# Die Rolle des Transkriptionsfaktors Grainyhead-like 2 (GRHL2) in der Karzinogenese

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

von Dipl. Biochemiker Stefan Werner aus Hamburg

vorgelegt

dem Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

Hamburg April 2009

Genehmigt vom Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Professor Dr. K. PANTEL Weiterer Gutachter der Dissertation: Herr Professor Dr. W. SCHÄFER Tag der Disputation: 27. Februar 2009

Hamburg, den 12. Februar 2009



1. Janetium

Professor Dr. Jörg Ganzhorn Leiter des Departments Biologie

meiner Familie

1.	Einleitung	1
1.1.	Das Sequenzmodell der Krebsentstehung	2
1.1.1.	Unabhängigkeit von externen Wachstumsstimuli	3
1.1.2.	Insensitivität für anti-proliferative Signale	4
1.1.3.	Resistenz gegenüber Apoptose	5
1.1.4.	Unlimitiertes replikatives Potential	5
1.1.5.	Induktion von Angiogenese	6
1.1.6.	Metastasierung	6
1.2.	Wundheilung und Krebs	9
1.3.	Die Grainyhead-Genfamilie von Transkriptionsfaktoren	12
1.4.	Fragestellung	15
2.	Material und Methoden	16
2.1.	Material	16
2.1.1.	Chemikalien	16
2.1.2.	Häufig verwendete Lösungen	16
2.1.3.	Zellkulturen und Kulturmedien	16
2.2.	Zellkulturmethoden	17
2.2.1.	Standardkulturbedingungen	17
2.2.2.	Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen	18
2.2.3.	Mycoplasmen-Test	18
2.2.4.	Transfektion eukaryontischer Zellen mit kationischen Lipiden	19
2.2.4.1.	Transfektion eukaryontischer Zellen mit Lipofectamine 2000 <sup>TM</sup>	19
2.2.4.2.	Transfektion eukaryontischer Zellen mit Effectene <sup>TM</sup>	19
2.2.5.	Gentransfer mit Hilfe retroviraler Vektoren	20
2.2.6.	Bestimmung der Zellproliferationsrate	20
2.2.7.	Fokus-Assay	21
2.2.8.	Soft-Agar-Assay	21
2.2.9.	Implantation von Zellen in immundefiziente Mäuse	21
2.3.	Molekularbiologische Methoden	22
2.3.1.	Kultur von E. coli	22
2.3.2.	Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien	23
2.3.3.	Transformation von Bakterien	23
2.3.4.	Plasmid-Präparation im analytischen Maßstab	23
2.3.5.	Plasmid-Präparation im präparativen Maßstab	24
2.3.6.	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA	24
2.3.7.	Restriktionsverdau	24
2.3.8.	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	24
2.3.9.	Gelelektrophoretische Analyse von Nukleinsäuren	25
2.3.10.	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	25
2.3.11.	Ligation von DNA-Fragmenten	26
2.3.12.	Herstellung einer cDNA-Bibliothek	26
2.3.12.1.	Isolierung von mRNA	26
2.3.12.2.	Erststrangsynthese zur Herstellung einer cDNA-Bibliothek	26
2.3.12.3.	Zweitstrangsynthese	27

2.3.12.4.	Ligation von BstXI-Adaptoren	28
2.3.12.5.	Größenfraktionierung und Ligation der cDNA	28
2.3.12.6.	Transformation der cDNA-Bibliothek in Bakterien	29
2.3.12.7.	Amplifikation und Charakterisierung der cDNA-Bibliothek	29
2.3.12.8.	Lagerung der retroviralen Expressionsbibliothek	30
2.3.12.9.	Phänotypische Selektion der cDNA-Expressionbibliothek mittels Fokus-Assay	30
2.3.13.	Isolierung von genomischer DNA	30
2.3.14.	Isolierung von Gesamt-RNA	31
2.3.15.	Erststrang-cDNA-Synthese	31
2.3.16.	DNA-Amplifikation mit der Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
2.3.16.1.	Amplifikation mit PfuTurbo <sup>®</sup> Hotstart DNA Polymerase	32
2.3.16.2.	Amplifikation mit Taq-DNA-Polymerase	32
2.3.17.	Klonierung von PCR-Produkten	32
2.3.18.	Quantitative RT-PCR-Analyse	33
2.3.18.1.	Relative mRNA-Quantifizierung	34
2.3.18.2.	Absolute mRNA-Quantifizierung	34
2.3.19.	Qualitative mRNA-Analyse durch Northern-Blot-Hybridisierung	35
2.3.19.1.	Agarose-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen	35
2.3.19.2.	RNA-Transfer auf Nylonmembran	36
2.3.19.3.	Herstellung einer $[\alpha^{-32}P]$ -markierten DNA-Sonde	37
2.3.19.4.	Hybridisierung einer DNA-Sonde mit immobilisierter RNA	38
2.3.20.	Automatische DNA-Sequenzierung	39
2.3.21.	Erstellung und Auswertung von Expressionsprofilen mittels Mikro-Array-Technologie	39
2.3.22.	Bioinformatische Analyse von Promotoren	40
2.3.23.	Luciferase Genreporter-Assay	40
	1 2	
2.4.	Proteinbiochemische und immunologische Methoden	41
<b>2.4.</b> 2.4.1.	Proteinbiochemische und immunologische Methoden Herstellung polyklonaler Antiseren	<b>41</b> 41
<b>2.4.</b> 2.4.1. 2.4.2.	Proteinbiochemische und immunologische Methoden Herstellung polyklonaler Antiseren Affinitätschromatographische Aufreinigung von Antiseren	<b>41</b> 41 42
<b>2.4.</b> 2.4.1. 2.4.2. 2.4.2.1.	Proteinbiochemische und immunologische Methoden Herstellung polyklonaler Antiseren Affinitätschromatographische Aufreinigung von Antiseren Immobilisierung von Peptiden	<b>41</b> 41 42 42
<b>2.4.</b> 2.4.1. 2.4.2. 2.4.2.1. 2.4.2.2.	Proteinbiochemische und immunologische Methoden Herstellung polyklonaler Antiseren Affinitätschromatographische Aufreinigung von Antiseren Immobilisierung von Peptiden Immunaffinitätschromatographie	<b>41</b> 41 42 42 43
<b>2.4.</b> 2.4.1. 2.4.2. 2.4.2.1. 2.4.2.2. 2.4.3.	Proteinbiochemische und immunologische Methoden Herstellung polyklonaler Antiseren Affinitätschromatographische Aufreinigung von Antiseren Immobilisierung von Peptiden Immunaffinitätschromatographie Western-Blot-Analyse von Proteinen	<b>41</b> 41 42 42 43 44
<b>2.4.</b> 2.4.1. 2.4.2. 2.4.2.1. 2.4.2.2. 2.4.3. 2.4.3.1.	Proteinbiochemische und immunologische Methoden Herstellung polyklonaler Antiseren Affinitätschromatographische Aufreinigung von Antiseren Immobilisierung von Peptiden Immunaffinitätschromatographie Western-Blot-Analyse von Proteinen Herstellung von SDS-Ganzzellextrakten	<b>41</b> 42 42 43 44 44
<b>2.4.</b> 2.4.1. 2.4.2. 2.4.2.1. 2.4.2.2. 2.4.3. 2.4.3.1. 2.4.3.2.	Proteinbiochemische und immunologische Methoden Herstellung polyklonaler Antiseren Affinitätschromatographische Aufreinigung von Antiseren Immobilisierung von Peptiden Immunaffinitätschromatographie Western-Blot-Analyse von Proteinen Herstellung von SDS-Ganzzellextrakten Bestimmung der Proteinkonzentration von Ganzzellextrakten	<b>41</b> 42 42 43 44 44 45
<b>2.4.</b> 2.4.1. 2.4.2. 2.4.2.1. 2.4.2.2. 2.4.3. 2.4.3.1. 2.4.3.2. 2.4.3.3.	Proteinbiochemische und immunologische Methoden Herstellung polyklonaler Antiseren Affinitätschromatographische Aufreinigung von Antiseren Immobilisierung von Peptiden Immunaffinitätschromatographie Western-Blot-Analyse von Proteinen Herstellung von SDS-Ganzzellextrakten Bestimmung der Proteinkonzentration von Ganzzellextrakten SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	<b>41</b> 41 42 42 43 44 44 45 45
<b>2.4.</b> 2.4.1. 2.4.2. 2.4.2.1. 2.4.2.2. 2.4.3. 2.4.3.1. 2.4.3.2. 2.4.3.3. 2.4.3.3. 2.4.3.4.	Proteinbiochemische und immunologische Methoden Herstellung polyklonaler Antiseren Affinitätschromatographische Aufreinigung von Antiseren Immobilisierung von Peptiden Immunaffinitätschromatographie Western-Blot-Analyse von Proteinen Herstellung von SDS-Ganzzellextrakten Bestimmung der Proteinkonzentration von Ganzzellextrakten SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) Semi-Dry-Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	<b>41</b> 41 42 42 43 44 44 45 45 45 46
<b>2.4.</b> 2.4.1. 2.4.2. 2.4.2.1. 2.4.2.2. 2.4.3. 2.4.3.1. 2.4.3.2. 2.4.3.3. 2.4.3.4. 2.4.3.5.	Proteinbiochemische und immunologische Methoden Herstellung polyklonaler Antiseren Affinitätschromatographische Aufreinigung von Antiseren Immobilisierung von Peptiden Immunaffinitätschromatographie Western-Blot-Analyse von Proteinen Herstellung von SDS-Ganzzellextrakten Bestimmung der Proteinkonzentration von Ganzzellextrakten SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) Semi-Dry-Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen Immunoblot-Analyse	<b>41</b> 41 42 42 43 44 45 45 45 46 47
<b>2.4.</b> 2.4.1. 2.4.2. 2.4.2.1. 2.4.2.2. 2.4.3. 2.4.3.1. 2.4.3.2. 2.4.3.3. 2.4.3.4. 2.4.3.5. 2.4.3.6.	Proteinbiochemische und immunologische Methoden Herstellung polyklonaler Antiseren Affinitätschromatographische Aufreinigung von Antiseren Immobilisierung von Peptiden Immunaffinitätschromatographie Western-Blot-Analyse von Proteinen Herstellung von SDS-Ganzzellextrakten Bestimmung der Proteinkonzentration von Ganzzellextrakten SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) Semi-Dry-Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen Immunoblot-Analyse Entfernung von Antikörper von Nitrozellulosemembranen	<b>41</b> 41 42 42 43 44 45 45 46 47 47
<ol> <li>2.4.</li> <li>2.4.1.</li> <li>2.4.2.</li> <li>2.4.2.1.</li> <li>2.4.2.2.</li> <li>2.4.3.</li> <li>2.4.3.1.</li> <li>2.4.3.2.</li> <li>2.4.3.3.</li> <li>2.4.3.4.</li> <li>2.4.3.5.</li> <li>2.4.3.6.</li> <li>2.4.4.</li> </ol>	Proteinbiochemische und immunologische Methoden Herstellung polyklonaler Antiseren Affinitätschromatographische Aufreinigung von Antiseren Immobilisierung von Peptiden Immunaffinitätschromatographie Western-Blot-Analyse von Proteinen Herstellung von SDS-Ganzzellextrakten Bestimmung der Proteinkonzentration von Ganzzellextrakten SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) Semi-Dry-Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen Immunoblot-Analyse Entfernung von Antikörper von Nitrozellulosemembranen Zweidimensionale Gelelektrophorese	<b>41</b> 41 42 42 43 44 45 45 45 46 47 47 48
<ul> <li>2.4.</li> <li>2.4.1.</li> <li>2.4.2.</li> <li>2.4.2.1.</li> <li>2.4.2.2.</li> <li>2.4.3.</li> <li>2.4.3.1.</li> <li>2.4.3.2.</li> <li>2.4.3.3.</li> <li>2.4.3.4.</li> <li>2.4.3.5.</li> <li>2.4.3.6.</li> <li>2.4.4.</li> <li>2.4.4.1.</li> </ul>	Proteinbiochemische und immunologische MethodenHerstellung polyklonaler AntiserenAffinitätschromatographische Aufreinigung von AntiserenImmobilisierung von PeptidenImmunaffinitätschromatographieWestern-Blot-Analyse von ProteinenHerstellung von SDS-GanzzellextraktenBestimmung der Proteinkonzentration von GanzzellextraktenSDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)Semi-Dry-Transfer von Proteinen auf NitrozellulosemembranenImmunoblot-AnalyseEntfernung von Antikörper von NitrozellulosemembranenZweidimensionale GelelektrophoreseHerstellung von Ganzzellextrakten für die zweidimensionale Gelelektrophorese	<b>41</b> 41 42 42 43 44 45 45 46 47 47 48 48
<b>2.4.</b> 2.4.1. 2.4.2. 2.4.2.1. 2.4.2.2. 2.4.3. 2.4.3.1. 2.4.3.2. 2.4.3.3. 2.4.3.4. 2.4.3.5. 2.4.3.6. 2.4.4. 2.4.4.1. 2.4.4.2.	Proteinbiochemische und immunologische MethodenHerstellung polyklonaler AntiserenAffinitätschromatographische Aufreinigung von AntiserenImmobilisierung von PeptidenImmunaffinitätschromatographieWestern-Blot-Analyse von ProteinenHerstellung von SDS-GanzzellextraktenBestimmung der Proteinkonzentration von GanzzellextraktenSDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)Semi-Dry-Transfer von Proteinen auf NitrozellulosemembranenImmunoblot-AnalyseEntfernung von Antikörper von NitrozellulosemembranenZweidimensionale GelelektrophoreseHerstellung von Ganzzellextrakten für die zweidimensionale GelelektrophoreseIsoelektrische Fokussierung	<b>41</b> 41 42 42 43 44 45 45 46 47 47 48 48 49
<b>2.4.</b> 2.4.1.         2.4.2.         2.4.2.1.         2.4.2.2.         2.4.3.         2.4.3.1.         2.4.3.2.         2.4.3.3.         2.4.3.4.         2.4.3.5.         2.4.3.6.         2.4.4.1.         2.4.4.2.         2.4.4.3.	Proteinbiochemische und immunologische MethodenHerstellung polyklonaler AntiserenAffinitätschromatographische Aufreinigung von AntiserenImmobilisierung von PeptidenImmunaffinitätschromatographieWestern-Blot-Analyse von ProteinenHerstellung von SDS-GanzzellextraktenBestimmung der Proteinkonzentration von GanzzellextraktenSDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)Semi-Dry-Transfer von Proteinen auf NitrozellulosemembranenImmunoblot-AnalyseEntfernung von Antikörper von NitrozellulosemembranenZweidimensionale GelelektrophoreseHerstellung von Ganzzellextrakten für die zweidimensionale GelelektrophoreseIsoelektrische FokussierungGelelektrophoretische Auftrennung isoelektrisch fokussierter Proteine	<b>41</b> 41 42 42 43 44 45 45 46 47 47 48 48 49 50
<b>2.4.</b> 2.4.1.         2.4.2.         2.4.2.1.         2.4.2.2.         2.4.3.         2.4.3.1.         2.4.3.2.         2.4.3.3.         2.4.3.4.         2.4.3.5.         2.4.3.6.         2.4.4.1.         2.4.4.2.         2.4.4.3.	Proteinbiochemische und immunologische MethodenHerstellung polyklonaler AntiserenAffinitätschromatographische Aufreinigung von AntiserenImmobilisierung von PeptidenImmunaffinitätschromatographieWestern-Blot-Analyse von ProteinenHerstellung von SDS-GanzzellextraktenBestimmung der Proteinkonzentration von GanzzellextraktenSDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)Semi-Dry-Transfer von Proteinen auf NitrozellulosemembranenImmunoblot-AnalyseEntfernung von Antikörper von NitrozellulosemembranenZweidimensionale GelelektrophoreseIsoelektrische FokussierungGelelektrophoretische Auftrennung isoelektrisch fokussierter ProteineCoomassie Brilliant Blue-Färbung von PAGE-Gelen	<b>41</b> 41 42 42 43 44 45 45 46 47 47 48 48 49 50 50
<b>2.4.</b> 2.4.1.         2.4.2.         2.4.2.1.         2.4.2.2.         2.4.3.         2.4.3.1.         2.4.3.2.         2.4.3.3.         2.4.3.4.         2.4.3.5.         2.4.3.6.         2.4.4.1.         2.4.4.2.         2.4.4.3.         2.4.4.3.         2.4.4.3.         2.4.4.3.         2.4.4.3.         2.4.4.3.         2.4.4.3.         2.4.4.3.	Proteinbiochemische und immunologische MethodenHerstellung polyklonaler AntiserenAffinitätschromatographische Aufreinigung von AntiserenImmobilisierung von PeptidenImmunaffinitätschromatographieWestern-Blot-Analyse von ProteinenHerstellung von SDS-GanzzellextraktenBestimmung der Proteinkonzentration von GanzzellextraktenSDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)Semi-Dry-Transfer von Proteinen auf NitrozellulosemembranenImmunoblot-AnalyseEntfernung von Antikörper von NitrozellulosemembranenZweidimensionale GelelektrophoreseHerstellung von Ganzzellextrakten für die zweidimensionale GelelektrophoreseIsoelektrische FokussierungGelelektrophoretische Auftrennung isoelektrisch fokussierter ProteineCoomassie Brilliant Blue-Färbung von PAGE-GelenElectrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	<b>41</b> 41 42 42 43 44 45 45 46 47 47 48 48 49 50 50 51
<b>2.4.</b> 2.4.1.         2.4.2.         2.4.2.1.         2.4.2.2.         2.4.3.         2.4.3.1.         2.4.3.2.         2.4.3.3.         2.4.3.4.         2.4.3.5.         2.4.3.6.         2.4.4.1.         2.4.4.2.         2.4.4.3.         2.4.4.1.         2.4.4.3.         2.4.4.3.         2.4.4.3.         2.4.4.3.         2.4.4.3.         2.4.5.1.	Proteinbiochemische und immunologische MethodenHerstellung polyklonaler AntiserenAffinitätschromatographische Aufreinigung von AntiserenImmobilisierung von PeptidenImmunaffinitätschromatographieWestern-Blot-Analyse von ProteinenHerstellung von SDS-GanzzellextraktenBestimmung der Proteinkonzentration von GanzzellextraktenSDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)Semi-Dry-Transfer von Proteinen auf NitrozellulosemembranenImmunoblot-AnalyseEntfernung von Antikörper von NitrozellulosemembranenZweidimensionale GelelektrophoreseHerstellung von Ganzzellextrakten für die zweidimensionale GelelektrophoreseIsoelektrische FokussierungGelelektrophoretische Auftrennung isoelektrisch fokussierter ProteineCoomassie Brilliant Blue-Färbung von PAGE-GelenElectrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)Herstellung von Zellkern-Extrakten	<b>41</b> 41 42 42 43 44 45 45 46 47 47 48 49 50 50 51 51
<b>2.4.</b> 2.4.1.         2.4.2.         2.4.2.1.         2.4.2.2.         2.4.3.         2.4.3.1.         2.4.3.2.         2.4.3.3.         2.4.3.4.         2.4.3.5.         2.4.3.6.         2.4.4.1.         2.4.4.2.         2.4.4.3.         2.4.4.1.         2.4.4.2.         2.4.4.3.         2.4.4.1.         2.4.4.2.         2.4.4.3.         2.4.5.1.         2.4.5.1.	Proteinbiochemische und immunologische MethodenHerstellung polyklonaler AntiserenAffinitätschromatographische Aufreinigung von AntiserenImmobilisierung von PeptidenImmunaffinitätschromatographieWestern-Blot-Analyse von ProteinenHerstellung von SDS-GanzzellextraktenBestimmung der Proteinkonzentration von GanzzellextraktenSDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)Semi-Dry-Transfer von Proteinen auf NitrozellulosemembranenImmunoblot-AnalyseEntfernung von Antikörper von NitrozellulosemembranenZweidimensionale GelelektrophoreseHerstellung von Ganzzellextrakten für die zweidimensionale GelelektrophoreseIsoelektrische FokussierungGelelektrophoretische Auftrennung isoelektrisch fokussierter ProteineCoomassie Brilliant Blue-Färbung von PAGE-GelenElectrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)Herstellung von Zellkern-ExtraktenHybridisierung von komplementären Oligonukleotiden	<b>41</b> 41 42 42 43 44 45 45 46 47 47 48 48 49 50 50 51 51 52
<b>2.4.</b> 2.4.1.         2.4.2.         2.4.2.1.         2.4.2.2.         2.4.3.         2.4.3.1.         2.4.3.2.         2.4.3.3.         2.4.3.4.         2.4.3.5.         2.4.3.6.         2.4.4.1.         2.4.4.2.         2.4.4.3.         2.4.4.1.         2.4.4.2.         2.4.4.3.         2.4.4.5.         2.4.5.1.         2.4.5.3.	Proteinbiochemische und immunologische MethodenHerstellung polyklonaler AntiserenAffinitätschromatographische Aufreinigung von AntiserenImmobilisierung von PeptidenImmunaffinitätschromatographieWestern-Blot-Analyse von ProteinenHerstellung von SDS-GanzzellextraktenBestimmung der Proteinkonzentration von GanzzellextraktenSDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)Semi-Dry-Transfer von Proteinen auf NitrozellulosemembranenImmunoblot-AnalyseEntfernung von Antikörper von NitrozellulosemembranenZweidimensionale GelelektrophoreseHerstellung von Ganzzellextrakten für die zweidimensionale GelelektrophoreseIsoelektrische FokussierungGelelektrophoretische Auftrennung isoelektrisch fokussierter ProteineCoomassie Brilliant Blue-Färbung von PAGE-GelenElectrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)Herstellung von Zellkern-ExtraktenHybridisierung von komplementären OligonukleotidenHerstellung von $[\gamma-^{32}P]$ -markierten Oligonukleotiden	<b>41</b> 41 42 42 43 44 45 45 45 46 47 47 48 48 49 50 50 51 51 52 52
<b>2.4.</b> 2.4.1.         2.4.2.         2.4.2.1.         2.4.2.2.         2.4.3.         2.4.3.1.         2.4.3.2.         2.4.3.3.         2.4.3.4.         2.4.3.5.         2.4.3.6.         2.4.4.1.         2.4.4.2.         2.4.4.3.         2.4.4.1.         2.4.4.2.         2.4.4.3.         2.4.4.3.         2.4.5.1.         2.4.5.3.         2.4.5.4.	Proteinbiochemische und immunologische MethodenHerstellung polyklonaler AntiserenAffinitätschromatographische Aufreinigung von AntiserenImmobilisierung von PeptidenImmunaffinitätschromatographieWestern-Blot-Analyse von ProteinenHerstellung von SDS-GanzzellextraktenBestimmung der Proteinkonzentration von GanzzellextraktenSDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)Semi-Dry-Transfer von Proteinen auf NitrozellulosemembranenImmunoblot-AnalyseEntfernung von Antikörper von NitrozellulosemembranenZweidimensionale GeleektrophoreseHerstellung von Ganzzellextrakten für die zweidimensionale GeleektrophoreseIsoelektrische FokussierungGelelektrophoretische Auftrennung isoelektrisch fokussierter ProteineCoomassie Brilliant Blue-Färbung von PAGE-GelenElectrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)Herstellung von Zellkern-ExtraktenHybridisierung von komplementären OligonukleotidenHerstellung von [γ- <sup>32</sup> P]-markierten OligonukleotidenBindungsreaktion	<b>41</b> 41 42 42 43 44 45 45 46 47 47 48 48 49 50 50 51 51 52 52 53
<b>2.4.</b> 2.4.1.         2.4.2.         2.4.2.1.         2.4.2.2.         2.4.3.         2.4.3.1.         2.4.3.2.         2.4.3.3.         2.4.3.4.         2.4.3.5.         2.4.3.6.         2.4.4.1.         2.4.4.2.         2.4.4.3.         2.4.4.1.         2.4.4.2.         2.4.4.3.         2.4.4.3.         2.4.5.1.         2.4.5.1.         2.4.5.4.         2.4.5.4.	Proteinbiochemische und immunologische MethodenHerstellung polyklonaler AntiserenAffinitätschromatographische Aufreinigung von AntiserenImmobilisierung von PeptidenImmunaffinitätschromatographieWestern-Blot-Analyse von ProteinenHerstellung von SDS-GanzzellextraktenBestimmung der Proteinkonzentration von GanzzellextraktenSDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)Semi-Dry-Transfer von Proteinen auf NitrozellulosemembranenImmunoblot-AnalyseEntfernung von Antikörper von NitrozellulosemembranenZweidimensionale GeleektrophoreseHerstellung von Ganzzellextrakten für die zweidimensionale GeleektrophoreseIsoelektrische FokussierungGelelektrophoretische Auftrennung isoelektrisch fokussierter ProteineCoomassie Brilliant Blue-Färbung von PAGE-GelenElectrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)Herstellung von Zellkern-ExtraktenHybridisierung von komplementären OligonukleotidenHerstellung von [γ- <sup>32</sup> P]-markierten OligonukleotidenHirdungsreaktionNative Polyacrylamid-Gelelektrophorese	<b>41</b> 41 42 42 43 44 45 45 46 47 47 48 48 49 50 50 51 51 52 52 53 53

