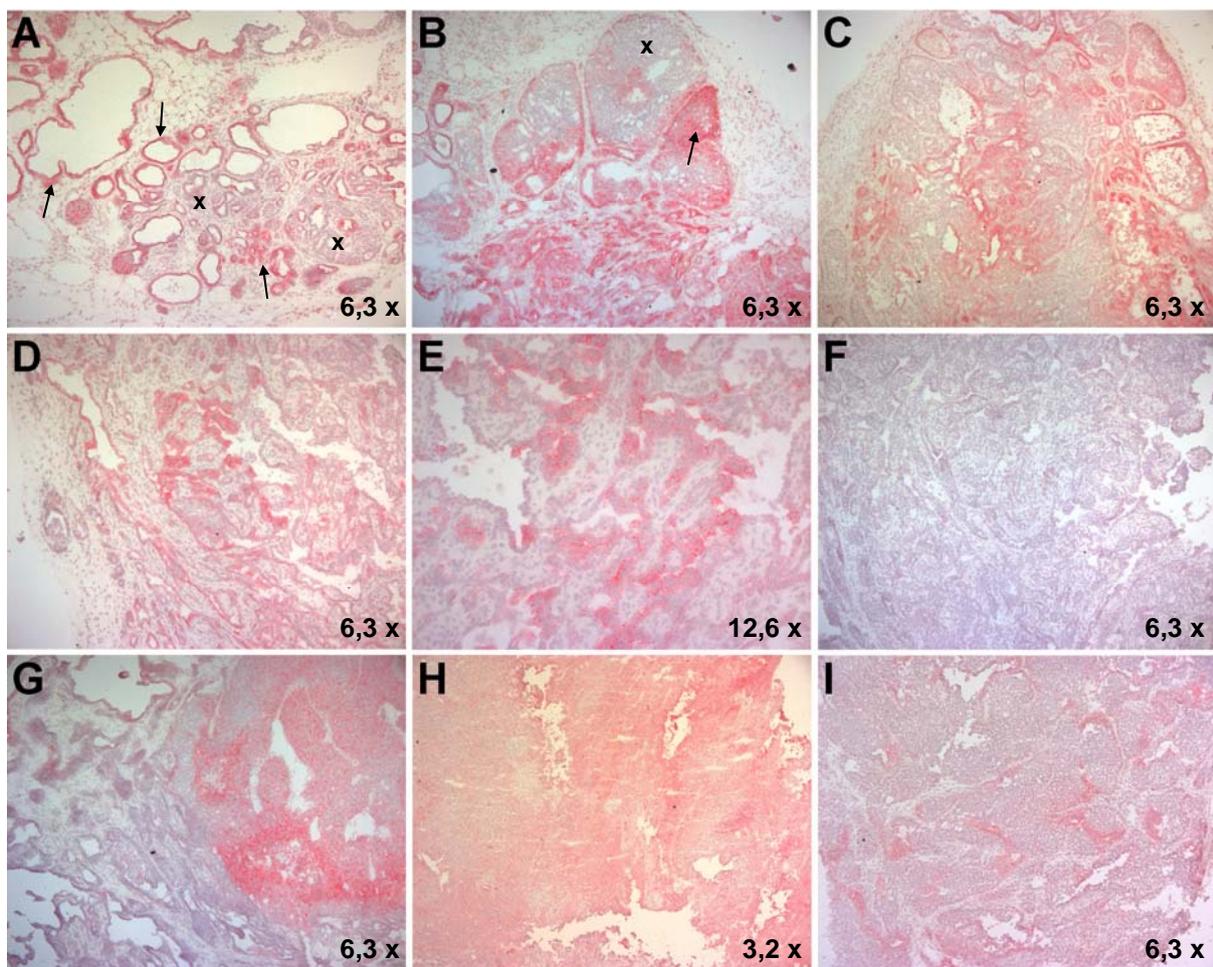


Abbildung 25. CD24-Expression im Brustgewebe bzw. in Brusttumoren von MMTV-PyVMT-Mäusen. A frühes Stadium mit starker (Pfeile) bzw. nicht detektierbarer (Kreuze) CD24-Färbung. B - D fortgeschrittenes Stadium mit heterogener CD24-Färbung; E vergrößerte Darstellung aus D; F - G Karzinome mit unterschiedlicher Verteilung und Intensität der CD24-Färbung.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die sogenannte Mikrosatellitenanalyse von genetischen Markern zur Untersuchung der Reinheit des genetischen Hintergrundes von Mausstämmen eingesetzt (siehe Material und Methoden, S. 50). Die Analyse war insbesondere im Fall der MMTV-PyVMT-Mäuse notwendig, da diese ursprünglich im FVB-Mausstamm generiert wurden, und zur Vereinheitlichung und Vergleichbarkeit der Versuche zunächst auf den im ITG vorhandenen C57Bl/6J-Mausstamm rückgekreuzt werden mussten. Durch die Mikrosatellitenanalyse wurde der erreichte „Reinheitsgrad“ der Rückkreuzung kontrolliert. Dadurch war es auch möglich, gezielt solche Tiere für die weitere Rückkreuzung zu wählen, welche die geringsten Hintergrundsunterschiede zeigten.

Neben der Kontrolle des Rückkreuzungserfolges wurde die Gelegenheit genutzt, um auch die übrigen in dieser Arbeit verwendeten Mausmodelle auf ihre genetische „Reinheit“ zu überprüfen. Es zeigte sich, dass - obwohl ursprünglich im Bl/6-Stamm generiert - auch die CD24 knock-out Mäuse und die APC^{+1572T}-Mäuse auf genomischer Ebene Unterschiede zum ITG-eigenen C57Bl/6J-Hintergrund aufwiesen. Die dadurch erforderlichen Rückkreuzungen auf den ITG C57Bl/6J-Stamm führte zu einer erheblichen Verzögerung der ursprünglich geplanten Verpaarung der knock-out-Mäuse mit den Tumormodellen APC^{+1572T} und MMTV-PyVMT. Aus diesem Grund war es im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich, die geplanten Studien zur Erforschung der funktionellen Rolle von CD24 *in vivo* durchzuführen.

Bei Beginn der routinemäßigen Überwachung des genetischen Hintergrundes der Mausmodelle war die Verpaarung des TRAMP-Modells mit den CD24 k.o.-Mäusen für die Überlebensstudie bereits abgeschlossen. Zur Bestätigung des Ergebnisses werden die Verpaarungen allerdings nach erfolgreicher Rückkreuzung der CD24 k.o.-Mäuse wiederholt.

Diskussion

CD24 wurde ursprünglich im hemapoetischen System entdeckt (*Springer et al., 1978*) und ist in zahlreichen Geweben exprimiert. Die funktionelle Rolle von CD24 konnte allerdings nur für einige dieser Gewebe geklärt werden.

Neben physiologischen Prozessen ist CD24 auch für pathologische Prozesse von Bedeutung. Vielfache Untersuchungen deuten insbesondere auf eine Beteiligung im Bereich der Tumorigenese und der Metastasierung unter anderem in Brusttumoren hin. In diesem Kontext ist auch die Frage nach der Rolle von CD24 in Brustkrebsstammzellen, welche als initiiierende und erhaltende Einheit von Brusttumoren betrachtet werden, von großer Bedeutung (*Dalerba et al., 2007; Lynch et al., 2006*). Als potentielle Kandidaten für den zellulären Ursprung von Brustkrebsstammzellen werden unter anderem auch gewebeeigene Brustepithelstammzellen gehandelt (*Smalley und Ashworth, 2003*). Diese Verbindung macht deutlich, dass die Untersuchung von CD24 im physiologischen Kontext nicht nur zum Verständnis dessen dortiger Funktion beiträgt, sondern eventuell auch Rückschlüsse auf seine pathologische Rolle erlauben kann.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Erforschung der Rolle von CD24 in der normalen Mausbrustdrüse in den Mittelpunkt gestellt. Um darüber hinaus auch einen Einblick in die Bedeutung von CD24 unter pathologischen Bedingungen zu bekommen, wurden mehrere Maustumormodelle im Hinblick auf die Beteiligung von CD24 am Progressionsprozess charakterisiert.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD24 im normalen Brustgewebe zwar für die Funktion von Maus-Brustepithelstammzellen entbehrlich ist, in der Regulation des Verzweigungsprozesses des Drüsenepithels hingegen eine funktionelle Rolle übernimmt. Im Kontext der untersuchten Tumormodelle wurde auf Grund von Überlebensstudien eine funktionelle Beteiligung von CD24 and der Progression von Prostatumoren nachgewiesen.

CD24 ist im Brustgewebe spezifisch auf Brustepithelzellen, vor allem auf luminalen Zellen, exprimiert

An Hand immunhistologischer Färbungen konnte festgestellt werden, dass CD24 spezifisch von Epithelzellen des Brustgewebes, nicht aber von Adipozyten (Fettzellen) oder stromalen Zellen exprimiert wird (Abbildung 6). Eine Ausnahme bilden CD24-positive, in FACS-Studien mit frisch aufbereitetem Brustgewebe als hemopoetisch identifizierte Zellen (Marie-Ange Deugnier, Institut Marie Curie, Paris, unveröffentlichte Daten). Solche migratorischen hemopoetischen Zellen sind in allen Phasen der Brustentwicklung im Brustgewebe zu finden und tragen durch sekretierte Faktoren bedeutend zum Wachstum der Terminal End Buds als auch der Epithelgänge bei (Guon-Evans et al., 2002). Die epithelspezifische Expression von CD24 wurde im Brustgewebe inzwischen mittels FACS-Analysen gezeigt (Sleeman et al., 2006), es existiert allerdings auch eine Studie, die bezüglich der Verteilung der CD24-Expression eine gegensätzliche Aussage trifft und auf histologischer Basis eine ubiquitäre Expression von CD24 im Brustgewebe vorschlägt (Stingl et al., 2006). Diese Diskrepanz könnte unter anderem auf unterschiedliche Methoden der Gewebefixierung und der Färbung beruhen. Verschiedene, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Vorversuche haben gezeigt, dass es sich dabei um äußerst kritische Punkte beim histologischen Nachweis der CD24-Expression handelt. Abhängig von der Fixierungsmethode, der Aufbereitung des Gewebes (Paraffin, Gefrierschnitt) und des verwendeten Antikörpers wurden unterschiedliche Resultate hinsichtlich Intensität und Verteilungsmuster der Färbung erzielt (Daten nicht gezeigt). Da nicht klar ersichtlich ist, welche Methode in der von Stingl et al. veröffentlichten Studie verwendet wurde, ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Die in der Literatur gezeigte Abbildung lässt jedoch vermuten, dass die Aussage über die ubiquitäre Expression von CD24 im Brustgewebe auf Grund einer unspezifischen Färbung bzw. einer Überfärbung getroffen worden sein könnte.

In dieser Arbeit wurde innerhalb der Brustepithelpopulationen eine differenzielle Verteilung der CD24-Expression beobachtet. Luminales Epithel zeigte eine sehr starke Expression von CD24, im Myoepithel hingegen konnte keine eindeutige Expression festgestellt werden. Diese Ergebnisse stimmen damit mit den kürzlich von Sleeman et al. (2006) veröffentlichten Daten zum großen Teil überein. So wurde dort durch FACS-Analyse der nicht-epitheliale Teil der Brust ebenfalls als CD24-

negativ und der luminalen Epithelanteil als stark CD24-positiv charakterisiert. Allerdings wird die Myoepithelpopulation von Sleeman et al. entgegen der histologischen Daten dieser Arbeit als schwach CD24-positiv beschrieben (CD24^{low}) (Sleeman et al., 2006). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Aussagen hinsichtlich des CD24-Expressionsstatus des Myoepithels liegt in den Methoden, die den beiden Analysen zu Grunde liegen. So erlaubt im Gegensatz zur histologischen Analyse die äußerst sensitive FACS-Analyse auch die Detektion sehr schwacher Signale, was es Sleeman et al. wahrscheinlich ermöglichte, die Myoepithelpopulation als CD24^{low} zu beschreiben.