2.4.7.	Herstellung von Mowiol	54
2.4.8.	Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten	55
3.	Ergebnisse	56
3.1.	Retrovirale cDNA-Expressionsklonierung von Proto-Onkogenen	56
3.1.1.	Herstellung der retroviralen cDNA-Expressionsbibliothek	57
3.1.2.	Charakterisierung der retroviralen cDNA-Expressionsbibliothek	58
3.1.3.	Standardisierung des retroviralen Gentransfers	59
3.1.4.	Identifizierung von Proto-Onkogenen mittels des Fokus-Assay	60
3.1.5.	Reklonierung der als Provirus in das Wirtsgenom integrierten cDNA-Fragmente	61
3.1.6.	Ergebnis der retroviralen cDNA-Expressionsklonierung	62
3.2.	Expression der identifizierten Gene in humanen Mammakarzinom-Zelllinien	62
3.3.	Transformierende Eigenschaften des GRHL2-Proteins	65
3.3.1.	Stabile Transfektion von NIH3T3-Zellen mit einem GRHL2-Expressionsplasmid	65
3.3.2.	GRHL2 induziert eine morphologische Transformation von NIH3T3-Zellen	66
3.3.3.	GRHL2 bewirkt eine Steigerung der Teilungsaktivität von NIH3T3-Zellen in vitro	66
3.3.4.	GRHL2 induziert ein Substrat-unabhängiges Wachstum von NIH3T3-Zellen	67
3.3.5.	GRHL2 induziert Tumorwachstum von NIH3T3-Zellen in immundefizienten Mäusen	68
3.3.6.	Transformierende Eigenschaften einer GRHL2-Isoform	69
3.3.7.	Das GRHL2 <sub>157-625</sub> -Genprodukt übt einen dominant-negativen Effekt aus	71
3.4.	Identifizierung von potentiellen GRHL2-Zielgenen	72
3.4.1.	Ermittlung von GRHL2-induzierten Expressionsunterschieden mittels	= 0
2 4 2	Mikro-Array-Analyse	75
3.4.2. 3.4.3.	Identifizierung ortholog-konservierter GRHL2-Bindungsstellen innerhalb der	75
2 4 4	Promotorsequenzen deregulierter Gene	76
3.4.4. 3 5	Herstellung von GRHI 2-snezifischen nolyklonalen Antikörnern	70 80
3.6	GRHL2-Expression in humanen Mammakarzinom-Zelllinien	82
3.7.	Expression der GRHL 2-Isoformen in humanen Brustkrehszelllinien	83
2.0		00
3.8.	Das GRHL2-2-Gentranskript wird durch alternatives Spleißen erzeugt	84
3.9.	Das GRHL2-Protein besitzt eine nukleäre Lokalisation	86
3.10.	Etablierung und Charakterisierung von MDA-MB-468-Zellen mit stabiler GRHL2-Überexpression	87
3.11.	Etablierung und Charakterisierung von MCF-7-Zellen mit stabiler GRHL2-Überexpression	89
3.12.	Studien zur Regulation der Aktivität des GRHL2-Proteins	90
3.12.1.	Darstellung des GRHL2-Proteins in einer Western-Blot-Analyse	
	nach zweidimensionaler Proteinauftrennung	91
3.12.2.	Expressionsanalyse der Transkriptionsfaktoren GRHL1 und GRHL3	
	in humanen Mammakarzinom-Zelllinien	92

3.13.	<b>GRHL2-Protein-Expression in humanen Geweben</b>	93
3.14.	<b>GRHL2-Protein-Expression in humanen Tumoren</b>	94
3.15.	GRHL2-Protein-Expression in humanen Mammakarzinomen	95
4.	Diskussion	98
4.1.	Methodische Aspekte der retroviralen cDNA-Expressionsklonierung von Proto-Onkogenen	98
4.2.	Mittels der retroviralen cDNA-Expressionsklonierung identifizierte Proto-Onkogene	100
4.3.	Kriterien für die Auswahl eines Kandidatengens für weiterführende Studien	102
4.4.	Onkogene Eigenschaften des GRHL2-Gens	103
4.5.	Mechanismen der GRHL2-induzierten malignen Transformation von Zellen	104
4.6.	Die Expression von GRHL2 in Mammakarzinom-Zelllinien, normalen und malignen Geweben	106
4.7.	Etablierung eines Modellsystems zur Analyse der Funktion von GRHL2 in Mammakarzinom-Zellen	108
4.8.	Die Bedeutung des GRHL2-Gens für die Entstehung und Progression des Mammakarzinoms	109
4.9.	Ausblick	100
5.	Zusammenfassung	112
6.	Literaturverzeichnis	114
7.	Anhang	120
8.	Danksagung	125

# 1. Einleitung

Das humane Mammakarzinom stellt in der Europäischen Union die häufigste Krebserkrankung innerhalb der weiblichen Bevölkerung dar. Statistisch ist festzuhalten, dass jede vierte Krebserkrankung bei Frauen im Brustgewebe entsteht und dass jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt. In etwa einem Drittel der Fälle endet die Krankheit tödlich. Insgesamt werden in der Europäischen Union jährlich ca. 250.000 Neuerkrankungen diagnostiziert, während etwa 70.000 Frauen jährlich an einem Mammakarzinom sterben. Das Erkrankungsrisiko steigt dabei mit zunehmendem Alter – besonders ab dem vierten Lebensjahrzehnt – allmählich an. Die Häufigkeit dieser Krebsform hat in Europa in den letzten 20 Jahren im Ganzen zugenommen.

In vielen Fällen kann durch einen chirurgischen Eingriff oder durch die Verabreichung zytostatischer Agenzien eine Heilung der Patientinnen erzielt werden. Bei malignen Tumoren hingegen ist eine wirksame Therapie häufig nicht mehr möglich, da sich diese durch ein infiltratives und destruktives Wachstum in umliegende Gewebe hinein auszeichnen und fähig sind, in weiter entfernt liegenden Organen Metastasen zu bilden. Die meisten Patientinnen sterben letztlich an den Folgen der Metastasenbildung.

Obwohl durch den technologischen Fortschritt in den analytischen und diagnostischen Verfahren der Lebenswissenschaften insbesondere in den letzten zwei Dekaden eine Fülle von neuen Ergebnissen erzielt wurde, die sehr zum besseren Verständnis der Krebserkrankungen beigetragen haben, blieb der unmittelbare therapeutische Nutzen für die Patientinnen eher gering. Eine weitere Erforschung der molekularen Mechanismen und zellulären Zusammenhänge, die der Entstehung und Progression einer Krebserkrankung zu Grunde liegen, ist daher zwingend notwendig.

Ziel dieser Doktorarbeit war es deshalb, neue Mammakarzinom-assoziierte Gene zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren. Die entsprechenden Genprodukte könnten mögliche neue Zielstrukturen für innovative therapeutische Ansätze zur Behandlung von Patientinnen mit Mammakarzinom darstellen.

#### 1.1. Das Sequenzmodell der Krebsentstehung

Krebs ist eine Erkrankung, die auf der Ansammlung verschiedener genetischer Defekte in zuvor normalen Körperzellen beruht. Tumore wachsen klonal, das heißt sie entstehen aus einer einzelnen entarteten Zelle. Erworbene Eigenschaften der Tumorzellen werden von der Mutterzelle an die Tochterzellen vererbt. Die Anhäufung zusätzlicher genetischer Defekte in einzelnen Zellklonen sorgt in einem mehrstufigen Prozess dafür, dass normale Zellen zu einem hochmalignen Derivat transformiert werden. Grundlage dieser Theorie der Krebsentwicklung waren detaillierte Beobachtungen beim kolorektalen Karzinom [Vogelstein und Kinzler, 1993]. Die beobachteten Veränderungen des Genoms reichen dabei von simplen Punktmutationen bis hin zum Verlust ganzer Chromosomen [Kinzler und Vogelstein, 1996]. Diese krebsrelevanten genetischen Veränderungen führen letztlich zu einer Deregulierung beziehungsweise Mutation von Tumor-assoziierten Genen. Gene, die eine Zellentartung vermitteln, lassen sich sehr generell in Onkogene, die mit einem dominanten Funktionsgewinn assoziiert sind, und in rezessiv wirkende Tumorsuppressorgene, deren Funktion in der Tumorigenese verloren geht, unterscheiden.

Im weiteren Verlauf der Tumorprogression beobachtet man Veränderungen bei Genen, die unter anderem mit Zelladhäsion, Apoptose und Angiogenese assoziiert sind. Diese genetischen Veränderungen ermöglichen den Tumorzellen eine Ausbreitung im Körper. Auch wenn die stetig wachsende Zahl der bekannten Tumor-assoziierten Gene eine kaum überschaubare Fülle genotypischer Unterschiede bei malignen Zellen hervorbringt, beobachtet man dennoch, dass die Tumor-assoziierten Gene gehäuft in dieselben zellphysiologischen Mechanismen involviert sind. In einer wegweisenden Arbeit wird postuliert, dass Tumorzellen im Laufe der Tumorigenese sukzessiv wenigstens eine genetische Alteration in sechs essentiellen Bereichen der Zellphysiologie erwerben müssen, um den malignen Phänotyp entwickeln zu können [Hanahan und Weinberg, 2000]. Dabei stellt jede in einem dieser physiologischen Vorgänge neu erworbene Mutation auch die Überwindung einer der körpereigenen Schutzmechanismen dar, die die Entartung von Zellen verhindern sollen. Bei diesen sechs Mechanismen handelt es sich um die Unabhängigkeit von externen Wachstumsstimuli, die Insensitivität für antiproliferative Signale, die Resistenz gegenüber Apoptose, ein unlimitiertes proliferatives Potential, die Induktion von Angiogenese sowie die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung (vergleiche Abb. 1). Im Folgenden wird die Bedeutung dieser Mechanismen für die Entartung von Zellen anhand von repräsentativen Beispielen Tumor-assoziierter Gene diskutiert.



Abb. 1: Für die vollständige Entartung von Tumorzellen sind mindestens sechs genetische Alterationen in verschiedenen Mechanismen der Zellphysiologie nötig. Manchmal wirkt sich die Mutation eines Gens auch auf zwei der gezeigten Mechanismen aus. Weitere Erläuterung im Text [nach Hanahan und Weinberg, 2000].

# 1.1.1. Unabhängigkeit von externen Wachstumsstimuli

Die erworbene Autonomie gegenüber extrazellulären Wachstumsstimuli war der erste der essentiellen zellbiologischen Mechanismen, bei denen ein unmittelbarer Zusammenhang zur Krebsentstehung gezeigt wurde. Die ersten Onkogene, die überhaupt identifiziert wurden, sind an diesem Prozess beteiligt [Weiss et al., 1977]. Im normalen Zellverband benötigt eine Zelle mitogene Wachstumssignale, bevor sie aus der G<sub>0</sub>-Phase in einen neuen Zellzyklus eintreten kann [Massaqué, 2004]. Diese extrazellulären Wachstumssignale werden von Rezeptoren wahrgenommen, die jeweils eine spezifische Klasse von Signalmolekülen erkennen können. Man unterscheidet bei den extrazellulären Stimuli zwischen sekretorischen Wachstumsfaktoren, extrazellulären Matrix-Komponenten und Zell-Zell-, Adhäsionsbeziehungsweise Interaktionsproteinen. Unter normalen Umständen kann eine somatische Zelle bei Abwesenheit dieser externen Stimuli nicht proliferieren.

Die Expression eines Onkogens kann die Unabhängigkeit von den externen Signalen prinzipiell auf drei unterschiedliche Arten bewirken: Erstens kann die Tumorzelle eigene

Wachstumsfaktoren produzieren, die die zelleigenen Rezeptoren stimulieren. Diesen Vorgang bezeichnet man als autokrine Wachstumsstimulation [Heldin und Westermark, 1999]. Zweitens kann durch die Überexpression eines Oberflächenrezeptors eine Hypersensitivität für die vorhandenen Wachstumssignale entstehen. Man beobachtet eine solche Überexpression von Tyrosinkinase-Rezeptoren in einer Vielzahl von Tumorentitäten. So findet man in Brusttumoren beispielsweise häufig eine Überexpression der EGF- und HER2-Rezeptoren [Zaczek et al., 2005]. Mutationen, die mit einer strukturellen Veränderung der Rezeptoren oder deren nachgeschalteten Signalproteinen einhergehen, können zu einer konstitutiven Aktivierung ihrer Signalkaskade führen. In einem solchen Fall werden Wachstumssignale ohne einen extrazellulären Stimulus erzeugt [Riese et al., 2007]. Drittens beobachtet man in Krebszellen häufig eine Deregulierung der Integrinexpression. Integrine sind Transmembran-Rezeptoren, mit denen sich Zellen an die makromolekularen Verbindungen der extrazellulären Matrix (ECM) anhaften. Diese Proteine sind intrazellulär an das Zytoskelett und dessen Signalkaskaden gekoppelt. Durch Mutationen der Integrine können so artifizielle Wachstumssignale erzeugt werden [Lukashev und Werb, 1998].

# 1.1.2. Insensitivität für anti-proliferative Signale

Um in einen neuen Zellzyklus eintreten zu können, reicht eine einseitige Stimulierung mit mitogenen Wachstumssignalen jedoch nicht aus. Die aufgenommenen Wachstumssignale werden vielmehr in der Zelle integriert und gegen anti-proliferative Signale abgewogen. Die Mechanismen der Wachstumsinhibition dienen der Aufrechterhaltung der zellulären Homeostase und verhindern einen vorschnellen Eintritt in den Zellzyklus [Massagué, 2004]. Diese wachstumsinhibierenden Signale bestehen dabei aus löslichen Faktoren oder sind in der ECM oder auf benachbarten Zellen immobilisiert. Bei der intrazellulären Verarbeitung dieser Signale spielt das Rb-Tumorsuppressor-Protein eine zentrale Rolle [Classon und Harlow, 2002; Hatakeyama und Weinberg, 1995]. Der Funktionsverlust dieses Proteins erlaubt eine ungeregelte Passage in die G1-Phase des Zellzyklus. Viele Tumore verlieren auch die Eigenschaft, TGFβ-Rezeptoren beziehungsweise deren nachgeschaltete Signalproteine zu exprimieren, anti-proliferative löslichen wodurch der Signalweg, der vom Wachstumsinhibitor TGFβ ausgeht, blockiert wird [Siegel und Massagué, 2003].

#### 1.1.3. Resistenz gegenüber Apoptose

Tumorzellpopulationen können ihre Zellzahl nicht nur durch einen Anstieg ihrer Proliferationsrate erhöhen. Eine erworbene Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod, der als Apoptose bezeichnet wird, führt auch zu einem Anstieg der Zellzahl [Danial und Korsmeyer, 2004]. So findet man in Tumorzellen eine Vielzahl genetischer Alterationen bei Apoptose-assoziierten Proteinen. Mechanistisch unterscheidet man bei diesen Proteinen zwischen Sensoren und Effektoren der Apoptose. Das wichtigste intrazelluläre proapoptotische Signal besteht in der Freisetzung von Cytochrom C aus der mitochondrialen Membran [Green, 2005]. Ein wichtiger Sensor für extrazelluläre pro-apoptotische Signale ist der FAS-Rezeptor. In Tumorzellen findet man häufig Mutationen bei diesem Rezeptor und den nachgeschalteten Signalproteinen der Bcl-Proteinfamilie [Lee und Ferguson, 2003; Heiser et al, 2004]. Die zentralen Effektoren der Apoptose sind die beiden Proteasen Caspase-8 und -9 [Green, 2005], die nach ihrer Aktivierung proteolytisch andere Caspasen aktivieren und so das Apoptoseprogramm auslösen.

Das Apoptoseprogramm ist latent in jeder Körperzelle angeschaltet. Unter physiologischen Bedingungen kommt es jedoch nur zur Ausführung dieses Programms, wenn sich das Gleichgewicht von pro-apoptotischen Signalen und Überlebenssignalen zu Gunsten der proapototischen Signale verschiebt. So kommt es beispielsweise bei massiven DNA-Schädigungen zur Initiation der Apoptose. Eine zentrale Rolle kommt hier dem p53-Protein zu [Aylon und Oren, 2007]. Bei diesem als Sensor für DNA-Schäden fungierenden Protein beobachtet man bei etwa der Hälfte der menschlichen Tumore Mutationen [Harris, 1996]. Die durch Apoptose vermittelte Eliminierung von Zellen, die DNA-Schäden erworben haben, stellt einen grundlegenden Schutzmechanismus vor der Zellentartung dar. Fehlt dieser Mechanismus, kommt es zwangsläufig zur Akkumulierung von DNA-Schäden, die ungehindert von Mutter- an Tochterzellen vererbt werden.

# **1.1.4.** Unlimitiertes replikatives Potential

Auch wenn Tumorzellen Autonomie gegenüber Wachstumsstimuli und anti-proliferativen Signalen sowie eine Resistenz gegen Apoptose erworben haben, bleibt ihr Proliferationspotential eingeschränkt. Die Anzahl der Zellteilungen ist bei normalen somatischen Zellen auf 60-70 begrenzt [Finkel et al., 2007]. Diese beobachtete Restriktion der Proliferationskapazität beruht auf einer sukzessiven Verkürzung der Telomere bei jeder erfolgten Zellteilung. In Keimzellen und schnell wachsenden somatischen Zellen – etwa Stammzellen – synthetisiert die Telomerase, bei der es sich um eine Reverse Transkriptase mit eigener sogenannter "Template"-RNA handelt, neue repetitive DNA-Sequenzen an den Telomerenden. Da in den meisten somatischen Zellen keine Telomerase exprimiert ist, verkürzen sich die Telomere bei jedem Zellzyklus. Nach dem vollständigen Verlust der Telomere fusionieren die Chromosomen an ihren Enden und die Zelle stirbt ab [Cech, 2004]. In allen malignen Zellen ist hingegen die Aufrechterhaltung der Telomerlängen zu beobachten [Shay and Bacchetti, 1997]. Dies gelingt 85-90 Prozent der Tumorzellen durch eine Induktion der Telomeraseexpression [Bryan und Cech, 1999]. Der restliche Anteil an Tumorzellen hat einen alternativen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Telomerlängen entwickelt, welcher als ALT bezeichnet wird und auf einem interchromosomalen homologen Austausch von Sequenzinformation beruht [Neumann und Reddel, 2002]. Beide Mechanismen ermöglichen den Tumorzellen, eine unbegrenzte Anzahl von Nachkommenzellen hervorzubringen.

# 1.1.5. Induktion von Angiogenese

Sowohl primäre als auch sekundäre Tumore benötigen zum Wachstum neue Blutgefäße. Bei fehlender Blutversorgung kann ein Tumor nicht über eine Größe von zwei Millimeter Durchmesser hinaus wachsen. Zu diesem Zeitpunkt halten sich die Zellproliferation im Randbereich und das Absterben der Zellen auf Grund unzureichender Nährstoffzufuhr im Inneren des Tumors in etwa die Waage [Folkman, Hannahan, 1991]. Allerdings induzieren die meisten Tumore die Bildung neuer Blutgefäße, die den Tumor infiltrieren und ernähren. Diesen Vorgang bezeichnet man als Angiogenese. Die Angiogenese lässt sich in definierte Schritte unterteilen [Bergers und Benjamin, 2003]: Den Abbau der die Blutgefäße umgebenen Basallamina, die Einwanderung von Endothelzellen und schließlich die Teilung der invadierten Endothelzellen. Dieser Ablauf führt schließlich zur Neubildung eines Blutgefäßes. Viele Tumore sezernieren angiogene Substanzen oder veranlassen die sie umgebenden Stromazellen zur Synthese und Sekretion angiogener Moleküle, wie zum Beispiel FGF1/2 und VEGF [Bergers und Benjamin, 2003; Veikkola und Alitalo, 1999]. Die neuen Blutgefäße ernähren den wachsenden Tumor, ermöglichen dessen Vergrößerung und erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass sich zusätzliche schädliche Mutationen ereignen. Zudem erleichtert die unmittelbare Nähe von Blutgefäßen zu Tumorzellen deren Metastasierung.

# 1.1.6. Metastasierung

Der hochspezifische mehrstufige Prozess der Tumormetastasierung beginnt mit dem Verlust homotypischer Zell-Zell-Adhäsion epithelialer Zellen im Gewebsverband und der Invasion besonders motiler Tumorzellen durch die Basalmembran und das umgebende Stroma des Primätumors. Tumorzellen, die beginnen umliegende Gewebe zu invasieren, zeigen stets eine verminderte interzelluläre Adhäsion. In vielen Fällen verlieren sie dabei die E-Cadherin-vermittelte Adhäsion zu ihren Nachbarzellen. Dokumentierte Mechanismen sind in diesem Zusammenhang ein epigenetisches Ausschalten der E-Cadherin-Expression und ein proteolytischer Abbau des Proteins [Cavallaro et al., 2002]. Auch kann die E-Cadherin-Expression durch das Durchlaufen einer epithelialen mesenchymalen Transition (EMT) unterbunden werden.

Für den Eintritt in benachbarte Gewebe ist die aktive Fortbewegung der malignen Zellen eine Grundvoraussetzung. Die Migration erfordert einen dynamischen Umbau des Zytoskeletts, Zell-Matrix-Interaktionen und lokale Proteolyse zum Abbau fokaler Adhäsionsstellen [Wolf und Friedl, 2006]. Im Zuge dessen findet man viele genetische Alterationen bei den kleinen GTPasen Rho, Cdc42 und Rac, die diese zellulären Vorgänge kontrollieren. Für maligne Zellen stellt die Basalmembran eine mechanische Barriere dar, die nur durch einen enzymatischen Abbau überwunden werden kann. Hierfür ist die Aktivität der extrazellulären Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) von zentraler Bedeutung [Liotta und Kohn, 2001]. Als Nebeneffekt der MMP-Aktivierung kann es durch proteolytischen Abbau zur Freisetzung von wachstumsstimulierenden Faktoren aus der ECM kommen [Overall und Kleinfeld, 2006].

Die weitere Ausbreitung der Tumorzellen erfolgt nun entweder über das Lymph- oder das Blutsystem. Die lymphogene und die hämatogene Disseminierung versteht man als biologisch getrennte Vorgänge [Pantel und Brakenhoff, 2004]. Grundlage für diese Annahme sind die genetischen Signaturen disseminierter Tumorzellen [Wölfle et al. 2003; Van't Veer et al., 2002]. Bei der hämatogenen Disseminierung treten Tumorzellen direkt in die an den Tumor grenzenden Blutgefäße ein. Sie können, wenn sie dem physikalischen und physiologischen Stress widerstehen, der durch die hämodynamischen Scherkräfte und die Zytotoxizität des Immunsystems auf sie einwirkt, nach dem Austritt aus dem Gefäßsystem primäre Fernmetastasen bilden [Chambers et al., 2002]. Ausgehend von derartigen primären Fernmetastasen können Tumorzellen durch eine weitere hämatogene Disseminierung zu anderen Organen gelangen, um dort sekundäre Metastasen zu bilden. Bei der lymphogenen Disseminierung erfolgt zunächst eine lokal begrenzte Besiedelung eines dem Primärtumor benachbarten Lymphknotens [Cao, 2005]. Die Tumorzellen sind in diesem Stadium nicht in der Lage, durch das Blutgefäßsystem zu entfernten Organen zu gelangen [Pantel und Brakenhoff, 2004] und bilden daher eine auf den Lymphknoten beschränkte Metastase. In einem späteren Stadium der malignen Progression erlangen einzelne Zellklone die Fähigkeit,

über das Blutgefäßsystem entfernte Organe zu besiedeln und dort primäre Fernmetastasen zu bilden (Abb. 2).