Eine CD24-Färbung des Myoepithels konnte in dieser Arbeit nur in wenigen Fällen mittels der chromogen-basierten Immunhistologie beobachtet werden (siehe Abbildung 6 b), ist jedoch höchstwahrscheinlich auf die mit dieser Methode verknüpften Nicht-Linearität des Signals zurückzuführen.

CD24 ist ein Marker der funktionellen Differenzierung des Brustepithels

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist die CD24-Expression im Brustgewebe abhängig vom funktionellen Differenzierungsgrad des Brustepithels. Diese Beobachtungen sprechen für eine Rolle von CD24 als Differenzierungsmarker in Brustepithelzellen. Unterstützt wird diese Annahme von zahlreichen Studien, in denen die differenzierungsabhängige Expression von CD24 bereits in verschiedenen anderen Geweben bzw. Zelltypen gezeigt wurde. So kommt es bei B-Zellen während der Differenzierung und der damit verbundenen Neuordnung der Immunglobulingene (Ig gene rearrangement) (Rudin und Thompson, 1998), zu einem sukzessiven Verlust der CD24-Expression, welche am Ende auf funktionell ausgereiften, Antikörper produzierenden Plasmazellen nicht mehr vorhanden ist (Nielsen et al., 1997). Im Zentralnervensystem ist CD24 sowohl auf embryonalen (Calaora et al., 1996) als auch auf adulten (Belvindrah et al., 2002) neuronalen Vorläuferzellen exprimiert und wird dort ebenfalls mit Zunahme des neuronalen Differenzierungsgrades herunterreguliert. In Zusammenhang mit epithelialen Geweben wurde ebenfalls von einer entwicklungs- und differenzierungsabhängigen Regulation der CD24-Expression berichtet (Akashi et al., 1994; Shirasawa et al., 1993; Nieoullon et al., 2007). Hier findet sowohl in der Haut als auch der Cornea während der Differenzierung von Epithelzellen zwar zunächst eine Zunahme der Expression statt, die CD24-Expression ist allerdings in vollständig ausgereiften Epithelzellen nicht mehr vorhanden (Nieoullon et al., 2007).

Die genaue funktionelle Bedeutung der differenzierungsabhängigen Expression von CD24 während dieser physiologischen Prozesse ist noch unklar. Da CD24 die Fähigkeit zur Signalübermittlung bzw. Signalmodulation besitzt (*Hahne et al., 1994; Baumann et al., 2005; Fischer et al., 1990; Suzuki et al., 2001*) könnte die regulierte Expression von CD24 zu einer Beeinflussung dieser Signalwege führen. Zusammen mit den damit verbundenen Veränderungen in positiven bzw. negativen Rückkopplungsmechanismen würden damit molekulare Rahmenbedingungen geschaffen, die dazu beitragen, dass die Zelle in eine bestimmte Richtung differenzieren kann.

Wie könnte die Expression von CD24 reguliert sein? Eine Möglichkeit beinhaltet beispielsweise die Steuerung der Promotoraktivität. Der Promotor von CD24 weist sowohl Elemente konstitutiv exprimierter als auch gewebespezifisch und differenziell exprimierter Gene auf. Obwohl der CD24-Promotor Erkennungssequenzen für verschiedene bekannte Transkriptionsfaktoren enthält (*Wenger et al., 1993*), ist dessen transkriptionelle Regulation weitgehend unerforscht. Detaillierte Promotorstudien würden daher wesentlich zu einem erweiterten Verständnis der Regulation der CD24-Expression und damit auch der Funktion von CD24 beitragen. Ein kürzlich entdeckter Faktor, der in der Lage ist, die Promotoraktivität von CD24 zu beeinflussen, ist IGFBP-2 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein-2). Wird die Expression von IGFBP-2 unterdrückt, kommt es zur Inaktivierung des CD24-Promotors (*Fukushima et al., 2007*). Da die IGFB-Proteine und die von ihnen gebundenen IGFs (Insulin-like Growth Factors) in der Physiologie und Entwicklung der Brust eine große Rolle spielen (*Wood et al., 2000*), wäre eine Regulation der CD24-Expression in der Brust über IGFB-Proteine bzw. IGFs potentiell denkbar.

Die in dieser Arbeit durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen zeigen eine schrittweise Reduktion der CD24-Expression während der Schwangerschaft und den Verlust der Expression während der anschließenden Laktationsphase. Diese funktionelle Differenzierung wird von einem komplexen Netzwerk an Hormonen, darunter z.B. Progesteron, Östrogen und Prolactin, und deren Rezeptoren reguliert (*Hennighausen und Robinson, 2005*). Prinzipiell wäre es vorstellbar, dass die Expression von CD24 durch eines oder mehrere dieser Hormone beeinflusst wird. Ein Hinweis darauf ist in der Studie von Sorbello et al. (2003) zu finden, in der CD24 in Brustkrebszellen als ein von Östrogen reguliertes Gen identifiziert wurde.

In welcher Weise diese Regulation erfolgt, ist noch nicht bekannt. Allgemein sind mehrere Mechanismen beschrieben, mit denen Östrogen durch Bindung an seinen

Rezeptor die Transkription von Genen beeinflussen bzw. initiieren kann. Zum einen kann der aktivierte Östrogenrezeptor direkt an sogenannte EREs (Estrogen Responsive Elements) im Promotor des jeweiligen Zielgens binden. Bei Östrogen-regulierten Zielgenen ohne EREs entfaltet der Östrogenrezeptor hingegen durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. AP-1, seine Wirkung (*Björnström und Sjöberg, 2005*). Bei der Sequenzanalyse des CD24-Promotors der Maus wurde eine mutmaßliche AP-1-Bindestelle identifiziert (*Wenger et al., 1993*), ihre Funktionalität, ebenso wie die mögliche Existenz eines funktionellen ERE jedoch noch nicht überprüft. Diese Punkte sollten in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

CD24 ist in Terminal End Buds exprimiert

Zusätzlich zu den Beobachtungen in funktionell ausdifferenziertem Brustgewebe wurde im Rahmen dieser Arbeit eine unterschiedliche Verteilung der Expression von CD24 in den Terminal End Buds der Mausbrustdrüse beobachtet (Abbildung 7). Hier zeigen die als Stammzellen beschriebenen Cap-Zellen eine äußerst schwache, die luminalen Body-Zellen eine sehr starke CD24-Expression.

Cap-Zellen gelten sowohl als Vorläufer von luminalen als auch von myoepithelialen Epithelzellen (*Smalley und Ashworth, 2003*). Der Erwerb der CD24-Expression auf luminalen Body-Zellen könnte daher ein möglicher Indikator für die Festlegung (commitment) ihrer Differenzierung zum luminalen Zelltyp sein. Interessanterweise wird die differenzielle Verteilung der CD24-Expression in den aus TEBs entstehenden Brustepithelgängen aufrecht erhalten. Hier ist in der Immunfluoreszenzanalyse die luminalen Epithelschicht stark CD24-positiv, die Myoepithelschicht hingegen CD24-negativ.

Da sich die beiden epithelialen Zelltypen der Brust (Myoepithel und luminales Epithel) sowohl morphologisch als auch funktionell unterscheiden (*Gudjonsson et al., 2005*), ist die Regulation ihrer Differenzierung und Aufrechterhaltung ihrer zellulären Identität von großer Bedeutung. Eines der Proteine, das für diese Vorgänge essenziell ist, ist der Transkriptionsfaktor GATA-3. Der Verlust von GATA-3 durch konditionellen knock-out führt zu einer erheblich beeinträchtigten Entwicklung des Brustepithels. So kommt es zur Anreicherung von luminalen Vorläuferzellen, deren weitere Differenzierung zu luminalem Epithel blockiert ist. Hingegen hat die ektopische Überexpression von GATA-3 in Stamm- bzw. Vorläuferzellen der Brust

ihre forcierte Differenzierung zu luminalen Epithelzellen zur Folge (*Asselin-Labat et al., 2007*). Die Expression von GATA-3 in der Brust zeigt starke Ähnlichkeiten zur Expression von CD24. In TEBs ist GATA-3 verstärkt in Body-Zellen und in normalen Epithelgängen in der luminalen Epithelschicht zu finden (*Asselin-Labat et al., 2007*).

Der Verlust von CD24 in knock-out Mäusen zeigt allerdings hinsichtlich der luminalen Differenzierungsrichtung keine mit dem GATA-3 knock-out vergleichbaren Auswirkungen. Eine ähnlich bedeutende Funktion wie die von GATA-3 ist für CD24 im Differenzierungsprozess von Brustepithelzellen demnach unwahrscheinlich. Die genaue Rolle von CD24 in diesem Vorgang bleibt daher noch unklar.

Außer im Brustgewebe ist die CD24-Expression beispielsweise auch im hemopoetischen System indikativ für die Festlegung einer bestimmten Differenzierungsrichtung. Hier geht der Erwerb der CD24-Expression auf multipotenten hemopoetischen Stamm- bzw. Vorläuferzellen mit der Differenzierung zu unipotenten B-Zellvorläufern einher (*Hunte et al., 1998*).

CD24 hat keine essenzielle Rolle in Brustepithelstammzellen

Die Expression von CD24 auf Brustepithelstammzellen ist als CD24^{low} (*Sleeman et al., 2006*) bzw. CD24⁺ (*Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006*) beschrieben und wird als Marker für ihre Anreicherung bzw. Isolation benutzt. Diese Tatsache führte unter anderem zu der Frage, ob CD24 auf Brustepithelstammzellen lediglich als phänotypisches Erkennungsmerkmal dient, oder eine Funktion ausübt. Zu den charakteristischen und essenziellen Stammzeleigenschaften gehören ihre Fähigkeit zur Selbsterhaltung (self-renewal) und zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen (*Woodward et al., 2005*).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CD24 für diese primären Stammzellfunktionen nicht erforderlich ist. CD24-defiziente Brustepithelstammzellen zeigen in Transplantationsexperimenten die gleiche Rekonstitutionsfähigkeit wie Wildtypepithelstammzellen und bringen ein funktionell intaktes Brustgewebe hervor. Ähnliches wurde bereits für das ebenfalls als Brustepithelstammzellmarker geltende Protein CD49f (α_6 -Integrin) (*Shackleton et al., 2006; Stingl et al., 2006*) gezeigt. Auch hier hatte der Verlust der CD49f-Expression weder einen Einfluss auf die allgemeine Rekonstitutionsfähigkeit der k.o.-Transplantate noch auf deren funktionelle Differenzierung in der Schwangerschaft (*Klinowska et al., 2001*). Diese Daten zeigen,

dass die Eigenschaft als Stammzellmarker demnach nicht zwingend mit einer essenziellen Rolle für Stammzellen einhergehen muss.