Abb. 2: Tumorzellen können vom Primärtumor durch hämatogene Disseminierung (blaue Pfeile) oder lymphogene Disseminierung (rote Pfeile) zu sekundären Organen gelangen. Ausgehend von einer soliden Fernmetastase können Tumorzellen durch eine weitere hämatogene Disseminierung sekundäre Fernmetastasen bilden (schwarze Pfeile). Weitere Erläuterungen im Text [nach Pantel und Brakenhoff, 2004].

Bei einer Krebserkrankung kann sich die hämatogene Disseminierung bereits in einem frühen Stadium vollziehen [Pantel et al., 2008]. Bei verschiedenen Tumorentitäten können bereits Jahre vor dem Nachweis einer soliden Metastase einzelne Tumorzellen im Knochenmark und im Blut von Krebspatienten nachgewiesen werden [Pantel et al., 2008]. Die Existenz einzelner disseminierter Tumorzellen im Knochenmark wird als minimale residuale Krebserkrankung (MRD) bezeichnet. Beim Mammakarzinom ist ein Nachweis der MRD ein unabhängiger Prognosefaktor für ein kürzeres rezidivfreies Intervall und eine kürzere Gesamtüberlebenszeit [Braun et al., 2005; Janni et al., 2005]. Der größte Teil der disseminierten Zellen ist im weiteren Verlauf der Krebserkrankung jedoch nicht in der Lage, zu soliden Metastasen auszuwachsen. Daher nimmt man an, dass der überwiegende Anteil der disseminierten Zellen nicht zu einem Wiedereintritt in den Zellzyklus in der Lage ist und in einer Phase der Seneszenz verweilt, die man als Dormanz bezeichnet [Aquirre-Ghiso, 2007]. Die Faktoren, die die Überwindung der Dormanz bewirken und zur Bildung einer soliden Metastase führen, sind bisher nicht bekannt und Gegenstand intensiver Forschungen. In einigen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass die Mikroumgebung der disseminierten Tumorzellen einen wachstumsinhibitorischen Effekt auf die disseminierten Tumorzellen haben kann [Chambers et al., 2002; Solakoglu et al., 2002].

#### 1.2. Wundheilung und Krebs

Bei der bisherigen Beschreibung der Tumorprogression wurden nur die Eigenschaften der Tumorzellen diskutiert. Dies ist eine vereinfachte Betrachtung der Krebserkrankung, weil das den Tumor umgebende Stroma ein elementarer Bestandteil des neu gebildeten Krebsgewebes ist. Die Stromazellen bilden durch ihre funktionelle Assoziation zusammen mit den Tumorzellen eine Art neues Organ, das im Laufe der malignen Progression ständigen Veränderungen unterworfen ist [Bissel und Radisky, 2001]. Die Zellen des Tumorstromas können dabei suppressiv auf die malignen Zellen einwirken, aber auch das Tumorwachstum fördern [Tlsty und Hein, 2001]. Bereits im Jahr 1863 machte der deutsche Pathologe Rudolf Virchow die Beobachtung, dass die Beschaffenheit des Tumorstomas dem Erscheinungsbild von Entzündungsreaktionen bzw. Wundheilungsprozessen ähnelt. Er postulierte deshalb, dass Krebs als Folge chronischer Entzündungen auftritt. Die Rolle des Stromas für Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung ist seither Gegenstand intensiver tumorbiologischer Forschung [Bissell und Radisky, 2001].

Die physiologisch ablaufende Kaskade der Wundheilung ist durch eine Entzündungsreaktion mit nachfolgender Neubildung von Gewebe gekennzeichnet. Das neu gebildete Gewebe wird anschließend zur Rekonstruktion der verwundeten Gewebsbereiche verwendet. Systematisch lässt sich die Wundheilung in Latenzphase, Proliferationsphase und Regenerationsphase einteilen [Werner und Grose, 2003] (vergleiche Abb. 3). Der Wundheilungsprozess wird sofort nach dem Auftreten der Verletzung durch die Sekretion verschiedenster Wachstumsfaktoren und Zytokine ausgelöst, die direkt aus den verletzten Blutgefäßen oder den degranulierten Blutplättchen freigesetzt werden. Die Zerstörung von Blutgefäßen führt ebenso zur Formation eines Blutpfropfes, der aus quervernetzten Fibrin und ECM-Proteinen wie zum Beispiel Fibronektin, Vitronektin und Thrombospondin besteht [Martin, 1997]. Diese quervernetzten Proteine dienen als Barriere gegen weiteren Blutaustritt, als Matrix für invadierende Zellen und als Reservoir für weitere Wachstumsfaktoren der ablaufenden Kaskade. Die ersten Zellen, die in die Wunde eintreten, sind Neutrophile, gefolgt von Monozyten und Leukozyten. Diese wirken zytotoxisch auf eingetretene Mikroorganismen und setzen ihrerseits Wachstumsfaktoren und Zytokine frei, die die Proliferationsphase der Wundheilung initiieren [Werner und Grose, 2003]. Keratinozyten und Fibroblasten an den Wundrändern beginnen nun verstärkt zu proliferieren und wandern auf der provisorischen Proteinmatrix in die Wunde ein, wo sie große Mengen an ECM-Proteinen und angiogenen Wachstumsfaktoren sezernieren, die eine massive Neubildung von Blutgefäßen hervorrufen. Das neu entstandene Gewebe bezeichnet man aufgrund seiner Beschaffenheit als Granulationsgewebe, welches in der Regenerationsphase schließlich in reifes Narbengewebe umgewandelt wird. In dieser Phase kommt es zu einer Differenzierung von invadierten Fibroblasten zu Myofibroblasten, die große Mengen an Kollagen synthetisieren und metabolisieren [Werner und Grose, 2003].



Abb. 3: Schematische Darstellung der verschiedenen Stadien der physiologischen Wundheilung. Weitere Erläuterungen im Text [nach Werner und Grose, 2003].

Obwohl bei der Tumorentstehung keine Verletzung des Gewebes im eigentlichen Sinne vorliegt, kann man verschiedene Mechanismen der Wundheilung bei der Krebsentstehung nachvollziehen. Krebszellen verändern das sie umgebende Stroma, um eine unterstützende Mikroumgebung zu erzeugen. Dieses reaktive Tumorstroma wird als Desmoplasie bezeichnet und besteht aus Tumor-assoziierten Fibroblasten, spezifischen ECM-Komponenten, Zellen des Immunsystems und neu gebildeten Blut- und Lymphgefäßen [Müller und Fusenig, 2004]. Um die unterstützende Mikroumgebung zu erzeugen, sezernieren Tumorzellen verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine wie beispielsweise PDGF und TGFβ. Diese Wachstumsfaktoren sind wichtige Mediatoren der Wundheilung und unterbinden die normale Homöostase des Gewebes [Balkwill und Mantovani, 2001]. Mit ihrer Ausschüttung simuliert der Tumor also das Vorhandensein einer Verletzung und erzeugt so das reaktive Tumorstroma.

TGF $\beta$  induziert beispielsweise die Chemotaxis und Differenzierung von Fibroblasten, die, wie bei der Wundheilung auch, in den Tumorherd einwandern und sich dort zu Myofibroblasten differenzieren. Die Rolle der Myofibroblasten, die auch als Tumor-assoziierte Fibroblasten bezeichnet werden, ist in Bezug auf die Krebsprogression zwar noch nicht vollständig geklärt, aktuelle Ergebnisse unterstreichen jedoch ihre Bedeutung für die Tumorinvasion und Progression [Kalluri und Zeisberg, 2006].

Auch die von Rudolf Virchow beschriebene Präsenz von inflammatorischen Zellen hat einen Einfluss auf die Tumorzellen. Tumorzellen sezernieren häufig inflammatorische Zytokine, die hämatopoetische Zellen, wie etwa Lymphozyten, Makrophagen und Neutrophile, in die Umgebung des Tumors rekrutieren. Für invadierte natürliche Killerzellen (NCK-Zellen) wird eine den Tumor unterdrückende Wirkung angenommen [Albertsson et al., 2003]. Der überwiegende Teil der inflammatorischen Zellen unterstützt jedoch die Progression des Tumors. Neben der Produktion verschiedener Wachstumsfaktoren ist hierbei die Manipulation der ECM von herausragender Bedeutung. Die Immunzellen exprimieren verschiedene Proteasen, wie zum Beispiel MMPs oder uPA, die den Umbau der ECM und den Abbau der Basalmembran unterstützen und zur Freisetzung von in der ECM fixierten Wachstumsfaktoren führen [Müller und Fusenig, 2004]. Sowohl die inflammatorischen Zellen als auch die Myofibroblasten und Tumorzellen sezernieren Wachstumsfaktoren, die die Bildung neuer Blutgefäße induzieren – zum Beispiel durch die Freisetzung von bFGF, VEGF und TGF $\alpha$ . Wie bereits zuvor beschrieben, ist die Angiogenese ein essentieller Vorgang bei der Entstehung und Progression einer Krebserkrankung sowie beim Verheilen einer Wunde.

Trotz aller Übereinstimmungen zwischen Tumor-induzierter Stromabildung und Wundheilung gibt es auch nicht unerhebliche Unterschiede zwischen beiden Prozessen. Beispielsweise sind Thrombozyten nicht nur an der Bildung des Granulationsgewebes beteiligt, sondern auch in der späten Phase der Wundheilung als Produzenten des Wachstumsfaktors PDGF wirksam, der mitogen und chemoattraktiv auf Fibroblasten wirkt [Sieweke und Bissell, 1994]. Im Gegensatz hierzu lassen sich Thrombozyten in soliden Tumoren außerhalb von Blutgefäßen kaum oder gar nicht nachweisen. Stattdessen gibt es Hinweise dafür, dass die Tumorzellen selbst zumindest einige der Funktionen, die Thrombozyten zugeschrieben werden, simulieren [Blobe et al., 2000]. Der zweifelsohne wichtigste Unterschied zwischen Wundheilung und Krebs besteht aber darin, dass Wundheilungsprozesse letztlich selbst-limitierend sind. Sobald die Wunde geheilt ist, werden genetische Programme in den beteiligten Zellen wieder umgeschrieben oder deaktiviert, so dass die für die Wundheilung typischen Veränderungen abgeschaltet werden. Tumoren

hingegen fehlt ein solches Signal und es kommt somit unter anderem zur kontinuierlichen Bildung von Stroma und Neubildung von Blutgefäßen. Diese Bedingungen begünstigen ein kontinuierliches Wachstum des Tumors und resultieren in der Bildung einer Neoplasie. H. F. Dvorak schlussfolgerte deshalb, dass es sich bei Tumoren letztlich um Wunden handelt, die niemals heilen [Dvorak, 1986]. Folgerichtig vermutet man schon seit einiger Zeit, dass Gene oder genetische Programme, die Wundheilungsprozesse steuern, auch von großer Bedeutung für die Krebsprogression sein müssten. Erst kürzlich gelang die Identifizierung eines Transkriptionsfaktors, der vielfältige Prozesse der Wundheilung reguliert und somit möglicherweise als zentrales Regulationsgen der Wundheilung fungiert. Dieser Transkriptionsfaktor ist ein Mitglied der grainyhead-Genfamilie [Ting et al., 2005].

# **1.3.** Die Grainyhead-Genfamilie von Transkriptionsfaktoren

Mit Hilfe einer 1984 durchgeführten genetischen Analyse zur Identifizierung von Genen, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Taufliege *Drosophila melanogaster* spielen könnten, wurden zahlreiche Mutanten isoliert, die Defekte in ihrer apikalen extrazellulären Oberflächenbarriere (Kutikula) aufwiesen [Nüsslein-Volhard et al., 1984]. Eine solche Mutante, bei der das Grainyhead-Gen (grh-Gen) betroffen war, zeichnete sich durch eine lose embryonale Kutikula und ein diskontinuierliches und granuläres Kopfskelett aus. Das grh-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der ursprünglich Elf-1/NTF genannt wurde. Es nimmt essentielle regulatorische Funktionen während der Embryonalentwicklung wahr [Bray und Kafatos, 1991].

Transkriptionsfaktoren sind DNA-bindene Proteine, die die Transkription von anderen Genen regulieren. Sie werden aufgrund von Homologien und Strukturmotiven bestimmten Proteinfamilien zugeordnet. Das erste identifizierte Mitglied der Grainyhead-Proteinfamilie war der Transkriptionsfaktor CP2, der zunächst als transkriptioneller Aktivator des SV40- und HI-Viruses beschrieben wurde [Garcia et al., 1987; Huang et al., 1990]. Bei nachfolgenden Analysen konnten weitere regulierende Funktionen nachgewiesen werden – zum Beispiel in der Embryonalentwicklung und T-Zell-Proliferation [Sueyoshi et al., 1995; Jane et al., 1995]. Die Proteine der Grainyhead-Familie konnten in so unterschiedlichen tierischen Organismen wie Nematoden und Menschen nachgewiesen werden, sind aber in unizellulären Organismen nicht anzutreffen [Kudryavtseva et al., 2003; Tao et al., 2005; Ting et al., 2003; Uv et al., 1997; Venkatesan et al., 2003; Wilanowski et al., 2002]. Während Fliegen und Würmer nur ein einzelnes grh-Gen besitzen, weist das Genom von Wirbeltieren drei "grh-like"-Gene (GRHL1-3) auf, von denen man annimmt, dass sie während der Embryogenese selektiv in

sich vom Ektoderm ableitenden Epithelien exprimiert sind [Kudryavtseva et al., 2003; Tao et al., 2005; Ting et al., 2003; Uv et al., 1997; Venkatesan et al., 2003; Wilanowski et al., 2002]. Auch das CP2-Gen kommt in niederen Organismen nur einmal vor, während Wirbeltiere noch zwei weitere Homologe dieses Gens besitzen, die als LBP-1a und LBP-9 bezeichnet werden [Wilanowski et al., 2002].

Gen-Name*	HGNC**	Synonyme	Genebank-Nr.	Referenz
Humane homologe Gene des Drosophila-Gens dCP2				
CP2	TFCP2	LBP-1c, LSF	NM_005653	[Swendeman et al., 1994]
UBP-1	TFCP2A	LBP-1a	NM_014517.3	[Huang et al., 2000]
LBP-9	TFCP2L1	CRTR1	NM_014553	[Rodda et al., 2001]
Humane homologe Gene des Drosophila-Gens grh				
GRHL1	TFCP2L2	MGR	NM_014552.2	[Wilanowski et al., 2002]
GRHL2	TFCP2L3	BOM	NM_024915	[Wilanowski et al., 2002]
GRHL3	TFCP2L4	SOM. Get-1	NM_021180.2	[Ting et al., 2003]

Tab. 1: Mitglieder und Nomenklatur der humanen Grainyhead-Transkriptionsfaktor-Familie

\* Genbezeichnung in der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.gov)

\*\* Genbezeichnung nach HUGO-Gene-Nomencluture-Committee (www.genenames.org)

Man beobachtet jedoch einen hohen Grad der Konservierung der Grainyhead-Gene zwischen verschiedenen Organismen. Dies bildet die Grundlage für die Hypothese, dass unterschiedliche Mitglieder der Grainyhead-Genfamilie eine evolutionär hoch konservierte Funktion bei der Differenzierung von Epithelzellen spielen könnten.

Zwei zeitgleich publizierte Arbeiten weisen darauf hin, dass grainyhead-Proteine wahrscheinlich eine herausragende Bedeutung für Wundheilungsprozesse haben, indem sie als zentrale Regulatoren der Expression einer Vielzahl von Zielgenen ein ganzes genetisches Wundheilungsprogramm orchestrieren [Mace et al., 2005; Ting et al., 2005]. So untersuchten Mace und Mitarbeiter [Mace et al., 2005] eine Fliegenmutante, bei der Risse und Brüche der abschirmenden Kutikulahülle sehr schlecht verheilten, und konnten mit Hilfe dieses Modellsystems und durch eine Vielzahl molekularer Untersuchungen ein Gen identifizieren, das essentiell für eine vollständige Wundheilung war. Dieses Gen kodiert für den Grainyhead-(grh)-Transkriptionsfaktor, der die epidermale Expression eines Schlüsselmoleküls der Wundheilung, nämlich der Dopadecarboxylase (Ddc), reguliert. Die wesentliche Aufgabe der Dopadecarboxylase (Ddc) besteht darin, Chinon- und kutikuläre Eiweißverbindungen neuer

Chitinpanzer-Flicken querzuvernetzen und somit den Wundheilungsprozess durch Bildung der epidermalen Barriere zum Abschluss zu bringen [Wright, 1987]. Interessanterweise konnten auch Hinweise auf eine bedeutende Rolle der Grainyhead-Proteine bei der Wundheilung im Säugetierorganismus erhalten werden. So gelang Ting und Mitarbeitern [Ting et al., 2005] der Nachweis, dass das GRHL3 für die Bildung der epidermalen Barriere während der Mausembryogenese absolut notwendig ist. Versuche, die molekularen Grundlagen dieses Wundheilungsdefekts näher zu ergründen, mündeten schließlich in der Identifizierung eines Zielgens, dessen Expression durch GRHL3 reguliert wird. Bei diesem Gen handelt es sich um die Transglutaminase 1 (TGase1) [Ting et al., 2005], ein Enzym, das ebenfalls eine quervernetzende Funktion besitzt und Komponenten des Stratum corneum (SC), also der äußersten Schicht der Epidermis, miteinander verbindet und somit für die Bildung und Reifung der Epidermis unerlässlich ist [Inada et al., 2000].

Aus diesen beiden Untersuchungen geht hervor, dass das Grainyhead-Protein der Taufliege und das GRHL3 der Maus Regulatoren der Wundheilung darstellen, die sich über rund 700 Millionen Evolutionsjahre hinweg bewährt haben. Obwohl sie letztlich die Expression völlig unterschiedlicher Proteine regulieren, die aber beide quervernetzende Funktionen besitzen (Ddc und TGase1), ist doch erkennbar, dass das biologische Grundprinzip der Wundheilung offensichtlich evolutionär erhalten geblieben ist. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass die Grainyhead-Transkriptionsfaktoren nicht nur die Expression der bereits genannten, sondern auch einer Vielzahl anderer Gene steuern, die zur Integrität von Epithelien beitragen. Angesichts der zuvor beschriebenen Ähnlichkeiten von Wundheilung und Krebs könnten die Grainyhead-Proteine möglicherweise bedeutsam für die Krebsentstehung sein.

In der Tat konnten im Rahmen dieses Promotionsvorhabens Indizien dafür gewonnen werden, dass ein Mitglied der Grainyhead-Genfamilie, nämlich das GRHL2-Genprodukt, bei der Karzinogenese eine wichtige Rolle spielen könnte.

# 1.4. Fragestellung

Vorrangiges Ziel dieses Promotionsvorhabens war es, neue Gene zu identifizieren, die an der Entstehung oder Progression des humanen Mammakarzinoms beteiligt sein könnten. Hierzu sollte zunächst ein bereits in der Arbeitsgruppe etabliertes Verfahren zur Identifizierung von Proto-Onkogenen, das als sogenannte "Retrovirus-vermittelte cDNA-Expressionsklonierung von Proto-Onkogenen" bezeichnet werden kann, weiter entwickelt und durchgeführt werden. Eines der mit Hilfe dieses experimentellen Ansatzes identifizierten Kandidatengene sollte anschließend durch die Durchführung von Transformations-Assays in Hinblick auf seine transformierenden Eigenschaften untersucht werden. Ferner sollten spezifische Antikörper gegen das entsprechende Genprodukt generiert werden, mit denen dann die Expression und subzelluläre Lokalisation des betreffenden Proteins in kultivierten Mammakarzinom-Zellen und auch Mammakarzinom-Geweben untersucht werden sollte. Anschließend sollte durch Überexpression des Kandidatengens in defizienten Mammakarzinom-Zellinien ein Modellsystem generiert werden, das es ermöglicht, den Einfluss des identifizierten Proto-Onkogens auf die Zellproliferation, Adhäsion, Migration, Invasion und auch das Metastasierungsverhalten der Tumorzellen zu studieren. Diese funktionellen Studien und auch die Expressionsanalysen sollten letztlich dazu beitragen, die mögliche Rolle des neu identifizierten Proto-Onkogens in der Karzinogenese zu ermitteln. Langfristiges Ziel dieses Promotionsvorhabens ist es, herauszufinden, ob das identifizierte Proto-Onkogen eine mögliche Zielstruktur für einen neuartigen Therapieansatz zur Behandlung von Krebspatienten darstellen könnte.

# 2. Material und Methoden

# 2.1. Material

Eine vollständige Aufzählung der verwendeten Geräte, Antikörper und Oligonukleotid-Primer befindet sich in tabellarischer Form im Anhang der Arbeit.

# 2.1.1. Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen.

# 2.1.2. Häufig verwendete Lösungen

<u>PBS:</u>	
137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
4,3 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O (pH 7,3)
1,4 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<u>TBS:</u>	
137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
50 mM	Tris/HCl (pH 8,0)

# 2.1.3. Zellkulturen und Kulturmedien

Die Tab. 2 zeigt die Zusammensetzung der in dieser Arbeit zur Zellkultur verwendeten Kulturmedien.

Tab. 2: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien

	Kulturmedium 1	Kulturmedium 2
Standard-Medium (Invitrogen Karlsruhe)	90 % (v/v) DMEM	90 % (v/v) RPMI
FCS	10 % (v/v)	10 % (v/v)
(PAA GmbH, Pasching) Glutamin	2 mM	2 mM
(Invitrogen, Karlsruhe)		
Bemerkungen		Fur 1-4/D und B1-4/4 mit $10 \ \mu g/ml$ Insulin supplementiert

Die Tab. 3 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und deren Herkunft, sowie die für die Kultivierung verwendeten Medien. Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich um humane Zellen. Die einzige Ausnahme stellen die murinen NIH3T3-Fibroblasten dar.

Zelllinie	Tumorart	Ursprungsgewebe	Kulturmedium
BT-20 <sup>5)</sup>	duktales Mammakarzinom	Primärtumor	1
BT-474 <sup>5)</sup>	duktales Mammakarzinom	Primärtumor	2
GI-101 <sup>3)</sup>	duktales Mammakarzinom	lokales Rezidiv	1
MCF-7 <sup>2)</sup>	duktales Mammakarzinom	Pleuraeffusion	1
MDA-MB-231 <sup>1)</sup>	Adenokarzinom der Brust	Pleuraeffusion	1
MDA-MB-435S <sup>2)</sup>	duktales Mammakarzinom	Pleuraeffusion	1
MDA-MB-468 <sup>2)</sup>	Adenokarzinom der Brust	Pleuraeffusion	1
SK-BR-3 <sup>2)</sup>	Adenokarzinom der Brust	Pleuraeffusion	2
T-47D <sup>5)</sup>	duktales Mammakarzinom	Pleuraeffusion	2
ZR-75-1 <sup>2)</sup>	duktales Mammakarzinom	Aszites	1
NIH3T3 <sup>2)</sup>	-	embryonale Fibroblasten	1
ψNX-eco <sup>1)</sup>	-	embryonale Nierenzellen	1

<sup>1)</sup>erhalten von American Type Culture Collection (ATCC), Manassas; <sup>2)</sup>erhalten aus der Zellkulturbank des ICRF Laboratory, St Thomas' Hospital, London, UK; <sup>3)</sup>erhalten von Dr. J. Hurst, Goodwin Institut for Cancer Research, Plantation, Florida, USA; <sup>4)</sup>erhalten von Cell Culture Services (CCS), Heidelberg

# 2.2. Zellkulturmethoden

# 2.2.1. Standardkulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden in sterilen Kulturgefäßen der Firmen Falcon (Heidelberg) und Nunc (Wiesbaden) kultiviert. Tab. 4 gibt eine Übersicht über die verwendeten Kulturgefäße und die verwendeten Volumina der Kulturmedien. Die Kultivierung erfolgte in Hera150-Brutschränken (Kendro, Langenselbold) bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre und 5 % CO<sub>2</sub> für Zellen in Medium 1 bzw. 10 % CO<sub>2</sub> für Zellen in Medium 2. Die Zelllinien wurden zweimal wöchentlich unter sterilen Bedingungen passagiert. Hierzu wurden die adhärent wachsenden Zellen mit PBS bei 37°C gewaschen und anschließend mit 0.05 %iger Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) von der Kulturschale abgelöst. Der Vorgang wurde durch Zugabe von vorgewärmtem Medium abgestoppt und die resuspendierten Zellen dann in einer Dichte von 10-20 % ausgesät.

Kulturschalen	Einheit	Mediumvolumen	Hersteller
96-Loch-Platte	$0,2 \text{ cm}^2$	0,15 ml	Falcon
24-Loch-Platte	$1,9 \text{ cm}^2$	1 ml	Falcon
6-Loch-Platte	$9,4 \text{ cm}^2$	2,5 ml	Falcon
10-cm-Zellkulturschale	78 cm <sup>2</sup>	15 ml	Falcon
T25-Zellkulturflasche	25 cm <sup>2</sup>	5 ml	Nunc
T75-Zellkulturflasche	$75 \text{ cm}^2$	15 ml	Nunc

Tab. 4: Verwendete Zellkulturgefäße mit Volumina

# 2.2.2. Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen können durch Einfrieren in flüssigen Stickstoff bei -196°C für längere Zeit gelagert und nach dem Auftauen wieder in Kultur genommen werden. Um die Bildung von Eiskristallen in den Zellen zu verhindern, wird den Zellen durch Zugabe des stark hygroskopischen Dimethylsulfoxids (DMSO) langsam das Wasser entzogen. Mindestens 2 x  $10^6$  Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium (10 % (v/v) DMSO, 90 % (v/v) Vollmedium) resuspendiert, in Kryo-Röhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt und auf -80°C gekühlt. Für das Einfrieren und die Kryolagerung von  $\psi$ NX-eco-Zellen wurde ein anderes Einfriermedium verwendet (10% (v/v) DMSO, 90% FCS). Nach 24 h wurden die Kryo-Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt. Um die kryokonservierten Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Zellen nach dem Auftauen (37°C; Wasserbad) mit Vollmedium gewaschen, um das toxische DMSO zu entfernen. Die im Vollmedium resuspendierten Zellen wurden in T25-Zellkulturflasche ausgesät.

# 2.2.3. Mycoplasmen-Test

Um eine mögliche Kontamination der verwendeten Zelllinien mit Mycoplasmen zu detektieren, wurden die kultivierten Zellen in regelmäßigen Abständen einem Mycoplasmentest unterzogen. Hierfür wurde der Venor<sup>®</sup> GeM Kit (Minerva Biolabs, Berlin) verwendet. Der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, allerdings wurde das Reaktionsvolumen bei allen Ansätzen halbiert.

# 2.2.4. Transfektion eukaryontischer Zellen mit kationischen Lipiden

Für die Transfektionen wurden je nach Zelllinie unterschiedliche Transfektions-Reagenzien verwendet. Für die Zelllinien NIH3T3, MCF-7 und MDA-MB-468 wurde Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 (Invitrogen, Karlsruhe) und für die Zelllinie wNX-eco wurde Effectene (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Transfektions-Reagenzien gehören zur Gruppe der kationischen Liposom-Reagenzien, die im Komplex mit DNA an die negativ geladenen Oberflächenstrukturen der Zellen binden. Anschließend erfolgt die endosomale Aufnahme der DNA in die Zelle. Wurde eine transiente Transfektion durchgeführt, so wurden aus den Zellen 48 Stunden nach der Transfektion Proteinlysate hergestellt und die Expression des Transgens mittels Western-Blot-Analyse (siehe 2.4.3.) überprüft. Für die Herstellung stabil transfizierter Zelllinien wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion trypsiniert und je nach Dichte in einem Verhältnis von 1:15 oder 1:30 in 10 cm-Kulturschalen ausplattiert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Geneticin (G-418, 500 µg/ml, Calbiochem, Darmstadt) selektioniert. Zur Gewinnung von klonalen stabilen Zelllinien wurden etwa zehn Tage nach Beginn der Selektion einzelne Zellklone isoliert. Hierzu wurde ein kleines, steriles, mit Trypsin/EDTA-benetztes Filterpapier auf den Zellklon positioniert. Nach zehnminütiger Inkubation wurde das Filterpapier mitsamt anhaftenden Zellen in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte überführt. Die Klone wurden expandiert und anschließend kryo-konserviert. Die Expression des Zielproteins in den Zelllinien wurde mittels Western Blot (siehe 2.4.3.) untersucht.

# 2.2.4.1. Transfektion eukaryontischer Zellen mit Lipofectamine 2000<sup>TM</sup>

Bei einer Transfektion mit Lipofectamine 2000<sup>TM</sup> wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion in einer T25-Zellkulturflasche ausgesät, so dass sie am Tag der Durchführung eine Zelldichte von 80-90% hatten. Zur Durchführung der Transfektion wurden 8 µg Plasmid-DNA mit 500 µl serumfreiem Medium gemischt. In einem zweiten Ansatz wurden 20 µl Lipofectamin<sup>TM</sup>2000-Transfektionsreagenz mit 500 µl serumfreiem Medium gemischt. Die Ansätze wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann vereinigt. Die so erhaltene Lösung wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und zu den Zellen gegeben. Nach 6 h wurde das Transfektions-Gemisch durch Medium substituiert.

# 2.2.4.2. Transfektion eukaryontischer Zellen mit Effectene<sup>TM</sup>

Bei einer Transfektion mit Effectene<sup>TM</sup> wurden die Zellen so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion in einer T25-Flasche eine Konfluenz von 50-80% erreicht hatten. Für die Transfektion wurden zunächst die Transfektionkomplexe hergestellt. Hierfür wurden 4  $\mu g$ 

Plasmid-DNA in einem sterilen Eppendorfgefäß vorgelegt und 150 µl EC-Puffer hinzugefügt. 32 µl Enhancer wurden anschließend hinzugefügt und mit der Pipette vermischt. Die Lösung wurde 5 min bei RT inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 40 µl Effectene (Qiagen, Hilden). Es wurde gemischt und die Lösung weitere 10 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die zu transfizierenden Zellen einmalig mit PBS gewaschen und mit 4 ml Medium versehen. Nach der zehnminütigen Inkubation wurde das Transfektions-Gemisch mit 1 ml Medium versetzt und mit einer sterilen Pasteur-Pipette vorsichtig auf die Zellen getropft. Nach 6 h wurde das Transfektions-Gemisch durch Medium substituiert.

# 2.2.5. Gentransfer mit Hilfe retroviraler Vektoren

Für die Herstellung retroviraler Überstände wurden  $\psi$ NX-eco Zellen unter Verwendung des Effectene-Transfektionsreagenz transient transfiziert (siehe 2.2.4.2.). Zwei Tage nach der Transfektion wurde der Zellkulturüberstand, der die viralen Partikel enthält, abgenommen und in ein 15 ml Falcon Reaktionsgefäß überführt. Zelltrümmer und Zellen wurden 5 min bei 500 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde nun mit einem Nitrozellulosefilter (Millipore, Bedford, USA) mit einer Ausschlußgröße von 0.45 µm steril filtriert. Wurde der virale Überstand nicht umgehend zur Infektion von Zielzellen verwendet, erfolgte eine Lagerung bei -80°C. Am Tag vor der Infektion wurden  $2x10^5$  NIH3T3-Zellen in einer T25-Zellkulturflasche oder einer 6-cm-Zellkulturschale ausgesät. Zur Herstellung des Infektionsgemisches wurde 1 ml des retroviralen Überstandes in einem 15-ml-Reaktionsgefäß-Gefäß vorgelegt. Nun wurden 2 µl einer 1000fachen Polybrene-Lösung und 1 ml DMEM-Medium hinzu gegegeben. Dieser Cocktail wurde nun tropfenweise auf die zuvor mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit dem Cocktail 6-8 Stunden oder über Nacht inkubiert. Danach wurde der Cocktail durch Medium ersetzt. Die Expression des Transgens wurde nach 36 bis 48 Stunden untersucht.