Welche Rolle könnte den Oberflächenmarkern von Stammzellen dann zukommen? Ein weiterer bedeutender Faktor für die Funktion von Stammzellen ist die Stammzellnische, welche den Stammzellen als Verankerungspunkt/Aufenthaltort dient und ihre Physiologie reguliert. Zum einen erfolgt diese Regulation über lösliche Signale wie Cytokine, zum anderen über strukturelle Signale wie beispielsweise die direkte Adhäsion an Nischenzellen oder an ihre extrazelluläre Matrix (*Scadden, 2006*). Adhäsionsmoleküle wie CD49f könnten dadurch indirekt zur Funktion von Stammzellen beitragen und zudem auf Grund ihrer starken Expression auf Bruststammzellen unter experimentellen Bedingungen einen Schutz während der enzymatischen Präparation der Zellen bieten. Auf diese Weise könnten sie das Anwachsen der Zellen nach Einzelzelltransplantation in den Empfänger begünstigen (*Smith, 2006a*). Die Frage nach dem möglichen Beitrag von CD24 in diesem Zusammenhang bleibt allerdings noch offen, insbesondere, da Brustepithelstammzellen im Vergleich zur starken CD49f-Expression nur eine schwache (CD24^{low}, *Sleeman et al., 2006*) bis mittlere CD24-Expression (CD24⁺, *Shackleton et al., 2006, Stingl et al., 2006*) aufweisen.

CD52 dient nicht als Substitutionsmolekül in CD24 knock-out Mäusen

Trotz der in unterschiedlichen Geweben für CD24 gezeigten Funktionen (siehe Einleitung) zeigen CD24 knock-out Mäusen nur einen vergleichsweise milden Phänotyp (*Nielsen et al., 1997*). Auch die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass der Verlust von CD24 im Brustgewebe bzw. auf Brustepithelstammzellen keine ernsthaften Auswirkungen hat. So zeigen CD24-defiziente Mäuse weder eine gestörte Entwicklung, noch eine beeinträchtigte Funktion der Brust.

Die Beobachtung, dass die Abwesenheit eines Proteins nicht zwangsläufig einen tiefgreifenden Phänotyp hervorruft, ist bereits in zahlreichen unterschiedlichen knock-out Modellen gemacht worden. Dabei werden die Funktionen des ausgeschalteten Proteins in den meisten Fällen durch das überlappende Funktionsspektrum anderer, eng verwandter und strukturell ähnlicher Proteinfamilienmitglieder übernommen, was als molekulare Redundanz bzw. Kompensation bezeichnet wird. Beispiele hierfür sind Mitglieder der Src-Kinasefamilie (*Stein et al., 1994*), der Familie der Cycline und der

Cyclin-abhängigen Kinasen (*Santamaria und Ortega, 2006*) sowie Mitglieder der AP-1 Transkriptionsfaktorfamilie (*Mechta-Grigoriu et al., 2001*).

Als potentieller Kandidat für eine kompensatorische Rolle für CD24 kommt das Molekül CD52 in Frage, dessen Expression bisher in Lymphozyten (*Hale et al., 1990*), der Milz (*Xia et al., 1991*), und Teilen des männlichen Reproduktionssystems beschrieben wurde (*Hale et al., 1993; Kirchhoff et al., 1993*). CD52 weist durch den kleinen, GPI-verankerten Proteinkern und die starke Glykosilierung eine ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit zu CD24 auf. Zusätzliche Ähnlichkeit findet sich auch auf genetischer Ebene, wodurch vermutet wird, dass CD52 und CD24 gemeinsamen genetischen Ursprungs sind. CD52 gilt daher als einziges Paralog von CD24 (*Tone et al., 1999*).

Trotz dieser Ähnlichkeiten kann auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit eine Kompensation von CD24 durch CD52 ausgeschlossen werden. Interessanterweise zeigt die CD52-Expression (Abbildung 20) eine Analogie zu dem auf Proteinebene beobachteten differenzierungsabhängigen Expressionsverlauf von CD24 (Abbildung 8), was die Frage nach einer potentiellen Kreuzreaktivität des CD24-Antikörpers mit CD52 aufwirft. Da jedoch keine Färbung in den Gewebeschnitten von CD24 knock-out Mäusen beobachtet wird, ist der Antikörper spezifisch für CD24.

CD24 ist ein negativer Regulator der Verzweigung von Brustepithelgängen

Wie die Untersuchung von CD24 k.o.-Mäusen gezeigt hat, führt der Verlust von CD24 zur Ausbildung eines dichteren und verzweigteren Netzwerkes an Brustepithelgängen. Dieser Effekt ist speziell in der Pubertät, nicht aber in adulten Stadien der Brustentwicklung zu beobachten. CD24 scheint daher spezifisch in der Pubertät die Verzweigung der Epithelgänge negativ zu regulieren.

Die Regulation der Verzweigung unterliegt einem vielschichtigen Zusammenspiel verschiedener systemischer Hormone (z.B. Östrogen und Progesteron), lokaler Wachstumsfaktoren (z.B. EGF) und der Interaktion des Epithels mit dem umgebenden Stroma. Für den korrekten Ablauf des Verzweigungsprozesses ist dabei das Gleichgewicht aus positiven und negativen Regulatoren entscheidend (*Sternlicht, 2006; Sternlicht et al., 2006*).

Als negativer Regulator der Verzweigung von Epithelgängen ist Sprouty2 bekannt (*Tefft et al., 1999; Lu et al., 2005*), dessen Expression in der Brust während der Pubertät sehr hoch ist, mit Erreichen der Adoleszenz allerdings abnimmt (*Lo et al., 2004*). Da

diese Expression von Sprouty2 mit dem zeitlich auf die Pubertät begrenzten Auftreten des stärker verzweigten Drüsennetzwerkes im k.o.-Gewebe überlappt, könnte daher eine CD24-abhängige Regulation von Sprouty2 eine mögliche Erklärung für den beobachteten Effekt sein.

In der Brust übt Sprouty2 seine negative regulatorische Rolle über die Hemmung der FGF-Rezeptor 2-Signaltransduktionskaskade aus (Lu et al., 2005). Welche Proteine *in vivo* an der Kaskade beteiligt sind, ist allerdings noch unklar. *In vitro* konnten unter anderem das Adapterprotein FRS2 (FGF Rezeptor Substrat 2) und Mitglieder der Src-Familie identifiziert werden, wobei Sprouty2 für Src ein direktes Substrat darstellt (Li, X et al., 2004). Da FRS2 (Ridyard et al., 2003), Src (Simons and Toomre, 2000) und CD24 (Suzuki et al., 2001) in lipid rafts lokalisiert sein können, ist es denkbar, dass CD24 durch die räumliche Nähe einen Einfluss auf die Funktion der Proteine ausüben könnte. Durch den Verlust von CD24 könnte die Regulation der FRS2 bzw. Src-abhängigen Phosphorylierung von Sprouty2 verändert sein und als Folge der eingeschränkten inhibitorischen Wirkung von Sprouty2 in einer verstärkten Verzweigung der Epithelgänge resultieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die Sprouty2-Expression im Brustgewebe von Wildtyp als auch CD24 knock-out Mäusen histologisch zu untersuchen, allerdings konnte mit den verwendeten Antikörpern bislang keine Färbung erzielt werden. Die potentielle Verbindung von CD24 und Sprouty2 sollte daher unter Zuhilfenahme anderer Antikörper bzw. anderer Methoden wie z.B. *in-situ*-Hybridisierung weiter verfolgt werden.

Ein der Verzweigung ähnlicher Vorgang ist das Auswachsen von Neuriten, welches von CD24 ebenfalls negativ reguliert wird. Die inhibitorische Wirkung von CD24 wird dabei über die Interaktion mit und die Modulation von dessen gehirnspezifischen Liganden L1 vermittelt (Kleene et al., 2001). Die Fähigkeit von CD24 die Aktivität von Oberflächenmolekülen zu beeinflussen wurde außer für L1 auch für den Chemokinrezeptor CXCR4 gezeigt (Schabath et al., 2006), und könnte damit einen weiteren Mechanismus für die Funktionsweise von CD24 darstellen. Bislang ist *in vivo* noch kein brustspezifischer Ligand identifiziert worden, dessen Aktivität von CD24 reguliert sein könnte.

In diesem Zusammenhang könnte auch die in dieser Arbeit gezeigte differenzielle Verteilung der CD24-Expression zwischen luminalen Body-Zellen und Cap-Zellen in den Terminal End Buds als auch zwischen luminalen Zellen und Myoepithelzellen in

normalen Brustepithelgängen von Bedeutung sein. Ein Szenario, in welchem die Expression eines potentiellen CD24-Liganden in umgekehrter Weise existiert, könnte zur Kommunikation zwischen den Epithelschichten beitragen und eine mögliche Grundlage für die von CD24 vermittelten Funktionen in der Brust sein.

Die CD24-Expression hat im HC11-Differenzierungsmodell keinen Einfluss auf die Laktation

HC11-Zellen dienen als *in vitro*-Modell für Laktationsdifferenzierungsstudien. Während der Differenzierung von parenteralen HC11-Zellen wurde eine Regulation der CD24-Expression beobachtet, was eine potentielle funktionelle Korrelation zwischen CD24 und dem Differenzierungsprozess vermuten ließ. Diese Annahme konnte allerdings nach Manipulation der CD24-Expression mittels RNA-Interferenz nicht bestätigt werden. Darüber hinaus stehen die HC11-Daten im Widerspruch zu der *in vivo* beobachteten fehlenden CD24-Expression während der Laktationsphase der Brust. Damit erscheint das HC11-Modell für die *in vitro*-Untersuchung der Funktion von CD24 auf den ersten Blick als nicht geeignet. Wie können die Diskrepanzen zwischen den Beobachtungen *in vitro* und *in vivo* begründet werden?

Die Brust ist im Gegensatz zum *in vitro*-Modell ein dreidimensionales Gewebe. Mehrfach wurde gezeigt, dass diese dreidimensionale Struktur für die zelluläre Organisation, die Reaktion auf extrazelluläre Stimuli und somit für das Verhalten von Zellen von zentraler Bedeutung ist. Durch Kultivierung in einer dreidimensionalen Matrix können die verschiedenen, vom Brustepithel *in vivo* gezeigten Eigenschaften in gewissem Rahmen nachgeahmt werden (Schmeichel and Bissel, 2003; Nelson et al., 2006). So bilden HC11-Zellen in einer der extrazellulären Matrix nachempfundenen Umgebung die für Epithelzellen typische Polarität aus und wachsen in drüsenähnlichen Strukturen (Mukhina et al., 2006; Xian et al., 2005). Dieses Verhalten könnte ausgenutzt, und in weiterführenden Versuchen überprüft werden, ob sich durch die Kultivierung in einer dreidimensionalen Matrix der *in vivo* beobachtete Verlust der CD24-Expression während der Differenzierung *in vitro* bestätigen lässt.

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Interaktion des mesenchymalen/stromalen Gewebes mit dem Epithelgewebe der Brust. Sie spielt bereits während der embryonalen Phase als auch später im adulten Organismus für die Entwicklung und das Wachstum der Brust eine große Rolle. Ein Beispiel für diese Interaktion ist der EGF-Rezeptor. Er wird zwar sowohl von stromalen, als auch von epithelialen Zellen

der Brust exprimiert, für einen maßgeblichen Einfluss auf die Brustentwicklung ist jedoch die EGFR-Expression im Stroma verantwortlich. Dies wurde durch Geweberekombinationsexperimente gezeigt, in denen EGFR-k.o. Stroma bzw. EGFR-k.o. Brustepithel mit Wildtypstroma bzw. Wildtypbrustepithel gemischt und anschließend transplantiert wurden. Ein Wachstum des Epithels wurde nur in Geweberekombinationen mit EGFR-exprimierendem Wildtypstroma beobachtet (Parmar and Cunha, 2004). Die Kultivierung von HC11-Zellen erfolgte ohne den Einfluss stromaler Zellen und könnte daher die Situation *in vivo* nur unzureichend widerspiegeln.