#### 2.2.6. Bestimmung der Zellproliferationsrate

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurde zunächst eine Einzelzellsuspension, der zu untersuchenden Zelllinie hergestellt. Jeweils  $5x10^4$  Zellen wurden in einem Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät. Für jeden Messpunkt wurden Zellen im Triplikat ausgesät. Die Messpunkte wurden nach 2, 4 und 6 Tagen genommen. Zur Zählung wurden die Zellen bis zum Erreichen einer Einzelzellsuspension trypsiniert. Anschließend wurden die Zellen in einem adäquaten Volumen aufgenommen und anschließend in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Aus den Daten wurde eine Wachstumskurve erstellt und die Generationszeit anhand des Kurvenverlaufs errechnet.

# 2.2.7. Fokus-Assay

Für die Durchführung des Fokus-Assays wurden NIH3T3-Zellen mit retroviralem Überstand infiziert (siehe 2.2.5.). Es wurden 5x10<sup>5</sup> Zellen in einer 10-cm-Kulturschale ausgesät. Nachdem die infizierten Zellen 100% ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie für 2 weitere Wochen kultiviert, während dieser Zeit wurde zweimal wöchentlich das Zellkulturmedium gewechselt. Zur Beurteilung der transformierten Morphologie wurden die transformierten NIH3T3-Zellen bei 40 facher Vergrößerung im Lichtmikroskop mit der parentalen Zelllinie verglichen.

# 2.2.8. Soft-Agar-Assay

Zur Bestätigung des Verankerungs-unabhängigen Wachstums transformierter NIH3T3-Zellen wurden Soft-Agar-Assays durchgeführt. Zunächst wurde der Agar-Boden hergestellt. In einem 50 ml Reaktionsgefäß wurden 5 g Bacto<sup>TM</sup> Agar Noble (BD Biosciences, Heidelberg) unter semisterilen Bedingungen in 50 ml H<sub>2</sub>O gegeben. Der Agar wurde in einem Wasserbad 30 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde der gelöste Agar in ein Wasserbad mit 45°C gestellt und abgekühlt. Nun wurde eine 0.5% ige Agarlösung hergestellt. Hierzu wurden jeweils 5 ml der 5% igen Agar-Stammlösung mit 45 ml DMEM-Medium, welches zuvor auch auf 45°C erwärmt wurde, gründlich vermischt. Jeweils 7 ml dieser noch warmen Lösung wurden in 6-cm-Kulturschallen pipettiert. Die restliche Lösung wurde weiterhin auf 45°C gehalten. Der Agarboden wurde zur Polymerisierung 60 min bei RT inkubiert. Von den zu untersuchenden Zellen wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt.  $4x10^4$  Zellen dieser Suspension wurden in 2 ml Medium aufgenommen und mit 4 ml der 0.5% igen Agar-Lösung vermischt. Jeweils 1.5 ml dieser Zellsuspension wurde nun auf den Agar-Boden gegeben. Zur Polymerisierung des Agars wurden die Kulturschalen für 30 min bei RT inkubiert. Ein- bis zweimal in der Woche wurde 1 ml Medium auf die Zellen gegeben. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte 21 Tage nach Versuchsbeginn.

# 2.2.9. Implantation von Zellen in immundefiziente Mäuse

Die Tierversuche wurden unter der Nummer 29/07 vom Hamburger Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt und in Kooperation mit dem Institut für Anatomie II des Universitäts-Klinikums Eppendorf durchgeführt. Die zu implantierenden Zellen wurden wie unter 2.2.2. beschrieben in Kultur genommen und zweimal vor der Implantation passagiert. Am Tag der Implantation wurde aus den kultivierten Zellen eine Einzelzellsuspension in serumfreiem Medium hergestellt. Die Zellzahl dieser Suspension wurde auf  $5 \times 10^6$  Zellen pro

ml eingestellt. Die Zellen wurden bis zur Implantation auf Eis gestellt. Die Implantation von  $1 \times 10^6$  Zellen erfolgte subkutan zwischen die Schulterblätter der Mäuse. Für den Versuch wurden weibliche Nacktmäuse (Stamm: NMRI) verwendet, die bei Versuchsbeginn sieben Wochen alt waren. Die Begutachtung der Mäuse erfolgte dreimal wöchentlich. Als Tag des beginnenden Tumorwachstums wurde der Tag definiert, an dem die Tumoren erstmals äußerlich sichtbar waren. Die Terminierung der Mäuse erfolgte bei einer Tumorgröße von  $1 \text{ cm}^3$ . Nach 12 Wochen wurde der Versuch eingestellt und alle verbleibenden Tiere getötet. Alle Mäuse wurden vor ihrer Tötung in CO<sub>2</sub>-haltiger Atmosphäre betäubt und durch Genickbruch getötet.

# 2.3. Molekularbiologische Methoden

#### 2.3.1. Kultur von *E. coli*

Für die Transformationsexperimente und zur Vermehrung von Plasmiden wurden die *E. coli* Bakterienstämme DH5α und TOP10F' (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

LB-Medium:		
1 % (w/v)	Bacto-Trypton (BD Biosciences, Heidelberg)	
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt (BD Biosciences, Heidelberg)	
1 % (w/v)	NaCl	
pH (7,5)		
Ampicillin (Sigma-Aldrich, München):		
Stammlösung: 50 mg/ml in H <sub>2</sub> O		
Endkonzentration: 100 µg/ml		
Kanamycin (Roth, Karlsruhe):		
Stammlösung: 25 mg/ml in H <sub>2</sub> O		

Für feste Nährböden wurde dem LB-Medium 1,5 % (w/v) Bacto-Agar (BD Biosciences, Heidelberg) zugefügt. Das LB-Medium wurde autoklaviert und die Antibiotika-Lösung wurden - je nach Selektionsgen - dem Mediun nach Abkühlen auf 56°C zugesetzt. Mit Antibiotika versetzte LB-Platten wurden bis zu 4 Wochen im Kühlraum gelagert. Zur Vermehrung von *E. coli* wurde eine 5 ml Vorkultur (LB-Medium) mit einer Einzelkolonie von einer LB-Platte beimpft. Die Anzucht der Bakterien erfolgt in einem Inkubationsschüttler bei 37°C und 220 min<sup>-1</sup>.

Endkonzentration: 25 µg/ml

# 2.3.2. Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden 5 ml LB-Medium mit *E. coli* DH5 $\alpha$  inokuliert und über Nacht im Inkubationsschüttler bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden mit diesem Ansatz 100 ml LB-Medium für eine erneute Übernachtkultur angeimpft. Die Bakterien wurden bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,6 bis 0,8 kultiviert, dann sedimentiert (6000 x g; 10 min; 4°C), der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 40 ml eiskalter Lösung 1 (30 mM Kaliumacetat; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 100 mM KCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 15 % (w/v) Glycerol; pH 5,8) resuspendiert. Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurde erneut sedimentiert (6000 x g; 10 min; 4°C) und das Pellet in 4 ml Lösung 2 (10 mM Na-MOPS; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM KCl; 15 % (w/v) Glycerol; pH 7) resuspendiert. Die kompetenten Bakterien wurden aliquotiert (á 50 µl) und bei -80°C gelagert.

# 2.3.3. Transformation von Bakterien

50 µl transformationskompetente Bakterien wurden zum Auftauen 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in TE-Puffer zugegeben (< 0,1 µg/50 µl Bakterien) und die Zellsuspension weitere 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 30 sec auf 42°C erwärmt und sofort für 2 min auf Eis inkubiert. Zur Regeneration wurden 450 µl LB-Medium zugesetzt. Nach einer Inkubation von 60 min bei 37°C und 220 min<sup>-1</sup> im Inkubationsschüttler wurden die transformierten Bakterien in unterschiedlichen Verdünnungen auf Antibiotika enthaltene LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

# 2.3.4. Plasmid-Präparation im analytischen Maßstab

5 ml LB-Medium plus Antibiotikum wurden mit einer Kolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Zur Präparation der DNA wurde 1 ml der Übernacht-Bakterienkultur mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben aufgearbeitet. Die Elution der DNA erfolgte in 50 μl Elutionspuffer. Der DNA-Gehalt und die DNA-Reinheit der DNA wurden bestimmt (siehe 2.3.6.). Die DNA wurde durch Restriktionsverdau (siehe 2.3.7.) charakterisiert oder bei -20°C gelagert.

# 2.3.5. Plasmid-Präparation im präparativen Maßstab

100 ml LB-Medium plus Antibiotikum wurden mit 10 µl einer Übernachtkultur beimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde dann mit dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die gewonnene DNA wurde in 200 µl TE aufgenommen. Der DNA-Gehalt und die DNA-Reinheit wurden bestimmt (siehe 2.3.6.). Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

# 2.3.6. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Die Reinheit und die Konzentration der DNA wurden durch Messungen der optischen Dichte bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) und bei 280 nm ( $OD_{280}$ ) im Photometer (Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Hierbei gilt, dass eine  $OD_{260}$  von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht. Der Reinheitsgrad der untersuchten Proben lässt sich über die Ermittlung des Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  beurteilen. Es wurden nur solche Plasmidpräparationen verwendet, deren Quotient mindestens 1,8 betrug.

# 2.3.7. Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Reaktionspuffer wurden von der Firma New England BioLabs (Frankfurt a. M.) bezogen. Restriktionsspaltungen wurden bei 37°C für 2-14 h durchgeführt. Die DNA-Konzentration im Ansatz überstieg hierbei nicht 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l. Das Enzym wurde in leichtem Überschuss (3-5 U/ $\mu$ g DNA) eingesetzt, wobei eine Glycerolkonzentration von 5% im Ansatz nicht überschritten wurde.

# 2.3.8. Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Eine Behandlung der DNA mit alkalischer Phosphatase verhindert die Eigenligation der gespaltenen Plasmid-DNA durch die Entfernung der terminalen 5'-Phosphatgruppen. Nach Restriktionsverdau von 2  $\mu$ g Vektor-DNA wurden zu dem 60  $\mu$ l Reaktionsansatz 1,5  $\mu$ l Antarctic Phosphatase (5 U/ $\mu$ l; New England BioLabs; Frankfurt a. M.) und 6,8  $\mu$ l 10 x Antarctic Phosphatase-Reaktionspuffer zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert, danach wurden weitere 1,5  $\mu$ l Phosphatase zugesetzt und die Inkubation für weitere 30 min fortgesetzt. Nach Zusatz 1/10 Volumens DNA-Probenpuffer wurde die Vektor-DNA elektrophoretisch in Agarosegelen aufgetrennt (siehe 2.3.8.) und anschließend aus dem Gel isoliert (siehe 2.3.9.). Bei einer gerichteten Klonierung mit zwei verschiedenen Restiktionsenzymen wurde auf eine Dephosphorylierung verzichtet.

# 2.3.9. Gelelektrophoretische Analyse von Nukleinsäuren

TAE-Puffer:	
40 mM	Tris/Acetat (pH 8,3)
1 mM	EDTA
1 % (v/v)	Eisessig

DNA-Probennuffe	r۰
DINA-I IOUCIIPUIIC	L.

50 % (v/v)	Glycerol
1 mM	EDTA (pH 8,0)
0,4 % (w/v)	Bromphenolblau
0,4 % (w/v)	Xylencyanol

Agarose-Gelelektrophorese von DNA für analytische und präparative Zwecke erfolgte in horizontalen Elektrophoreseapparaturen. Die Agarose wurde in TAE-Puffer (Standard 1% (w/v) Agarose) in der Mikrowelle geschmolzen, mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in die Gelapparatur gegossen. Nach dem Entfernen des Kamms und wurde das Gel mit TAE-Laufpuffer überschichtet. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen geladen. Zur Abschätzung der Molekulargröße wurde ein Molekulargewichts-Marker (Bioline, London) verwendet. Im Anschluss die an elektrophoretische Auftrennung wurde die DNA mit Hilfe eines Transilluminators analysiert. die DNA eingelagertes Ethidiumbromid Hierzu wurde in zur Fluoreszenz (Anregungswellenlänge 234 nm) angeregt und das Gel zur Dokumentation am Geldokumentations System visualisiert (Syngene, Cambridge).

# 2.3.10. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zu klonierende cDNA-Fragmente wurden nach Restriktionsverdau (siehe 2.3.7.) im Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) aus dem Gel isoliert. Dazu wurde unter UV-Licht (UV Transilluminator, Syngene, Cambridge, UK) die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß geeigneter Größe überführt und entsprechend der Herstellerangaben aufgearbeitet. Alle Zentrifugationsschritte, wurden bei maximaler Drehzahl in einer Eppendorf Zentrifuge 5417R durchgeführt. Die DNA wurde mit 30 µl EB-Puffer (10 mM Tris (pH 8,5)) eluiert und entweder direkt für die Ligation (siehe 2.3.11) verwendet oder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

# 2.3.11. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von Vektor- und Insert-DNA erfolgte in 10  $\mu$ l Reaktionsansätzen mit Hilfe der T4-DNA Ligase (New England BioLabs, Frankfurt a. M.). Das Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA betrug ungefähr 1:3. Zur Begünstigung der intermolekularen Ligationen wurden hohe DNA-Konzentrationen (100 ng/ $\mu$ l) eingesetzt. Insert- und dephosphorylierte Vektor-DNA in H<sub>2</sub>O (maximal 8  $\mu$ l) wurden mit 1  $\mu$ l T4-DNA Ligase (400 U/ $\mu$ l) und 1  $\mu$ l des

entsprechenden 10x konzentrierten Reaktionspuffers (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 10 mM Dithiothreitol, 25  $\mu$ g/ml BSA) versetzt. Zur Ligation wurde der Ansatz 16 h bei 16°C inkubiert. Die Vermehrung des Konstruktes erfolgte durch Transformation von Bakterien mit dem Ligationsansatz (siehe 2.3.3.).

#### 2.3.12. Herstellung einer cDNA-Bibliothek

Eine cDNA-Bibliothek ist die Sammlung von cDNAs, die aus der mRNA einer bestimmten Zelllinie oder eines bestimmten Gewebes hergestellt werden. Im Idealfall sind alle Transkripte des Transkriptoms in einer cDNA-Bibliothek repräsentiert. Die verschiedenen cDNAs werden in Plasmidvektoren kloniert, womit eine Propagierung in Bakterien möglich ist. Wenn ein passender experimenteller Ansatz zur Verfügung steht, lassen sich mit Hilfe einer cDNA-Bibliothek aus der Gesamtheit des Transkriptoms, Gene mit bestimmten zellulären Funktionen selektionieren.

#### 2.3.12.1. Isolierung von mRNA

Für die Isolierung von mRNA wurde das FastTrack<sup>®</sup> 2.0 Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Zur Herstellung der cDNA-Bibliothek wurde mRNA aus 8 T75-Zellkulturflaschen mit konfluenten GI-101-Zellen isoliert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mithilfe einer 23G-Kanüle geschert. Alle Schritte der Isolierung wurden bei maximaler Inkubationszeit durchgeführt. Die Aufreinigung mittels oligo(dT)-Zellulose wurde zweimal durchgeführt. Die Ausbeute der mRNA betrug nach der zweiten Aufreinigung 40 µg.