Das in dieser Arbeit beobachtete uneinheitliche laktogene Verhalten der HC11 RNAi-Klone lässt auf eine klonale Varianz schließen. Eine Erklärung hierfür könnte in den stammzellähnlichen Eigenschaften der HC11-Linie liegen. Aus einer Stammzelle können verschiedene Zelltypen hervorgehen (Multipotenz), was im Falle der HC11-Zellen die Entstehung einer heterogenen Kultur zur Folge hat. Eine solche Heterogenität wurde bereits durch die Isolation klonaler HC11-Abkömmlinge gezeigt, welche durch die Expression spezifischer Markerproteine als myoepithelial charakterisiert wurden. Die isolierten Klone waren entsprechend ihrer zellulären Identität nicht zur laktogenen Differenzierung fähig (Deugnier et al., 1999). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass es sich auch im Fall der RNAi-Klone um verschiedenartig differenzierte Epithelzellen mit unterschiedlichen Eigenschaften handelt und die Ergebnisse die klonale Varianz dieses Modells widerspiegeln.

Zwar konnte in dieser Arbeit eine Übereinstimmung der *in vitro*-Analyse mit den *in vivo*-Daten nicht gezeigt werden, jedoch haben die an der HC11-Zelllinie durchgeführten Studien eine interessante Beobachtung ermöglicht. So zeigte sich während des Differenzierungsprozesses ein verändertes Spektrum an CD24-Glykoformen, was ein Hinweis auf eine von der Zellfunktion abhängige Glykosilierung von CD24 in Brustepithelzellen sein könnte.

Allgemein wird vermutet, dass die in verschiedenen Geweben wie beispielsweise dem hämatopoetischen System oder dem Zentralnervensystem beobachtete Variabilität der Glykosilierung von CD24 Grundlage der unterschiedlichen, von CD24 vermittelten Funktionen ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten mal gezeigt, dass das Spektrum an exprimierten CD24-Glykoformen auch innerhalb ein und des selben Zelltyps (Brustepithel) auf Grund einer veränderten Funktion der Zelle variieren kann. Da CD24 in Brusttumoren eine große Rolle spielt, ist daher von

besonderem Interesse zu untersuchen, in wiefern sich die Funktion von CD24 in normalem Brustepithel zu entartetem Brustepithel unterscheidet und in welchem Umfang veränderte CD24-Glykosierungsmuster dafür verantwortlich sind.

CD24 hat eine funktionelle Rolle in der Tumorprogression

Neben den in der Literatur und auch in dieser Arbeit gezeigten Funktionen in physiologischen Kontexten, spielt CD24 auch in pathologischen Prozessen eine bedeutende Rolle. CD24 erhöht sowohl *in vitro* als auch in Tierexperimenten *in vivo* die Invasivität von Tumorzellen (Senner et al., 1999; Baumann et al., 2005; Fukushima et al., 2007) und fördert die Metastasierung in die Lunge (Baumann et al., 2005).

In zahlreichen Studien wurde außerdem gezeigt, dass verschiedene humane Tumoren CD24 stark exprimieren (Abramson et al., 1981; Michiels et al., 1988; Schuurman et al., 1988; Droz et al., 1990; Jackson et al., 1992; Raife et al., 1994; Huang und Hsu, 1995; Fogel et al., 1999; Kristiansen et al., 2002; Kristiansen et al., 2004a; Liu et al., 2004; Santin et al., 2004; Kristiansen et al., 2005; Biade et al., 2006; Bircan et al., 2006), und dass die Expression im Vergleich zu normalem Gewebe deutlich erhöht ist (Fogel et al. 1999, Santin et al., 2004; Liu et al., 2004; Bircan et al., 2006; Biade et al., 2006). Die CD24-Expression korreliert dabei mit der Tumorprogression (Fogel et al., 1999; Jacob et al., 2004; Kristiansen et al., 2004b; Winkler et al., 2007) und gilt als Marker für eine ungünstige Patientenprognose (Kristiansen et al., 2002; Kristiansen et al., 2003a; Kristiansen et al., 2003b; Kristiansen et al., 2004a; Kristiansen et al., 2005; Weichert et al., 2005; Smith et al., 2006b; Surowiak et al., 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CD24-Expression im Tumorgewebe verschiedener Mausmodelle nachgewiesen. Im TRAMP-Prostatakarzinommodell wurde die Überlebensrate durch den vollständigen Verlust der CD24-Expression deutlich erhöht (Abbildung 23).

Um die mögliche Korrelation der CD24-Expression in den Tumormodellen zu untersuchen, wurde eine immunhistologische Untersuchung von Gewebeschnitten mit unterschiedlichen Tumorprogressionsstadien durchgeführt. Interessanterweise zeigte sich die CD24-Expression sowohl in ihrer Verteilung als auch Intensität in allen Tumormodellen als heterogen.

Beobachtungen im TRAMP-Modell

Im TRAMP-Modell wurde nur in einem Teil der intraepithelialen Neoplasien ein klarer Anstieg der CD24-Expression im Vergleich zu normalem Prostataepithel beobachtet, in anderen, histologisch ähnlich erscheinenden Neoplasien allerdings nicht (Abbildung 22 A - D). Ein ähnliches Bild ergab sich auch in fortgeschrittenen TRAMP-Prostatatumoren, wobei einige Karzinome keine, andere Karzinome allerdings eine ausgeprägte CD24-Expression zeigten.

Auch in humanen Prostatatumoren wurde eine solche Variabilität der CD24-Expression festgestellt. In der Studie von Kristiansen et al. wurde in 48% der Tumoren eine CD24-Färbung detektiert, wobei ferner auch eine große intratumorale Heterogenität der CD24-Expression beobachtet wurde (*Kristiansen et al., 2004b*).

Die Heterogenität von Tumoren stellt ein oft beobachtetes Merkmal dar und zeigt sich sowohl auf histologischer als auch auf molekularer Ebene. Wie könnte sich diese Heterogenität in den Tumormodellen erklären lassen?

Eine mögliche Begründung dafür könnte ein unterschiedlicher Progressions- bzw. Transformationsstatus der verschiedenen epithelialen Neoplasien sein. Im TRAMP-Modell ist zwar die Expression des transformierenden SV40 Tag Voraussetzung für die neoplastische Transformation und geht ihr zeitlich voraus, zur vollständigen Transformation sind allerdings weitere stochastische Ereignisse notwendig (*Gingrich et al., 1996*). Da diese nicht in allen Zellen gleichermaßen stattfinden, kann es infolgedessen zur Entstehung histologisch ähnlich erscheinender, auf molekularer und genetischer Ebene allerdings unterschiedlicher Neoplasien kommen.

Des Weiteren wurde in TRAMP-Mäusen gezeigt, dass veränderte, abnormale Mitosen zur ungleichen Verteilung von Chromosomen und damit zur genomischen Instabilität führen. Als Folge davon kann es allgemein zu einem veränderten Zellzyklus, zum zellspezifischen Verlust von Tumorsuppressoren bzw. zur Anhäufung tumorfördernder Gene/Faktoren und damit insgesamt zu einer veränderten Genexpression kommen (*Schatten et al., 2000*). Die genomische Instabilität trägt entscheidend zur Heterogenität der Tumorentwicklung und Progression bei (*Albertson et al., 2003*) und könnte für die in diesem Tumormodell beobachtete Heterogenität der CD24-Expression verantwortlich sein.

Beobachtungen im MMTV-PyVMT-Modell

Die Heterogenität zeigte sich in dieser Arbeit auch bei Tumormodellen mit Entwicklung multifokaler Tumoren, wie z.B. im MMTV-PyVMT-Modell. In Brusttumormodellen sind normalerweise alle zehn Brustdrüsen einer Maus der transformierenden Aktivität des Transgens ausgesetzt, so dass es häufig zur Entstehung mehrerer, sowohl in einer Brustdrüse als auch in unterschiedlichen Brustdrüsen lokalisierter Tumoren kommt. Die Entwicklung der Tumoren beginnt dabei zu unterschiedlichen Zeitpunkten, wodurch sich ein variierendes Progressionsspektrum ergibt. Es wurde gezeigt, dass das PyVMT-Modell sowohl auf morphologischer/histologischer Basis als auch in Bezug auf die Expression brustkrebsassoziierter Marker die Progression humaner Brusttumoren in vielen Aspekten rekapituliert (*Lin et al., 2003*). Vergleichende Genexpressionsanalysen geben jedoch Anlass zur Spekulation, dass die molekulare Basis der Progression abhängig von der Lokalisation der Tumoren ist. PyVMT-Tumoren, die in verschiedenen Brustdrüsen einer Maus entstanden sind, zeigen zwar einen morphologisch bzw. histopathologisch ähnlichen Progressionsstatus, weisen allerdings deutlich unterschiedliche Expressionsprofile auf (*Varticovski et al., 2007*).

In menschlichen Brusttumoren wurde auf immunhistologischer Basis gezeigt, dass die CD24-Expression mit der Tumorprogression korreliert. Die Progression war dabei auch mit einer veränderten Lokalisation der CD24-Expression verbunden, die in gutartigem Drüsenepithel apikal, in aggressiveren Brusttumorstadien zunehmend zytoplasmatisch war (*Fogel et al., 1999; Kristiansen et al., 2003a; Bircan et al., 2006*). Obwohl die genaue Bedeutung dieser veränderten Immunreaktivität noch unklar ist, schlagen diese Studien einen Zusammenhang mit der malignen Transformation des Brustepithels vor. Eine solche Art der Färbung wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht festgestellt und spiegelt daher dieses Expressionsmuster nicht wieder. Hierzu ist zu sagen, dass das Ergebnis einer immunhistologischen Färbung stark vom verwendeten Antikörper abhängt und durch Erkennung verschiedener Epitope eventuell unterschiedliche Färbemuster entstehen können. Die mögliche Varianz der Resultate zeigt sich in menschlichem, normalen Brustepithel, in welchem eine zum Teil schwache CD24-Expression nachgewiesen wurde (*Fogel et al., 1999; Kristiansen et al., 2003a; Bircan et al., 2006*) bzw. nicht detektiert werden konnte (*Lim und Oh, 2005*). Da CD24 in Abhängigkeit vom Zellkontext äußerst variabel glykosiliert ist,

bleibt zur Zeit fraglich, ob die unterschiedlichen CD24-Antikörper dieser Tatsache Rechnung tragen und alle Glykoformen gleichermaßen erkennen. So ist zwar die Reaktivität der Antikörper meist gegen den Proteinteil von CD24 gerichtet, dessen Zugänglichkeit könnte jedoch durch einen schwankenden Grad und verschiedene Arten an Glykosylierung sowie der daraus resultierenden sterischen Behinderung beeinflusst sein.

Allgemeine Betrachtungen zur Tumorerogenität

Von zentraler Bedeutung für das Verständnis der Entstehung und der Heterogenität von Tumoren ist die Frage nach ihrem zellulären Ursprung. So enthält beispielsweise die Prostata verschiedene Zellgruppen mit unterschiedlichem Differenzierungsstatus, die das potentielle Ziel einer Transformation sein können. Die Mehrheit aller Prostata Tumoren (und auch Brusttumoren (*Gudjonson et al., 2005*)) exprimiert lumbale Markerproteine, was als Hinweis auf die ursprüngliche Transformation einer differenzierten luminalen Epithelzelle betrachtet wird. Einige Tumore zeigen allerdings eine gleichzeitige Expression luminaler und basaler Markerproteine. Dies gibt Anlass zu der Vermutung, dass auch undifferenziertere Vorläuferzellen der Prostata (transit-amplifiers) Ausgangspunkt der Tumorentstehung sein könnten (*Lawson und Witte, 2007*). Werden z.B. Sca-1 positive Vorläuferzellen mit basalen als auch luminalen Charakteristika aus der Prostata isoliert, zeigen diese nach Überexpression von Akt (Proteinkinase B, PKB) ein erhöhtes tumorigenes Potenzial im Vergleich zu Sca-1 negativen Zellen (*Xin et al., 2005*).