#### 2.3.12.2. Erststrangsynthese zur Herstellung einer cDNA-Bibliothek

Für die Herstellung der cDNA wurde mRNA aus der Zelllinie GI-101 benutzt, die wie unter 2.3.12.1. beschrieben isoliert wurde. Es wurden 5 µl der mRNA-Lösung (1 µg/µl) mit 2 µl Primer-Lösung (random hexamers, 50 ng/µl) gemischt und 10 min in einem Heizblock bei 70°C inkubiert. Danach wurde die Lösung sofort auf Eis gestellt, um die Bildung von Sekundärstrukturen der RNA zu verhindern. Nach drei Minuten wurde die Lösung kurz abzentrifugiert. Zu dieser Lösung wurden nun 4,0 µl Erststrangsynthese-Puffer, 2,0 µl 0,1 M DTT sowie 1 µl dNTP-Mix gegeben. Um den Fortschritt der Bibliotheksherstellung besser verfolgen zu können, wurde die cDNA während der Erststrangsynthese mit  $[\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (2,5 µCi, GE-Healthcare, Freiburg) radioaktiv markiert. Es wurde 1 µl der radioaktiven dCTP-Lösung 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Von dieser Verdünnung wurde wiederum 1 µl zur Erststrangsynthese verwendet, was einer Aktivität von 2,5 µCi entsprach. Nach gründlichem Durchmischen wurde diese Lösung 2 min bei 37°C inkubiert und mit 5 µl SuperScriptII<sup>®</sup>

Polymerase (250 U/µl, Invitrogen, Karlsruhe) versetzt. Die Erststrangsynthese erfolgte für eine Stunde bei einer Temperatur von 37°C. Zur Terminierung der Erststrangsynthese wurde das Reaktionsgefäß auf Eis gestellt.

2 μl dieser Reaktionslösung wurden abgenommen, um die Ausbeute der Erststrangsynthese zu bestimmen. Die 2 μl wurden mit 43 μl 20 mM EDTA und 5 μl tRNA-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) vermischt. Jeweils 10 μl dieser Lösung wurden auf Glasfaserfilter (GE-Healthcare, Freiburg) geträufelt. Ein Filter wurde an der Luft getrocknet. Der andere Filter wurde dreimal für 5 min in einem Becherglas mit jeweils 50 ml kalter 10% iger TCA-Lösung inkubiert und anschließend 2 min mit 95% igen Ethanol gewaschen. Dann wurde auch dieser Filter getrocknet. Beide Filter wurden nach vollständiger Trocknung in ein Szintillationsrörchen mit 5 ml Szintillationslösung überführt und die Aktivität wurde in beiden Röhrchen mit Hilfe des "easy-count"-Programms im Szintillations-Zähler (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) bestimmt. Der ungewaschene Filter dient zur Bestimmung der spezifischen Aktivität:

Spezifische Aktivität =  $[^{cpm}/_{pmol} dCTP]$  = counts / 200

Der gewaschene Filter dient zur Bestimmung der Ausbeute:

Ausbeute [ $\mu$ g DNA] = counts x 0.066 / Spezifische Aktivität

#### 2.3.12.3. Zweitstrangsynthese

Zu den verbleibenden 18 µl der Erststrangsynthese wurden auf Eis 93 µl Wasser, 30 µl Zweitstrangsynthese-Puffer 3 µl dNTP-Mix, 1 µl E. coli DNA-Ligase (10 U/µl, Invitrogen, Karlsruhe), 4 µl E.coli DNA-Polymerase (10 U/µl, Invitrogen, Karlsruhe) sowie 1 µl RNase H (2 U/µl, Invitrogen, Karlsruhe) gegeben, gut vermischt und anschließend kurz zentrifugiert. Die Zweitstrangsynthese erfolgte für 2 h bei 16°C. Nach vollendeter DNA-Synthese wurde die Lösung mit 2  $\mu$ l T4-DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l, Invitrogen, Karlsruhe) versetzt und weitere 5 min bei 16°C inkubiert. Durch diese Enzymbehandlung wurden die freien Überhänge der cDNA aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl eiskalter 0.5 M EDTA-Lösung gestoppt. Die gesamte Reaktionslösung wurde nun in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 150 µl einer Phenol/Chloroform-Mischung gründlich durchmischt und anschließend 5 min bei maximaler Drehzahl in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem gleichen Volumen Ammoniumacetat-Lösung (7,5 M) sowie 1 ml 100% igen Ethanol (-20°C) versetzt, wodurch die DNA präzipitierte. Die Lösung wurde gründlich durchmischt und die DNA für 20 min bei maximaler Drehzahl in der Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde quantitativ entfernt, und die DNA durch zweimaliges Waschen mit 70% iger Ethanollösung

von Salzrückständen befreit. Die Waschlösung wurde quantitativ entfernt, die gereinigte DNA an der Luft getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

#### 2.3.12.4. Ligation von BstXI-Adaptoren

Bevor die gereinigte DNA in den Vektor kloniert werden konnte, mussten an die "blunt-end"-DNA Adaptoren ligiert werden. Hierzu wurde zunächst die Adapterlösung angesetzt. Die lyophilisierten *Bst*XI-Adaptoren (18 µg, Invitrogen, Karlsruhe) wurden in 18 µl Wasser gelöst (1 µg/µl). Zu der gereinigten DNA wurde nun 18 µl Wasser, 10 µl Adapter-Puffer, 10 µl Adaptor-Lösung, 7 µl 0.1 M DTT-Lösung und 5 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl, Invitrogen, Karlsruhe) gegeben. Die Reaktionslösung wurde gründlich durchmischt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurde die DNA-Ligase für 10 min bei 70°C inaktiviert. Danach wurde die Lösung auf Eis gestellt. Nun wurden 3 µl T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl, Invitrogen, Karlsruhe) in den Ansatz gegeben, um die DNA zu phosphorylieren. Es wurde gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch nochmals für 10 min auf 70°C im Heizblock erhitzt.

# 2.3.12.5. Größenfraktionierung und Ligation der cDNA

Um zu verhindern, dass zu kleine cDNA-Fragmente in den Vektor kloniert werden, wurden die synthetisierten cDNA-Fragemente nach ihrer Größe chromatographisch aufgetrennt. Zur chromatographischen Trennung der cDNA wurden "Size Fractionation Columns" der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Zunächst wurde die Säule in ein Stativ gespannt, dann der obere und zuletzt der untere Verschluss entfernt. Nachdem die Lagerungslösung abgeflossen war, wurde viermal hintereinander 800 µl TEN-Puffer (10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 0,1 mM EDTA, 25 mM NaCl) auf die obere Fritte gegeben, um restliche Lagerungslösung von der Säule zu waschen. Die cDNA-Lösung wurde in 97 µl TEN-Puffer aufgenommen und zentral und luftblasenfrei auf die Fritte aufgetragen. Zur Größenfraktionnierung wurden sukzessiv jeweils 100 µl TEN-Puffer auf die Säule gegeben und der Ausfluss der Säule tropfenweise, separat in Eppendorfgefäßen gesammelt. Die Fraktionen ab einem Gesamtelutionsvolumen von 600 µl enthielten nur noch sehr kleine DNA-Fragmente, so dass jenseits von 600 µl Elutionsvolumen keine weiteren Fraktionen gesammelt wurden. Für die einzelnen Fraktionen wurden jeweils die Cerenkow-Counts im "easy-count"-Programm gemessen. Angefangen mit der ersten Probe, deren Aktivität deutlich über der Hintergrundstrahlung lag, wurden anschließend drei Fraktionen vereinigt. Die erhaltene Lösung hatte ein Volumen von ca. 120 µl mit einer cDNA-Konzentration von 1 ng/µl. 112 µl der cDNA-Lösung wurden mit 8 µl BstXI-verdautem pMXs-Vektor (50 ng/µl), 32 µl Ligationspuffer und 8 µl T4-DNA-Ligase (Invitrogen, Karlsruhe) über Nacht bei 4°C inkubiert.

# 2.3.12.6. Transformation der cDNA-Bibliothek in Bakterien

Die Bakterien wurden mit Hilfe der Elektroporation transformiert, um die klonale Vielfalt der cDNA-Bibliothek zu gewährleisten. Zur Transformation wurden ElectroMAX<sup>TM</sup> DH10B<sup>TM</sup> Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Zellen wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden in Eiswasser aufgetaut und zur Durchmischung vorsichtig geschwenkt. Alle Schritte der nun folgenden Elektroporation erfolgten auf Eis. 1 µl des Ligationsansatzes wurde in einer 0,1-cm-Elektroporations-Küvette (BioRad, München) vorgelegt. Nun wurden 20 µl der kompetenten Bakterien hinzugefügt und vorsichtig mit der Pipette durchmischt. Dann wurden die Zellen, mit dem Genepulser<sup>®</sup> II (BioRad, München) bei 2.5 kV, 25 µF und 100 Ω transformiert. Nach der Transformation wurde sofort 1 ml S.O.C.-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) zu den Bakterien pipettiert und diese auf Eis gestellt. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C und 225 min<sup>-1</sup> regeneriert.

# 2.3.12.7. Amplifikation und Charakterisierung der cDNA-Bibliothek

Nach der Regeneration wurden jegliche Elektroporations-Ansätze vereinigt. Diese Lösung stellt die unamplifizierte Bibliothek dar. Für die weitere Charakterisierung der Bibliothek wurden 10 µl der Bakterienlösung in 10 ml PBS verdünnt und Doppelansätze von jeweils 100 µl bzw. 500 µl auf LB-Platten ausgestrichen. Am nächsten Morgen wurden die Klone auf den Platten ausgezählt, um so die Anzahl der unabhängigen Klone der Bibliothek zu ermitteln. Mit 40 dieser Klone wurden LB-Kulturen geimpft, die nach ausreichender Inkubation einer Plasmid-Präparation im analytischen Maßstab unterzogen wurden (siehe 2.3.4.). Zur Bestimmung der durchschnittlichen Größen der inserierten DNA, wurden die erhaltenen Plasmidpräperationen einem Restriktionsverdau (siehe 2.3.7.) und einer elektrophoretischen Analyse (siehe 2.3.9.) unterzogen. Zur Herstellung der amplifizierten Bibliothek wurden  $5 \times 10^{6}$  unabhängige Klone verwendet, was einem Volumen von 3,75 ml der unamplifizierten Bibliothek entsprach. Auf 10 cm LB-Platten wurden jeweils 37,5 µl der unamplifizierten Bibliothek ausgestrichen und über Nacht im Bakterienschrank inkubiert. Zur Ernte der Bakterien wurde etwa 1 ml LB-Medium auf die Platten pipettiert und anschließend die Bakterien mit einem Zellschaber vom Agarboden abgelöst. Die erhaltene Bakteriensuspension wurde mit den Suspensionen der anderen Platten in einem Erlenmeyer-Kolben gesammelt. Diese Lösung wurde gleichmäßig auf sechs 50-ml-Reaktionsgefäße verteilt und abzentrifugiert. Die erhaltenen Bakterienpellets wurden wie unter (siehe 2.3.5.) beschrieben
einer Plasmid-Präparation im präparativen Maßstab unterzogen. Diese Plasmid-Präparation bezeichnet man als amplifizierte Bibliothek.

## 2.3.12.8. Lagerung der retroviralen cDNA-Expressionsbibliothek

Die Konzentration der Plasmide-DNA wurde auf 2,0  $\mu$ g/ $\mu$ l eingestellt und Aliquots von jeweils 50  $\mu$ l bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die unamplifizierte Bibliothek wurde in 10% Glycerol-Lösung bei -80°C eingefroren. Die amplifizierte Bibliothek wurde abzentrifugiert und die Bakterienpellets bei -20°C eingefroren.

## 2.3.12.9. Phänotypische Selektion der cDNA-Expressionbibliothek mittels Fokus-Assay

Im Fokus-Assay werden murine, embryonale NIH3T3-Zellen als Zielzellen verwendet. Diese Zellen sind kontakt-inhibiert und präneoplastisch. Dies ermöglicht eine phänotypische Selektion von Zellen, die in Folge einer retroviralen Infektion mit einem Proto-Onkogen aus der cDNA-Bibliothek transduziert wurden. Entsprechende Zellen verlieren ihre Kontakt-Inhibition und bilden nach einiger Zeit einen Fokus auf dem Zellrasen aus.

Die retrovirale cDNA-Expressionsbibliothek wurde durch transiente Transfektion in  $\psi$ NXeco-Zellen in retrovirale Partikel konvertiert (siehe 2.2.5.). Für die Durchführung des Fokus-Assays wurden 5x10<sup>5</sup> NIH3T3-Zellen in einer 10cm-Kulturschale mit retroviralem Überstand infiziert (siehe 2.2.5.). Nachdem die infizierten Zellen 100%ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie für 2 Wochen kultiviert, dabei wurde das Medium zweimal wöchentlich erneuert. Die nun entstandenen Foci wurden mit einer 200-µl-Pipettenspitze aus dem Zellrasen entfernt und in die Vertiefung einer 96-Loch-Platte überführt. Die so gewonnenen Zellen wurden bis zum Niveau einer T25-Zellkulturflasche expandiert. Dann wurde aus diesen Zellen genomische DNA extrahiert (siehe 2.3.13.) und Kryostocks (siehe 2.2.2.) angelegt.

## 2.3.13. Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung von genomischer DNA aus Zellkulturen wurde das DNeasy<sup>®</sup> Tissue Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die genomische DNA wurde aus Zellen isoliert, die in einer T25-Zellkulturflasche eine Konfluenz von 80% bis 90% erreicht hatten. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Elution der DNA wurde zweifach in einem Volumen von 100  $\mu$ l wiederholt. Der DNA-Gehalt und die DNA-Reinheit wurden durch Messung der OD<sub>260</sub> bzw. OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> bestimmt. Die durchschnittliche Ausbeute betrug hierbei rund 100  $\mu$ g DNA.

#### 2.3.14. Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurde das TRIzol<sup>®</sup>Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Zellen wurden in einer T75-Zellkulturflasche ausgesät und bei einer Konfluenz von 80% bis 90% geerntet. Das so gewonnene Zell-Pellet wurde durch Zugabe von 2 ml TRIzol<sup>®</sup>Reagenz lysiert. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren der Suspension wurde diese auf zwei 1,5-ml-Reaktionsgefäße verteilt, und danach gut durchmischt. 500  $\mu$ l Chloroform wurden hinzugefügt und nach 2-3 min bei Raumtemperatur erfolgte eine Phasentrennung durch 15-minütige Zentrifugation bei 12000 g. Die obere wässrige Phase wurde großzügig abgenommen, um eine Kontamination aus der Interphase zu vermeiden. Die in der wässrigen Phase enthaltene RNA wurde durch Zugabe von 1 ml Isopropanol gefällt und bei 12000 g (15 min, 4°C) sedimentiert. Zum Herauslösen von residualen Salzen wurde die RNA zweimal mit je 1 ml 75% Ethanol für mindestens 30 min inkubiert. Anschließend wurde das RNA-Pellet getrocknet, wobei stets eine Übertrocknung der RNA vermieden wurde. Die RNA wurde in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O aufgenommen, die Konzentration am Photometer bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

## 2.3.15. Erststrang-cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA erfolgte mit dem SuperScript<sup>®</sup> First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Karlsruhe). Als Primer wurden Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primer verwendet, welche mit den poly(A)-Schwänzen der mRNA-Moleküle hybridisieren können. 1 µg Gesamt-RNA wurde mit 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 1 µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub> (0,5 µg/µl) in 8 µl H<sub>2</sub>0 für 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend sofort für 1 min auf Eis abgekühlt. Dann wurden 9 µl Reaktionslösung (2 µl 10 x Reaktionspuffer, 4 µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung (25 mM), 2 µl DTT-Lösung (0,1 M), 1 µl RNase Inhibitor) zugegeben. Nach Inkubation für 2 min bei 42°C wurden 50 U SuperScript II RT zugegeben. Das Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgte bei 42°C für 50 min. Die Reaktion wurde durch Erhitzen (70°C, 15 min) abgestoppt und die RNA durch Zugabe von 1 µl RNase H (37°C, 20 min) entfernt. Die cDNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

## 2.3.16. DNA-Amplifikation mit der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Je nach Fragestellung wurden zwei unterschiedliche Polymerasen und damit auch unterschiedliche Reaktionsbedingungen zur Amplifikation von DNA gewählt. Sollten synthetisierte cDNA-Fragmente in Vektoren kloniert werden, wurde die Amplifikation mit PfuTurbo<sup>®</sup> Hotstart DNA Polymerase (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt, die aufgrund ihrer so genannten "Proofreading"-Aktivität eine deutlich verringerte Fehlerrate aufweist. Da

dieses Enzym recht empfindlich auf Verunreinigungen reagiert, wurde für analytische Zwecke vorzugsweise die Taq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden) verwendet.