Auf Grund ihrer funktionellen und molekularen Ähnlichkeit mit kürzlich in Prostata Tumoren entdeckten Krebsstammzellen werden jedoch auch normale Prostata Stammzellen als Ursprung in Betracht gezogen. Prostata Stammzellen als auch Krebsstammzellen zeigen eine hohe Differenzierungskapazität, d.h. sie sind in der Lage, die verschiedenen Zelltypen ihres Ursprungsgewebes hervorzubringen. In Versuchstiere transplantierte humane Prostata Krebsstammzellen bilden Tumoren, die die Histopathologie bzw. Heterogenität des Originaltumors, dem sie entstammen widerspiegeln (*Lawson und Witte, 2007*). Die allgemein in und zwischen verschiedenen Tumoren beobachtete histologische und molekulare Heterogenität lässt zudem vermuten, dass darüber hinaus unterschiedliche Krebsstammzellpopulationen existieren könnten. Dabei könnte die Art und der Differenzierungsgrad der

ursprünglich transformierten Zelle entscheiden, welche Krebsstammzellpopulation und damit auch welches Tumorspektrum hervorgebracht wird (*Signoretti und Loda, 2007*).

Diese Überlegungen gelten nicht nur für Prostata Tumoren, sondern können auf Grund ähnlicher Beobachtungen auch auf Brusttumoren übertragen werden. Brusttumoren werden auf der Basis genetischer Expressionsprofile und Proteinexpressionsanalysen in zwei Hauptgruppen eingeteilt: Tumoren mit Expression basaler Markerproteine und Abwesenheit von Hormonrezeptoren (Basale, hormonrezeptor-negative Gruppe) und Tumoren mit Expression luminaler Markerproteine und Anwesenheit von Hormonrezeptoren (Luminale, hormonrezeptor-positive Gruppe), wobei jede der Gruppen nochmals weitere Untergruppen enthält (*Anderson und Matsuno, 2006*). Diese Komplexität und Diversität kann weder mit der Annahme, dass alle Brusttumortypen aus der Transformation ein und derselben Ursprungszelle entstehen, noch durch das Modell einer linearen, durch sukzessiven Erwerb genetischer bzw. chromosomaler Aberrationen charakterisierten Progression erklärt werden.

Zudem existieren Hinweise, dass bestimmte Populationen in der Brust anfälliger gegenüber Transformations-assoziierten Ereignissen sind als andere. So lassen sich beispielsweise humane Brustvorläuferzellen leichter durch Telomeraseaktivierung immortalisieren als differenziertere Brustepithelzellen, was sie als präferenzielles Ziel der Karzinogenese erscheinen lässt (*Fridriksdottir et al., 2005*). Transgene Mäuse, die Bestandteile des Wnt-Signalweges überexprimieren, entwickeln Tumoren, in denen vermehrt typische Marker für Brustepithelvorläuferzellen exprimiert werden, wie z.B. Sca-1 und Keratin 6. Neben der Anreicherung von Tumorzellen mit vorläuferähnlichen Charakteristika zeigen diese Tumoren eine Expression von sowohl luminalen als auch myoepithelialen Markerproteinen, was als Hinweis auf die Transformation einer gemeinsamen, differenzierungsfähigen Vorläuferzelle betrachtet wird. Werden in den transgenen Mäusen allerdings bekannte Onkogene wie Neu oder H-Ras überexprimiert, kommt es nicht zur Anreicherung von vorläuferähnlichen Tumorzellen und die Tumoren sind hauptsächlich vom luminalen Typ (*Li, Y et al., 2003*). Dies lässt vermuten, dass die transformierende Aktivität eines Onkogens vom Differenzierungsstatus der Zelle abhängt bzw. dass der Differenzierungsstatus über die Anfälligkeit gegenüber transformierenden Onkogenen entscheidet (*Li und Rosen, 2005*).

CD24 ist im TRAMP-Modell an der Tumorprogression beteiligt

Die CD24-Expression in menschlichen Prostatatumoren gilt als prognostischer Indikator für die Patientenprognose bzw. die Überlebensrate (Kristiansen et al., 2004b; Kristiansen et al., 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass CD24 eine funktionelle und damit aktive Rolle im Progressionsprozess von Prostatatumoren ausübt. So hat sich im TRAMP-Modell durch den Verlust der CD24-Expression die Überlebensrate der Tiere erhöht.

Wie die immunhistologische Analyse gezeigt hat, ist die Expression von CD24 im TRAMP-Modell heterogen, mit zum Teil starker bis nicht vorhandener Expression von CD24. Da diese Information bei Abschluss der Überlebensstudie allerdings noch nicht vorlag, wurde das Tumorgewebe der Tiere nach der Autopsie nicht auf ihr CD24-Expressionsmuster untersucht. Somit ist nicht bekannt, wie viele Tiere in der heterozygoten Gruppe (T/+, CD24 +/-) eventuell keine CD24-Expression im Tumorgewebe aufwiesen und somit auch in die Gruppe der CD24-defizienten TRAMP-Tiere aufgenommen werden könnten. Es ist jedoch davon auszugehen, dass sich bei entsprechender Analyse und Einteilung der Tiere der beobachtete Effekt auf die Überlebenskurve noch stärker auswirkt und zu einer noch deutlicheren Trennung der beiden Gruppen führt.

Beobachtungen im APC^{+1572T}-Modell

Im APC^{+1572T}-Modell entsteht durch die spezifische Mutation im APC-Gen eine verkürzte Variante des APC-Proteins, das somit seine Funktion als β -Catenin regulierender Tumorsuppressor nur noch eingeschränkt ausüben kann (Gaspar und Fodde, 2004). APC-Mutationen spielen hauptsächlich in Darmtumoren eine große Rolle, sind allerdings auch in Tumoren der Brust vorhanden. So werden in Brustfibromatosen, seltenen gutartigen Läsionen, oftmals zu verkürzten APC-Proteinen führende Mutationen beobachtet (Howe und Brown, 2004). APC-Mutationen finden sich jedoch auch in primären malignen Brustkarzinomen, wobei sich hier das Mutationsmuster von dem in Darmtumoren vorherrschenden deutlich unterscheidet (Furuuchi et al., 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Expression von CD24 in Tumoren des APC^{+1572T}-Modells nachgewiesen. Das histologische Erscheinungsbild bzw. die in den Schnitten am häufigsten angetroffenen Gewebestrukturen der

Tumoren (Abbildung 24 und 25, f) lassen vermuten, dass es sich um mit Plattenepithelkarzinomen (squamous cell carcinoma) vergleichbare Wucherungen mit typischen Keratinablagerungen (keratin pearls) handelt.

Eine weitere Möglichkeit, die ebenfalls eine squamöse, d.h. „schuppenartige“ Differenzierung der Epithelzellen mit zirkulär angeordneten Keratinablagerungen aufweisen, sind sogenannte Acanthome. Das Auftreten von Acanthomen bzw. Adenoacanthomen ist bereits in mehreren APC-Mausmodellen wie beispielsweise der APC^{Min}-Maus (Moser *et al.*, 1993) und Mäusen mit konditionellem APC knock-out (Gallagher *et al.*, 2002) beschrieben worden. Um eine genaue histologische Klassifizierung der APC^{+1572T}-Tumoren zu erstellen, werden die Schnitte zur Zeit von einem geschulten Pathologen begutachtet.

Primäre Plattenepithelkarzinome der Brust sind äußerst seltene, invasive Tumoren wobei die mögliche Rolle von CD24 als auch die des Tumorsuppressors APC in diesem Kontext in der Literatur bislang noch nicht untersucht ist. Das APC^{+1572T}-Modell bietet daher die Möglichkeit, neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet zu erlangen. Darüber hinaus kann die mögliche Rolle von CD24 im Kontext des im APC^{+1572T}-Modell deregulierten Wnt/ β -Catenin-Signalweges untersucht werden. Da die Wnt/ β -Catenin-Achse sowohl für die Regulation von normalen Stammzellen, und damit auch für die Regulation der stammzellähnlichen Krebsstammzellen von Bedeutung ist, eröffnet sich hier die Möglichkeit die bislang noch funktionell unerforschte Rolle von CD24 in Krebsstammzellen zu adressieren.

Abschließende Betrachtung, Perspektiven

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern erstmalig Erkenntnisse über die mögliche Rolle von CD24 in der Brustphysiologie und tragen damit zu einem verbesserten Verständnis der allgemeinen Brustbiologie bei. In weiteren Untersuchungen wäre von besonderem Interesse aufzuklären, über welche Mechanismen und Signalwege CD24 seine Funktion als negativer Regulator der Epithelverzweigung ausübt. Darüber hinaus stellt sich insbesondere auch die Frage nach einer potenziellen glykosilierungsabhängigen Funktion von CD24 im Brustgewebe. In diesem Kontext wäre es darüber hinaus von besonderer Bedeutung, zu untersuchen, ob das Glykosilierungsmuster, und damit eventuell auch die Funktion von CD24 sich während pathologischer Vorgänge wie der Tumorigenese und der Metastasierung verändert. Dieser Aspekt könnte beispielsweise mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten Tumormodelle studiert werden.

Literatur

Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athelougou M, Brauch H. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res.* 2005 Feb 1;11(3):1154-9.

Abramson CS, Kersey JH, LeBien TW. A monoclonal antibody (BA-1) reactive with cells of human B lymphocyte lineage. *J Immunol.* 1981 Jan;126(1):83-8.

Aigner S, Ramos CL, Hafezi-Moghadam A, Lawrence MB, Friederichs J, Altevogt P, Ley K. CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *FASEB J.* 1998 Sep;12(12):1241-51.

Aigner S, Ruppert M, Hubbe M, Sammar M, Sthoeger Z, Butcher EC, Vestweber D, Altevogt P. Heat stable antigen (mouse CD24) supports myeloid cell binding to endothelial and platelet P-selectin. *Int Immunol.* 1995 Oct;7(10):1557-65.

Aigner S, Sthoeger ZM, Fogel M, Weber E, Zarn J, Ruppert M, Zeller Y, Vestweber D, Stahel R, Sammar M, Altevogt P. CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood.* 1997 May 1;89(9):3385-95.

Akashi T, Shirasawa T, Hirokawa K. Gene expression of CD24 core polypeptide molecule in normal rat tissues and human tumor cell lines. *Virchows Arch.* 1994;425(4):399-406.

Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet.* 2003 Aug;34(4):369-76.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 1;100(7):3983-8.

Ali, SH and DeCaprio, JA Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins *Semin Cancer Biol.* 2001 Feb;11(1):15-23.

Anderson WF, Matsuno R. Breast cancer heterogeneity: a mixture of at least two main types? *J Natl Cancer Inst.* 2006 Jul 19;98(14):948-51.

Asselin-Labat ML, Sutherland KD, Barker H, Thomas R, Shackleton M, Forrest NC, Hartley L, Robb L, Grosveld FG, van der Wees J, Lindeman GJ, Visvader JE. Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat Cell Biol.* 2007 Feb;9(2):201-9. Epub 2006 Dec 24.

Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, Giuliano A, McNamara G, Datar RH, Cote RJ. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res.* 2006 Oct 1;12(19):5615-21.

Ball RK, Friis RR, Schoenenberger CA, Doppler W, Groner B. Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *EMBO J.* 1988 Jul;7(7):2089-95.

Baumann P, Cremers N, Croese F, Orend G, Chiquet-Ehrismann R, Uede T, Yagita H, Sleeman JP. CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* 2005 Dec 1;65(23):10783-93.

Belvindrah R, Rougon G, Chazal G. Increased neurogenesis in adult mCD24-deficient mice. *J Neurosci.* 2002 May 1;22(9):3594-607.

Biade S, Marinucci M, Schick J, Roberts D, Workman G, Sage EH, O'Dwyer PJ, Livolsi VA, Johnson SW. Gene expression profiling of human ovarian tumours. *Br J Cancer.* 2006 Oct 23;95(8):1092-100.

Bircan S, Kapucuoglu N, Baspinar S, Inan G, Candir O. CD24 expression in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: an immunohistochemistry-based pilot study. *Pathol Res Pract.* 2006;202(8):569-76.

Björnström L, Sjöberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.* 2005 Apr;19(4):833-42. Epub 2005 Feb 3.

Bonnet D. Cancer stem cells: lessons from leukaemia. *Cell Prolif.* 2005 Dec;38(6):357-61.

Bostwick DG. Prostatic intraepithelial neoplasia. *Curr Urol Rep.* 2000 May;1(1):65-70.

Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2005 Sep;5(9):744-9.

Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med.* 2005 Aug 25;353(8):793-802.

Bruce J, Symington FW, McKearn TJ, Sprent J. A monoclonal antibody discriminating between subsets of T and B cells. *J Immunol.* 1981 Dec;127(6):2496-501.

Calaora V, Chazal G, Nielsen PJ, Rougon G, Moreau H. mCD24 expression in the developing mouse brain and in zones of secondary neurogenesis in the adult. *Neuroscience.* 1996 Jul;73(2):581-94.

Crispe IN, Bevan MJ. Expression and functional significance of the J11d marker on mouse thymocytes. *J Immunol.* 1987 Apr 1;138(7):2013-8.

Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med.* 2007;58:267-84.

DeOme, KB, Faulklin, LJ Jr, Bern HA, Blair PB Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res.* 1959 Jun;19(5):515-20.

Deugnier MA, Faraldo MM, Rousselle P, Thiery JP, Glukhova MA. Cell-extracellular matrix interactions and EGF are important regulators of the basal mammary epithelial cell phenotype. *J Cell Sci.* 1999 Apr;112 (Pt 7):1035-44.

Droz D, Zachar D, Charbit L, Gogusev J, Chrétein Y, Iris L. Expression of the human nephron differentiation molecules in renal cell carcinomas. *Am J Pathol.* 1990 Oct;137(4):895-905.

Figarella-Branger D, Moreau H, Pellissier JF, Bianco N, Rougon G. CD24, a signal-transducing molecule expressed on human B lymphocytes, is a marker for human regenerating muscle. *Acta Neuropathol (Berl).* 1993;86(3):275-84.

Fischer GF, Majdic O, Gadd S, Knapp W. Signal transduction in lymphocytic and myeloid cells via CD24, a new member of phosphoinositol-anchored membrane molecules. *J Immunol.* 1990 Jan 15;144(2):638-41.

Fogel M, Friederichs J, Zeller Y, Husar M, Smirnov A, Roitman L, Altevogt P, Stoeber ZM. CD24 is a marker for human breast carcinoma. *Cancer Lett.* 1999 Aug 23;143(1):87-94.

Foster LJ, De Hoog CL, Mann M. Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):5813-8. Epub 2003 Apr 30.

Fridriksdottir AJ, Villadsen R, Gudjonsson T, Petersen OW. Maintenance of cell type diversification in the human breast. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2005 Jan;10(1):61-74.

Friederichs J, Zeller Y, Hafezi-Moghadam A, Gröne HJ, Ley K, Altevogt P. The CD24/P-selectin binding pathway initiates lung arrest of human A125 adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 2000 Dec 1;60(23):6714-22.

Fukushima T, Tezuka T, Shimomura T, Nakano S, Kataoka H. Silencing of insulin-like growth factor-binding protein-2 in human glioblastoma cells reduces both invasiveness and expression of progression-associated gene CD24. *J Biol Chem.* 2007 Jun 22;282(25):18634-44. Epub 2007 May 1.

Furuuchi K, Tada M, Yamada H, Kataoka A, Furuuchi N, Hamada J, Takahashi M, Todo S, Moriuchi T. Somatic mutations of the APC gene in primary breast cancers. *Am J Pathol.* 2000 Jun;156(6):1997-2005.

Gallagher RC, Hay T, Meniel V, Naughton C, Anderson TJ, Shibata H, Ito M, Clevers H, Noda T, Sansom OJ, Mason JO, Clarke AR. Inactivation of Apc perturbs mammary development, but only directly results in acanthoma in the context of Tcf-1 deficiency. *Oncogene*. 2002 Sep 19;21(42):6446-57.

Gaspar C, Fodde R. APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation. *Int J Dev Biol*. 2004;48(5-6):377-86.

Gingrich JR, Barrios RJ, Foster BA, Greenberg NM. Pathologic progression of autochthonous prostate cancer in the TRAMP model. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 1999 Mar;2(2):70-75.

Gingrich JR, Barrios RJ, Morton RA, Boyce BF, DeMayo FJ, Finegold MJ, Angelopoulou R, Rosen JM, Greenberg NM. Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. *Cancer Res*. 1996 Sep 15;56(18):4096-102.

Gouon-Evans V, Lin EY, Pollard JW. Requirement of macrophages and eosinophils and their cytokines/chemokines for mammary gland development. *Breast Cancer Res*. 2002;4(4):155-64. Epub 2002 Jun 25.

Greenberg NM, DeMayo F, Finegold MJ, Medina D, Tilley WD, Aspinall JO, Cunha GR, Donjacour AA, Matusik RJ, Rosen JM. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Apr 11;92(8):3439-43.

Gudjonsson T, Adriance MC, Sternlicht MD, Petersen OW, Bissell MJ. Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005 Jul;10(3):261-72.

Guy CT, Cardiff RD, Muller WJ. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol Cell Biol*. 1992 Mar;12(3):954-61.

Guy CT, Muthuswamy SK, Cardiff RD, Soriano P, Muller WJ. Activation of the c-Src tyrosine kinase is required for the induction of mammary tumors in transgenic mice. *Genes Dev*. 1994 Jan;8(1):23-32.

Hahne M, Wenger RH, Vestweber D, Nielsen PJ. The heat-stable antigen can alter very late antigen 4-mediated adhesion. *J Exp Med*. 1994 Apr 1;179(4):1391-5.

Hale G, Rye PD, Warford A, Lauder I, Brito-Babapulle A. The glycosylphosphatidylinositol-anchored lymphocyte antigen CDw52 is associated with the epididymal maturation of human spermatozoa. *J Reprod Immunol*. 1993 Mar;23(2):189-205.

Hale G, Xia MQ, Tighe HP, Dyer MJ, Waldmann H. The CAMPATH-1 antigen (CDw52). *Tissue Antigens*. 1990 Mar;35(3):118-27.

Hennighausen L, Robinson GW. Information networks in the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Sep;6(9):715-25.

Hennighausen L. Mouse models for breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2000b 2(1):2-7. Epub 1999 Dec 17.

Hennighausen L. Mouse models for breast cancer. *Oncogene.* 2000a Feb 21;19(8):966-7.

Hitsumoto Y, Nakano A, Ohnishi H, Hamada F, Saheki S, Takeuchi N. Purification of the murine heat-stable antigen from erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Sep 16;187(2):773-7.

Holland, Eric C (Editor). *Mouse Models of Human Cancer.* 1st edition, September 2004, ISBN: 978-0-471-44460-2

Hough MR, Chappel MS, Sauvageau G, Takei F, Kay R, Humphries RK. Reduction of early B lymphocyte precursors in transgenic mice overexpressing the murine heat-stable antigen. *J Immunol.* 1996 Jan 15;156(2):479-88.

Hough MR, Rosten PM, Sexton TL, Kay R, Humphries RK. Mapping of CD24 and homologous sequences to multiple chromosomal loci. *Genomics.* 1994a Jul 1;22(1):154-61.

Hough MR, Takei F, Humphries RK, Kay R. Defective development of thymocytes overexpressing the costimulatory molecule, heat-stable antigen. *J Exp Med.* 1994b Jan 1;179(1):177-84.

Howe LR, Brown AM. Wnt signaling and breast cancer. *Cancer Biol Ther.* 2004 Jan;3(1):36-41. Epub 2004 Jan 14.

Huang LR, Hsu HC. Cloning and expression of CD24 gene in human hepatocellular carcinoma: a potential early tumor marker gene correlates with p53 mutation and tumor differentiation. *Cancer Res.* 1995 Oct 15;55(20):4717-21.

Hunte BE, Capone M, Zlotnik A, Rennick D, Moore TA. Acquisition of CD24 expression by Lin-CD43+B220(low)ckit(hi) cells coincides with commitment to the B cell lineage. *Eur J Immunol.* 1998 Nov;28(11):3850-6.

Ichaso N, Dilworth SM. Cell transformation by the middle T-antigen of polyoma virus. *Oncogene.* 2001 Nov 26;20(54):7908-16.

Ilangumaran S, He HT, Hoessli DC. Microdomains in lymphocyte signalling: beyond GPI-anchored proteins. *Immunol Today.* 2000 Jan;21(1):2-7.

Ishizawar R, Parsons SJ. c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell.* 2004 Sep;6(3):209-14.

Jackson D, Waibel R, Weber E, Bell J, Stahel RA. CD24, a signal-transducing molecule expressed on human B cells, is a major surface antigen on small cell lung carcinomas. *Cancer Res.* 1992 Oct 1;52(19):5264-70.

Jacob J, Bellach J, Grützmann R, Alldinger I, Pilarsky C, Dietel M, Kristiansen G. Expression of CD24 in adenocarcinomas of the pancreas correlates with higher tumor grades. *Pancreatology.* 2004;4(5):454-60.

Jevsek M, Jaworski A, Polo-Parada L, Kim N, Fan J, Landmesser LT, Burden SJ. CD24 is expressed by myofiber synaptic nuclei and regulates synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Apr 18;103(16):6374-9.

Kadmon G, Eckert M, Sammar M, Schachner M, Altevogt P. Nectadrin, the heat-stable antigen, is a cell adhesion molecule. *J Cell Biol.* 1992 Sep;118(5):1245-58.

Kirchhoff C, Krull N, Pera I, Ivell R. A major mRNA of the human epididymal principal cells, HE5, encodes the leucocyte differentiation CDw52 antigen peptide backbone. *Mol Reprod Dev.* 1993 Jan;34(1):8-15.

Kleene R, Yang H, Kutsche M, Schachner M. The neural recognition molecule L1 is a sialic acid-binding lectin for CD24, which induces promotion and inhibition of neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 2001 Jun 15;276(24):21656-63.

Klinowska TC, Alexander CM, Georges-Labouesse E, Van der Neut R, Kreidberg JA, Jones CJ, Sonnenberg A, Streuli CH. Epithelial development and differentiation in the mammary gland is not dependent on alpha 3 or alpha 6 integrin subunits. *Dev Biol.* 2001 May 15;233(2):449-67.

Kristiansen G, Denkert C, Schlüns K, Dahl E, Pilarsky C, Hauptmann S. CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival. *Am J Pathol.* 2002 Oct;161(4):1215-21.

Kristiansen G, Pilarsky C, Pervan J, Stürzebecher B, Stephan C, Jung K, Loening S, Rosenthal A, Dietel M. CD24 expression is a significant predictor of PSA relapse and poor prognosis in low grade or organ confined prostate cancer. *Prostate.* 2004b Feb 1;58(2):183-92.

Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, Kaiser S, Bruemmendorf T, Roepcke S, Dahl E, Hinzmann B, Specht T, Pervan J, Stephan C, Loening S, Dietel M, Rosenthal A. Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. *J Pathol.* 2005 Feb;205(3):359-76.

Kristiansen G, Sammar M, Altevogt P. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol.* 2004a Mar;35(3):255-62.

- Kristiansen** G, Schlüns K, Yongwei Y, Denkert C, Dietel M, Petersen I. CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients. *Br J Cancer*. 2003b Jan 27;88(2):231-6.
- Kristiansen** G, Winzer KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schlüns K, Denkert C, Dahl E, Pilarsky C, Altevoigt P, Guski H, Dietel M. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2003a Oct 15;9(13):4906-13.
- Kuchler** S, Rougon G, Marschal P, Lehmann S, Reeber A, Vincendon G, Zanetta JP. Location of a transiently expressed glycoprotein in developing cerebellum delineating its possible ontogenetic roles. *Neuroscience*. 1989;33(1):111-24.
- Lawson** DA, Witte ON. Stem cells in prostate cancer initiation and progression. *J Clin Invest*. 2007 Aug;117(8):2044-50.
- Lawson** DA, Xin L, Lukacs RU, Cheng D, Witte ON. Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 2;104(1):181-6.
- Li C**, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*. 2007 Feb 1;67(3):1030-7.
- Li F**, Tiede B, Massagué J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res*. 2007 Jan;17(1):3-14.
- Li O**, Zheng P, Liu Y. CD24 expression on T cells is required for optimal T cell proliferation in lymphopenic host. *J Exp Med*. 2004 Oct 18;200(8):1083-9.
- Li X**, Brunton VG, Burgar HR, Wheldon LM, Heath JK. FRS2-dependent SRC activation is required for fibroblast growth factor receptor-induced phosphorylation of Sprouty and suppression of ERK activity. *J Cell Sci*. 2004 Dec 1;117(Pt 25):6007-17.
- Li Y**, Rosen JM. Stem/progenitor cells in mouse mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005 Jan;10(1):17-24.
- Li Y**, Welm B, Podsypanina K, Huang S, Chamorro M, Zhang X, Rowlands T, Egeblad M, Cowin P, Werb Z, Tan LK, Rosen JM, Varmus HE. Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Dec 23;100(26):15853-8. Epub 2003 Dec 10.
- Lim** SC, Oh SH. The role of CD24 in various human epithelial neoplasias. *Pathol Res Pract*. 2005;201(7):479-86.

Lin EY, Jones JG, Li P, Zhu L, Whitney KD, Muller WJ, Pollard JW. Progression to Malignancy in the Polyoma Middle T Oncoprotein Mouse Breast Cancer Model Provides a Reliable Model for Human Diseases. *Am J Pathol.* 2003 Nov;163(5):2113-26.

Liu AY, Roudier MP, True LD. Heterogeneity in primary and metastatic prostate cancer as defined by cell surface CD profile. *Am J Pathol.* 2004 Nov;165(5):1543-56.

Liu Y, Jones B, Aruffo A, Sullivan KM, Linsley PS, Janeway CA Jr. Heat-stable antigen is a costimulatory molecule for CD4 T cell growth. *J Exp Med.* 1992a Feb 1;175(2):437-45.

Liu Y, Jones B, Brady W, Janeway CA Jr, Linsley PS. Co-stimulation of murine CD4 T cell growth: cooperation between B7 and heat-stable antigen. *Eur J Immunol.* 1992 b Nov;22(11):2855-9.

Lo TL, Yusoff P, Fong CW, Guo K, McCaw BJ, Phillips WA, Yang H, Wong ES, Leong HF, Zeng Q, Putti TC, Guy GR. The ras/mitogen-activated protein kinase pathway inhibitor and likely tumor suppressor proteins, sprouty 1 and sprouty 2 are deregulated in breast cancer. *Cancer Res.* 2004 Sep 1;64(17):6127-36.

Lu L, Chappel MS, Humphries RK, Osmond DG. Regulation of cell survival during B lymphopoiesis: increased pre-B cell apoptosis in CD24-transgenic mouse bone marrow. *Eur J Immunol.* 2000 Sep;30(9):2686-91.

Lu P, Ewald A, Martin G, and Werb Z. Essential function of FGF signalling pathways during branching morphogenesis of the mammary gland (abstract #515). *Dev Biol.* 283, 680-681

Lynch MD, Cariati M, Purushotham AD. Breast cancer, stem cells and prospects for therapy. *Breast Cancer Res.* 2006;8(3):211. Epub 2006 Jul 3.

Maroulakou IG, Anver M, Garrett L, Green JE. Prostate and mammary adenocarcinoma in transgenic mice carrying a rat C3(1) simian virus 40 large tumor antigen fusion gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Nov 8;91(23):11236-40.

Mechta-Grigoriou F, Gerald D, Yaniv M. The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity. *Oncogene.* 2001 Apr 30;20(19):2378-89.

Michiels JJ, Adriaansen HJ, Hagemeyer A, Hooijkaas H, van Dongen JJ, Abels J. TdT positive B-cell acute lymphoblastic leukaemia (B-ALL) without Burkitt characteristics. *Br J Haematol.* 1988 Apr;68(4):423-6.

Moser AR, Mattes EM, Dove WF, Lindstrom MJ, Haag JD, Gould MN. ApcMin, a mutation in the murine Apc gene, predisposes to mammary carcinomas and focal alveolar hyperplasias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Oct 1;90(19):8977-81.

- Mukhina** S, Liu D, Guo K, Raccurt M, Borges-Bendris S, Mertani HC, Lobie PE. Autocrine growth hormone prevents lactogenic differentiation of mouse mammary epithelial cells. *Endocrinology*. 2006 Apr;147(4):1819-29. Epub 2006 Jan 19.
- Nedelec** J, Pierres M, Moreau H, Barbet J, Naquet P, Faivre-Sarrailh C, Rougon G. Isolation and characterization of a novel glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoconjugate expressed by developing neurons. *Eur J Biochem*. 1992 Feb 1;203(3):433-42.
- Nelson** CM, Vanduijn MM, Inman JL, Fletcher DA, Bissell MJ. Tissue geometry determines sites of mammary branching morphogenesis in organotypic cultures. *Science*. 2006 Oct 13;314(5797):298-300.
- Nestl** A, Von Stein OD, Zatloukal K, Thies WG, Herrlich P, Hofmann M, Sleeman JP. Gene expression patterns associated with the metastatic phenotype in rodent and human tumors. *Cancer Res*. 2001 Feb 15;61(4):1569-77.
- Nielsen** PJ, Lorenz B, Müller AM, Wenger RH, Brombacher F, Simon M, von der Weid T, Langhorne WJ, Mossmann H, Köhler G. Altered erythrocytes and a leaky block in B-cell development in CD24/HSA-deficient mice. *Blood*. 1997 Feb 1;89(3):1058-67.
- Nieoullon** V, Belvindrah R, Rougon G, Chazal G. mCD24 regulates proliferation of neuronal committed precursors in the subventricular zone. *Mol Cell Neurosci*. 2005 Mar;28(3):462-74.
- Nieoullon** V, Belvindrah R, Rougon G, Chazal G. Mouse CD24 is required for homeostatic cell renewal. *Cell Tissue Res*. 2007 Sep;329(3):457-67.
- Ohl** C, Albach C, Altevogt P, Schmitz B. N-glycosylation patterns of HSA/CD24 from different cell lines and brain homogenates: a comparison. *Biochimie*. 2003 Jun;85(6):565-73.
- Parmar** H, Cunha GR. Epithelial-stromal interactions in the mouse and human mammary gland in vivo. *Endocr Relat Cancer*. 2004 Sep;11(3):437-58.
- Parsons** SJ, Parsons JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*. 2004 Oct 18;23(48):7906-9.
- Poncet** C, Frances V, Gristina R, Scheiner C, Pellissier JF, Figarella-Branger D. CD24, a glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules is transiently expressed during the development of human central nervous system and is a marker of human neural cell lineage tumors. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1996;91(4):400-8.
- Raife** TJ, Lager DJ, Kemp JD, Dick FR. Expression of CD24 (BA-1) predicts monocytic lineage in acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol*. 1994 Mar;101(3):296-9.

Richert MM, Schwertfeger KL, Ryder JW, Anderson SM. An atlas of mouse mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2000 Apr;5(2):227-41.

Ridyard MS, Robbins SM. Fibroblast growth factor-2-induced signaling through lipid raft-associated fibroblast growth factor receptor substrate 2 (FRS2). *J Biol Chem*. 2003 Apr 18;278(16):13803-9. Epub 2003 Feb 5.

Rudin CM, Thompson CB. B-cell development and maturation. *Semin Oncol*. 1998 Aug;25(4):435-46.

Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, Ronconi E, Meini C, Gacci M, Squecco R, Carini M, Gesualdo L, Francini F, Maggi E, Annunziato F, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Romagnani P. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. Kidney stem cells/multipotent progenitors are CD24+. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Sep;17(9):2443-56.

Sammar M, Aigner S, Hubbe M, Schirmmacher V, Schachner M, Vestweber D, Altevogt P. Heat-stable antigen (CD24) as ligand for mouse P-selectin. *Int Immunol*. 1994 Jul;6(7):1027-36.

Sammar M, Gulbins E, Hilbert K, Lang F, Altevogt P. Mouse CD24 as a signaling molecule for integrin-mediated cell binding: functional and physical association with src-kinases. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 May 19;234(2):330-4.

Santamaria D, Ortega S. Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice. *Front Biosci*. 2006 Jan 1;11:1164-88.

Santin AD, Zhan F, Bellone S, Palmieri M, Cane S, Bignotti E, Anfossi S, Gokden M, Dunn D, Roman JJ, O'Brien TJ, Tian E, Cannon MJ, Shaughnessy J Jr, Pecorelli S. Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Int J Cancer*. 2004 Oct 20;112(1):14-25.

Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006 Jun 29;441(7097):1075-9.

Schabath H, Runz S, Joumaa S, Altevogt P. CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells. *J Cell Sci*. 2006 Jan 15;119(Pt 2):314-25.

Schatten H, Wiedemeier AM, Taylor M, Lubahn DB, Greenberg NM, Besch-Williford C, Rosenfeld CS, Day JK, Ripple M. Centrosome-centriole abnormalities are markers for abnormal cell divisions and cancer in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate (TRAMP) model. *Biol Cell*. 2000 Aug;92(5):331-40.

Schindelmann S, Windisch J, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, Deissler H. Expression profiling of mammary carcinoma cell lines: correlation of in vitro invasiveness with expression of CD24. *Tumour Biol*. 2002 May-Jun;23(3):139-45.

Schmeichel KL, Bissell MJ. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *J Cell Sci.* 2003 Jun 15;116(Pt 12):2377-88.

Schostak M, Krause H, Miller K, Schrader M, Weikert S, Christoph F, Kempkensteffen C, Kollermann J. Quantitative real-time RT-PCR of CD24 mRNA in the detection of prostate cancer. *BMC Urol.* 2006 Mar 15;6:7.

Schuurman HJ, Huppes W, Verdonck LF, Van Baarlen J, Van Unnik JA. Immunophenotyping of non-Hodgkin's lymphoma. Correlation with relapse-free survival. *Am J Pathol.* 1988 Apr;131(1):102-11.

Senner V, Sturm A, Baur I, Schrell UH, Distel L, Paulus W. CD24 promotes invasion of glioma cells in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999 Aug;58(8):795-802.

Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, Wu L, Lindeman GJ, Visvader JE. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature.* 2006 Jan 5;439(7072):84-8.

Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, Goulet R Jr, Badve S, Nakshatri H. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res.* 2006;8(5):R59.

Shirasawa T, Akashi T, Sakamoto K, Takahashi H, Maruyama N, Hirokawa K. Gene expression of CD24 core peptide molecule in developing brain and developing non-neural tissues. *Dev Dyn.* 1993 Sep;198(1):1-13.

Signoretti S, Loda M. Prostate stem cells: from development to cancer. *Semin Cancer Biol.* 2007 Jun;17(3):219-24. Epub 2006 May 10.

Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Oct;1(1):31-9

Sleeman KE, Kendrick H, Ashworth A, Isacke CM, Smalley MJ. CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Res.* 2006;8(1):R7.

Sleeman, JP The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Recent Results Cancer Res.* 2000;157:55-81.

Smalley M, Ashworth A. Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat Rev Cancer.* 2003 Nov;3(11):832-44.

Smith GH, Medina D. A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland. *J Cell Sci.* 1988 May;90 (Pt 1):173-83.

Smith GH. Mammary stem cells come of age, prospectively. *Trends Mol Med.* 2006a Jul;12(7):287-9. Epub 2006 Jun 5.

Smith SC, Oxford G, Wu Z, Nitz MD, Conaway M, Frierson HF, Hampton G, Theodorescu D. The metastasis-associated gene CD24 is regulated by Ral GTPase and is a mediator of cell proliferation and survival in human cancer. *Cancer Res.* 2006b Feb 15;66(4):1917-22.

Sorbello V, Fuso L, Sfiligoi C, Scafoglio C, Ponzzone R, Biglia N, Weisz A, Sismondi P, De Bortoli M. Quantitative real-time RT-PCR analysis of eight novel estrogen-regulated genes in breast cancer. *Int J Biol Markers.* 2003 Apr-Jun;18(2):123-9.

Springer T, Galfrè G, Secher DS, Milstein C. Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: identification of novel leukocyte differentiation antigens. *Eur J Immunol.* 1978 Aug;8(8):539-51.

Stein PL, Vogel H, Soriano P. Combined deficiencies of Src, Fyn, and Yes tyrosine kinases in mutant mice. *Genes Dev.* 1994 Sep 1;8(17):1999-2007.

Sternlicht MD. Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res.* 2006;8(1):201. Epub 2005 Dec 5.

Sternlicht MD, Kouros-Mehr H, Lu P, Werb Z. Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation.* 2006 Sep;74(7):365-81.

Stingl J, Eirew P, Ricketson I, Shackleton M, Vaillant F, Choi D, Li HI, Eaves CJ. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature.* 2006 Feb 23;439(7079):993-7. Epub 2006 Jan 4.

Surowiak P, Materna V, Kaplenko I, Spaczyński M, Dietel M, Kristiansen G, Lage H, Zabel M. Unfavorable prognostic value of CD24 expression in sections from primary and relapsed ovarian cancer tissue. *Int J Gynecol Cancer.* 2006 Mar-Apr;16(2):515-21.

Suzuki T, Kiyokawa N, Taguchi T, Sekino T, Katagiri YU, Fujimoto J. CD24 induces apoptosis in human B cells via the glycolipid-enriched membrane domains/rafts-mediated signaling system. *J Immunol.* 2001 May 1;166(9):5567-77.

Taylor-Papadimitriou, J. and Lane, E. B. Keratin expression in the mammary gland. In: M. C. Neville and C. Daniels, Editors, *The Mammary Gland. Development, Regulation and Function*, Plenum Publishing Co., New York, 1987, 181-215.

Tefft JD, Lee M, Smith S, Leinwand M, Zhao J, Bringas P Jr, Crowe DL, Warburton D. Conserved function of mSpry-2, a murine homolog of Drosophila sprouty, which negatively modulates respiratory organogenesis. *Curr Biol.* 1999 Feb 25;9(4):219-22.

Tone M, Nolan KF, Walsh LA, Tone Y, Thompson SA, Waldmann H. Structure and chromosomal location of mouse and human CD52 genes. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Sep 3;1446(3):334-40.

Varticovski L, Hollingshead MG, Robles AI, Wu X, Cherry J, Munroe DJ, Lukes L, Anver MR, Carter JP, Borgel SD, Stotler H, Bonomi CA, Nunez NP, Hursting SD, Qiao W, Deng CX, Green JE, Hunter KW, Merlino G, Steeg PS, Wakefield LM, Barrett JC. Accelerated preclinical testing using transplanted tumors from genetically engineered mouse breast cancer models. *Clin Cancer Res*. 2007 Apr 1;13(7):2168-77.

Weichert W, Denkert C, Burkhardt M, Gansukh T, Bellach J, Altevogt P, Dietel M, Kristiansen G. Cytoplasmic CD24 expression in colorectal cancer independently correlates with shortened patient survival. *Clin Cancer Res*. 2005 Sep 15;11(18):6574-81.

Wenger RH, Ayane M, Bose R, Köhler G, Nielsen PJ. The genes for a mouse hematopoietic differentiation marker called the heat-stable antigen. *Eur J Immunol*. 1991 Apr;21(4):1039-46.

Wenger RH, Rochelle JM, Seldin MF, Köhler G, Nielsen PJ. The heat stable antigen (mouse CD24) gene is differentially regulated but has a housekeeping promoter. *J Biol Chem*. 1993 Nov 5;268(31):23345-52.

Williams JM, Daniel CW. Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev Biol*. 1983 Jun;97(2):274-90.

Winkler A, Zigeuner R, Rehak P, Hutterer G, Chromecki T, Langner C. CD24 expression in urothelial carcinoma of the upper urinary tract correlates with tumour progression. *Virchows Arch*. 2007 Jan;450(1):59-64. Epub 2006 Nov 17.

Wood TL, Richert MM, Stull MA, Allar MA. The insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins in postnatal development of murine mammary glands. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2000 Jan;5(1):31-42.

Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Rosen JM. On mammary stem cells. *J Cell Sci*. 2005 Aug 15;118(Pt 16):3585-94.

Xia MQ, Tone M, Packman L, Hale G, Waldmann H. Characterization of the CAMPATH-1 (CDw52) antigen: biochemical analysis and cDNA cloning reveal an unusually small peptide backbone. *Eur J Immunol*. 1991 Jul;21(7):1677-84.

Xian W, Schwertfeger KL, Vargo-Gogola T, Rosen JM. Pleiotropic effects of FGFR1 on cell proliferation, survival, and migration in a 3D mammary epithelial cell model. *J Cell Biol*. 2005 Nov 21;171(4):663-73.

Literatur

Xin L, Lawson DA, Witte ON. The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 May 10;102(19):6942-7. Epub 2005 Apr 28.

Young, L.J.T. 2000. The cleared mammary fat pad and the transplantation of mammary gland morphological structures and cells. In *Methods in Mammary Gland Biology and Breast Cancer Research*. M.M. Ip and B.B. Ash, editors. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 67–74.

Zarn JA, Zimmermann SM, Pass MK, Waibel R, Stahel RA. Association of CD24 with the kinase c-fgr in a small cell lung cancer cell line and with the kinase lyn in an erythroleukemia cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Aug 14;225(2):384-91.

Zhou Q, Guo Y, Liu Y. Regulation of the stability of heat-stable antigen mRNA by interplay between two novel cis elements in the 3' untranslated region. *Mol Cell Biol*. 1998 Feb;18(2):815-26.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	S. 2
Schematische Darstellung der Struktur von CD24.	
Abbildung 2	S. 11
Histologischer Querschnitt von Brustdrüsengängen (Maus), H&E- Färbung.	
Abbildung 3	S. 12
Vergrößerte Darstellung der TEB-Strukturen aus einer Whole mount-Präparation einer Mausbrustdrüse.	
Abbildung 4	S. 51
CD24-mRNA Expression in verschiedenen Organen der Maus.	
Abbildung 5	S. 53
Northern Analyse der CD24- und Cytokeratin 18-Expression (CK18) im Brustgewebe von Mäusen verschiedenen Alters.	
Abbildung 6	S. 55
Immunhistologische Analyse der CD24-Expression in der Mausbrustdrüse.	
Abbildung 7	S. 56
Differenzielle CD24-Färbung in einem Terminal End Bud einer 4 Wochen alten Brustdrüse.	
Abbildung 8	S. 58
CD24-Expression in der Brust während Schwangerschaft, Laktation und Involution.	
Abbildung 9	S. 60
Schematische Darstellung der Durchführung der <i>in vitro</i> -Differenzierung von HC11 Zellen.	
Abbildung 10	S. 61
Northern Analyse verschiedener <i>in vitro</i> Differenzierungsphasen von HC11-Zellen.	
Abbildung 11	S. 62
Western Blot Analyse der CD24-Expression während der <i>in vitro</i> -Differenzierung von HC11-Zellen.	
Abbildung 12	S. 64
FACS-Analyse von stabilen RNAi-Klonen der HC11-Zelllinie.	
Abbildung 13	S. 65
Northern Analyse der β -Casein Expression verschiedener CD24-RNAi Klone.	

Abbildung 14	S. 68
Brustgewebe Whole mounts einer sechs Wochen alten CD24 k.o.-Maus (links) und einer sechs Wochen alten Wildtypmaus (rechts).	
Abbildung 15	S. 69
Darstellung der Vorgehensweise zur Ermittlung der Verzweigungsdichte.	
Abbildung 16	S. 69
Quantifizierung der Verzweigung der Epithelgänge von Wildtyp- und CD24 ^{-/-} Mäusen.	
Abbildung 17	S. 72
Untersuchung der Rekonstitutionsfähigkeit von CD24 k.o.-im Vergleich zu Wildtyp-Brustepithelstammzellen durch Gewebetransplantation.	
Abbildung 18	S. 73
Immunhistologischer Nachweis von CD24 auf Gefrierschnitten eines CD24 k.o.- (A) und eines Wildtyp-Transplantats (B).	
Abbildung 19	S. 74
Funktionelle Differenzierung der CD24 k.o.- bzw. Wildtyp-Transplantate während der Schwangerschaft.	
Abbildung 20	S. 76
Northern Analyse der CD52-Expression in Wildtyp- und k.o.-Brustgewebe während der Schwangerschaft, Laktation und Involution.	
Abbildung 21	S. 79
Immunhistologische Untersuchung der CD24-Expression in Prostata-Schnitten von TRAMP-Mäusen verschiedenen Alters.	
Abbildung 22	S. 80
Kaplan-Meyer-Analyse der Überlebensrate von CD24-heterozygoten TRAMP-Mäusen (TRAMP/+, CD24+/-) im Vergleich zu CD24 k.o. TRAMP-Mäusen (TRAMP/+, CD24 ^{-/-}).	
Abbildung 23	S. 82
H&E-Färbung verschiedener APC ^{+1572T} -Tumoren.	
Abbildung 24	S. 83
Immunhistologische Untersuchung der CD24-Expression in Brusttumoren von APC ^{+1572T} -Mäusen.	
Abbildung 25	S. 84
CD24-Expression im Brustgewebe bzw. in Brusttumoren von MMTV-PyVMT-Mäusen.	

Abkürzungsverzeichnis

APC	Adenomatous Polyposis Coli
bp	base pair (Basenpaare)
CD	Cluster of Differentiation
c-Src	cellular Src
CXCR4	Chemokinrezeptor 4
EGF	Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
Erk	Extracellular-signal Regulated Kinase
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Faktor der Erdbeschleunigung
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
H&E	Hämatoxylin und Eosin-Färbung
HRP	Horse Reddish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HSA	Heat Stable Antigen
kDa	Kilodalton
LN	Lymphknoten
LTR	Long Terminal Repeat
MAP-Kinase	Mitogen-Activated Protein Kinase
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PyVMT	Polyomavirus middle T Antigen
Rb	Retinoblastom
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SAP-Kinase	Stress Activated Protein Kinase
Sca-1	Stem Cell Antigen 1
siRNA	short interfering RNA
SLC	Small Light Cell

Abkürzungsverzeichnis

Src	Rous Sarcoma Onkogen
SV40	Simian Virus 40
TEB	Terminal End Bud
TRAMP	Transgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate Model
UV	Ultraviolett