## 2.3.16.1. Amplifikation mit PfuTurbo<sup>®</sup> Hotstart DNA Polymerase

Die 50 µl-Reaktionsansätze wurden auf Eis zusammen pipettiert und enthielten neben 5 µl cDNA (siehe 2.3.15.), 5 µl 10 x PfuTurbo-Reaktionspuffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 % (v/v) Triton X-100, 1 mg/ml BSA), 1 µl dNTPs (10 mM, Promega, Mannheim), je 2 µl Primer (100 ng/µl), 2,5 µl DMSO und 1 µl PfuTurbo<sup>®</sup> Hotstart DNA<u>-</u>Polymerase (Stratagene, 2,5 U/µl). Die Reaktion wurde in einem Thermocycler (Flexigene, Techne, Staffordshire) durchgeführt. Nach einer initialen Denaturierung für 4 min bei 95°C schloss sich das eigentliche Amplifikationsprogramm an, das aus drei Segmenten bestand:

Denaturierung:	1 min	95°C
Primer-Annealing:	1 min	58°C-65°C
Primer-Extension:	2 min / kb	72°C

Die Temperatur für das Primer-Annealing wurde in Abhängigkeit vom Primerpaar zwischen  $58^{\circ}$ C- $65^{\circ}$ C gewählt. Die Extensionszeit des Amplifikationsprogramms orientierte sich an der Größe des Amplifikationsproduktes (2 min / 1 kb). Nach 30 Wiederholungen des Amplifikationsprogramms schloss sich eine Auffüllreaktion (10 min, 72°C) an.

## 2.3.16.2. Amplifikation mit Taq-DNA-Polymerase

Die 50 µl-Reaktionsansätze enthielten neben 3 µl cDNA (s. 2.3.15.), 3-6 ng Plasmid-DNA oder 100 ng genomischer DNA, 5 µl 10 x Qiagen PCR, 1 µl dNTPs (10 mM, Promega, Mannheim), je 1 µl Primer (100 ng/µl) und 0,5 µl Taq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, 5 U/µl). Die Extensionszeit des Amplifikationsprogramms orientierte sich an der Größe des Amplifikationsproduktes (1 min / 1 kb). Üblicherweise enthielt das Amplifikations-Programm 30 Wiederholungen, nur bei der Verwendung von genomischer DNA wurden 35 PCR-Zyklen durchgeführt.

## 2.3.17. Klonierung von PCR-Produkten

Sollten die PCR-Produkte in Plasmidvektoren kloniert werden, wurden speziell modifizierte Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation verwendet. Die entsprechenden Primer tragen an ihrem 5'-Enden eine Guanidin- (G) und Cytosin-reiche (C) Schutzgruppe mit der Nukleotidsequenz GCGCATCGTA. Dieser Sequenz folgt die jeweilige Erkennungssequenz des für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzyms. Am 3'-Ende der Oligonukleotid-

Primer befindet sich die zur Zielsequenz komplementäre spezifische DNA-Sequenz. Die GCreichen Schutzgruppen des PCR-Amplikons verhindern ein Aufschmelzen der DNA während des folgenden Restriktionsverdaus, so dass dieser mit hoher Effizienz erfolgt. Die PCR-Reaktion erfolgte mit der PfuTurbo<sup>®</sup> Hotstart DNA Polymerase (siehe 2.3.16.1.). Die PCR-Produkte wurden nach erfolgreicher Amplifikation mit dem QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und anschließend mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Anschließend wurden die DNA-Fragmente in einem Agarose-Gel aufgetrennt (siehe 2.3.9.), aus dem Gel aufgereinigt (siehe 2.3.10.), und in den verdauten und dephosphorylierten Plasmidvektor ligiert (siehe 2.3.11.).

#### 2.3.18. Quantitative RT-PCR-Analyse

Für diese Analyse musste zunächst cDNA (siehe 2.3.15.) hergestellt werden. Für die Erststrangsynthese wurde Gesamt-RNA (siehe 2.3.14.) eingesetzt. Um residuale Phenolreste aus der RNA zu entfernen, wurden 50 μg der RNA mit dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. In der folgenden Erststrangsynthese wurden jeweils 1 μg RNA als "Template" eingesetzt. Die Erststrangsynthese erfolgte wie unter 2.3.15. beschrieben, es wurden bei diesem Ansatz jedoch 1 μl Random-Primer statt der Oligo(dT)-Primer verwendet. Nach der Synthese wurde die cDNA im Verhältnis 1:20 mit Wasser verdünnt. Das Volumen einer einzelnen PCR-Probe betrug 20 μl. Die Proben wurden stets in dreifacher Wiederholung pipettiert. Als Referenz diente das GAPDH-Gen. Die Ansätze wurden zunächst als Stammlösung pipettiert und erst dann auf die twin.tec PCR-Platte (Eppendorf, Hamburg) aufgetragen. Pro Ansatz wurden hierbei 10 μl Quantitect<sup>®</sup> - SYBR-Green-Mastermix (Qiagen, Hilden), jeweils 0.5 μl Primer (10 pm/μl) und 9 μl der verdünnten cDNA verwendet. Die PCR-Analyse erfolgte mit dem realplex<sup>4</sup>-PCR-Gerät (Eppendorf, Hamburg). Das Standard-PCR-Programm begann mit 2 min bei 56°C, gefolgt von der initialen Denaturierung von 10 min bei 95°C. Dann wurden 40 Zyklen im Thermocycler durchlaufen:

Denaturierung:	15 sec	95°C
Primer-Annealing:	30 sec	56°C-58°C
Primer-Extension:	30 sec	68°C

Es folgte ein Extensionschritt von 15 sec bei 95°C. Danach wurden die Proben noch jeweils für 30 sec bei 58°C und 68°C inkubiert. Das Programm endete mit einer Inkubation von 15 sec bei 95°C. Nachdem das PCR-Programm beendet wurde, folgte die Analyse der Rohdaten mit der realplex<sup>4</sup>-PCR-Software. Je nach Fragestellung erfolgte dann die Auswertung der Daten. Einzelne Proben wurden mittels Gelelektrophorese (siehe 2.3.9.) untersucht, um unerwünschte Nebenprodukte der PCR-Reaktion zu identifizieren.

#### 2.3.18.1. Relative mRNA-Quantifizierung

Bei dieser Methode werden die relativen Expressionsunterschiede einer bestimmten mRNA in Bezug auf ein nicht reguliertes Gen bestimmt. Die Auswertung erfolgte nach der  $\Delta\Delta$ CT-Methode. Hierbei wurde eine gleiche PCR-Effizienz von Referenzgen und Zielgen angenommen. Im ersten Schritt wurde für jede untersuchte Probe der CT-Wert des Referenzgens vom CT-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert:

$$\Delta CT = CT_{Zielgen} - CT_{Referenzgen}$$

Zum Vergleich verschiedener Proben, wurde der  $\Delta CT$  der Referenz-Probe von den  $\Delta CT$ -Werten der anderen Proben subtrahiert:

$$\Delta \Delta CT = \Delta CT_{ProbeX} - \Delta CT_{ProbeC}$$

Der relative Expressionsunterschied zwischen zwei Proben, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf die Probe mit dem niedrigsten  $\Delta$ CT ergab sich aus der arithmetischen Formel:

Ratio = 
$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

Die Standardabweichung ergibt sich aus den jeweiligen Standardabweichungen der  $\Delta$ CT-Werte von der Probe und Referenz:

$$S = \sqrt{[(s_x)^2 + (s_0)^2]}$$

#### 2.3.18.2. Absolute mRNA-Quantifizierung

Diese Methode erlaubt den Vergleich der Konzentrationen verschiedener Transkripte in derselben cDNA-Präparation. Bei der absoluten mRNA-Quantifizierung wurde parallel zu den zu vermessenden Proben für jedes verwendete Primerpaar eine Kalibrierkurve aus Messungen mit definierten Template-Mengen angefertigt. Als Template diente ein wie unter 2.3.5. hergestelltes und unter 2.3.7. geschnittenes Expressionsplasmid. In der Verdünnungsreihe wurden jeweils 10<sup>3</sup>, 5x10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 5x10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 5x10<sup>5</sup> und 10<sup>6</sup> Templatemoleküle eingesetzt. Nach der quantitativen RT-PCR-Analyse wurden die erhaltenen CT-Werte aus der Verdünnungsreihe gegen den Logarithmus der eingesetzten Template-Moleküle aufgetragen und die Funktion der Regressionsgeraden ermittelt. Diese Funktion diente nun zur Bestimmung der Kopienzahl für die jeweils untersuchten mRNA-Moleküle.

## 2.3.19. Qualitative mRNA-Analyse durch Northern-Blot-Hybridisierung

Mit Hilfe der Northern-Blot-Analyse kann die Größe und Menge einer spezifischen mRNA in einem heterogenen RNA-Gemisch ermittelt werden. Im Gegensatz zur quantitativen RT-PCR-Analyse können hierbei unter Umständen auch verschiedene Spleißformen eines Primärtranskriptes identifiziert werden. Die RNA wird zunächst gelelektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend auf Nylonmembran immobilisiert. Der spezifische Nachweis erfolgt mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde.

## 2.3.19.1. Agarose-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

FA Gel-Puffer:	
20 mM	MOPS
5 mM	Natrium Acetat
1 mM	EDTA (pH 7,0)
FA Laufpuffer :	
1x FA	Gelpuffer
2,5 M	Formaldehyd
RNA Ladepuffer :	
0.25%	Bromphenolblau
4 mM	EDTA
0.9 M	Formaldehyd
20%	Glycerol
30.1%	Formamid
4x	FA Gelpuffer

In der denaturierenden Gelelektrophorese wurden Gesamt-RNA-Proben (siehe 2.3.14.) aufgetrennt. Zunächst wurde das Gel gegossen. Hierfür wurden 1 g Agarose mit 10 ml 10x FA Gelpuffer und 100 ml Wasser solange in der Mikrowelle erwärmt, bis die gesamte Agarose gelöst war. Nachdem die Lösung 10 min bei RT abgekühlt hatte, wurde sie mit 1  $\mu$ l Ethidium-Bromid-Lösung und 1.8 ml 37% iger Formaldehyd-Lösung versetzt und anschließend in eine zuvor exakt austarierte Gelapparatur gegossen. Zur Herstellung der Taschen wurde ein 1 mm breiter Kamm benutzt. Das Gel polymerisierte für 45 min bei RT. Vor Beginn der Elektrophorese wurde das Gel 30 min mit kaltem Laufpuffer im Kühlraum bei 4°C äquilibriert, und jegliche Laufblasen vom Gel-Schlitten entfernt. Parallel wurden die RNA-Proben vorbereitet. Jeweils 20  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min bei einer Temperatur von 68°C im

Heizblock denaturiert. Die Proben wurden anschließend für mindestens 5 min auf Eis inkubiert. Nun wurde der Kamm aus dem Gel gezogen und das Gel sorgfällig beladen. In ungenutzte Taschen wurde 1x Ladepuffer aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 80 V im Kühlraum durchgeführt. Nach 4 Stunden wurde die Elektrophorese beendet, und es erfolgte die Dokumentation der RNA-Auftrennung.

## 2.3.19.2. RNA-Transfer auf Nylonmembran

Transferpuffer (20x SSC):3 MNaCl0.3 MNatrium Citrat

Sofort nach der Dokumentation der RNA-Auftrennung wurde das Gel für den folgenden Transfer zurechtgeschnitten. Die Bahnen ohne aufgetrennte RNA, sowie der Bereich oberhalb der Taschen und unterhalb der Lauffront wurden mit einem Skalpell abgetrennt. Dann wurde das Gel für 10 min bei RT in 200 ml Wasser geschwenkt. Zur partiellen Hydrolyse der RNA folgte eine Inkubation von 15 min in 200 ml 0.05 M NaOH. Anschließend wurde mit 200 ml 10x SSC-Puffer für 10 min neutralisiert. Der Transfer der RNA auf die Nylonmembran erfolgte im Kapillarblotverfahren. Zunächst wurde die Hybond N+- Nylonmembran (GE-Healthcare, München) auf Größe des Gels zugeschnitten, dies entsprach der Größe des beschnittenen Gels. In derselben Größe wurde zweimal Whatman-Filterpapier zurechtgeschnitten. Membran und Filterpapier wurden in Transferpuffer äquilibriert. Eine 20 cm x 30 cm große, mit Transferpuffer befüllte Plastikwanne diente als Pufferreservoir. Auf diese Wanne wurde eine Glasplatte gelegt. Auf diese Platte wurde unter Ausschluss von Luftblasen eine mit Transferpuffer getränkte Bahn Whatman-Filterpapier positioniert, so dass die Enden des Papiers in das Pufferreservoir hineinragten. Das behandelte Gel wurde nun mit der Unterseite nach oben, zentral und unter Ausschluss von Luftblasen auf das Filterpapier gelegt. Das Gel wurde an den Seiten sorgfältig mit Frischhaltefolie umgeben, so dass der Strom des Transferpuffers durch das Gel geleitet wird. Auf das Gel wurde nun passgenau die Membran gelegt. Auf die Membran kamen nun die zuvor zugeschnittenen und äquilibirerten Filterpapiere. Zur Ausübung der Sogwirkung wurde auf die gestapelten Elemente ein 15 cm hoher Stapel Zellstoff gelegt. Auf den Zellstoff wurde eine weitere Glasplatte positioniert und mit einem Gewicht von etwa einem 1 kg beschwert. Der Transfer der RNA erfolgte über Nacht bei RT. Der Aufbau der Blots ist in Abb. 4 schematisch dargestellt.



Abb. 4: Schematische Darstellung des Aufbaus für den Transfer von RNA auf Nylon-Membranen. Weitere Erläuterungen im Text.

Am nächsten Tag wurde die RNA mittels UV-Bestrahlung auf der Nylonmembran kovalent fixiert. Hierzu wurde das Auto-Crosslink-Programm des UV-Ofens (Fa. Techne, Staffordshire, UK) benutzt. Der Transfer der RNA wurde am Geldokumentationsgerät überprüft und dokumentiert. Zudem wurde die Lauffront der 16S- und 28S- RNA auf der Membran mit einem Kugelschreiber markiert. Zur weiteren Lagerung wurde die Membran mit H<sub>2</sub>O gewaschen und zwischen 2 Filterpapiere an einen dunklen Ort gelegt.

## **2.3.19.3.** Herstellung einer [α-<sup>32</sup>P]-markierten DNA-Sonde

Zur spezifischen Detektion der RNA wurde eine radioaktiv markierte DNA-Sonde hergestellt. Diese Form des Nachweises bietet die höchstmögliche Sensitivität und ist aufgrund der direkten Markierung gut reproduzierbar. Zur Herstellung der DNA-Sonden wurde das Rediprime II <sup>TM</sup>- Markierungssystem (GE-Healthcare, Freiburg) verwendet. Als DNA-Template dienten entweder aufgereinigte PCR-Produkte (siehe 2.3.16.) oder aufgereinigte cDNA-Inserts eines Expressionsplasmids (siehe 2.3.5. und 2.3.7.). 25 ng DNA wurden in einem Volumen von 45 μl TE-Puffer aufgenommen. Vor Beginn der Markierungsreaktion wurde die DNA 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert und anschließend 5 min auf Eis gestellt. Die Lösung wurde kurz abzentrifugiert und zum rediprime<sup>TM</sup> –Reaktionsgemisch gegeben ohne dieses dabei zu durchmischen. Es folgte die Zugabe von 5 μl des radioaktiv markierten [<sup>32</sup>P]dCTPs (50 μCi, GE-Healthcare, Freiburg). Nun wurde die Lösung durch

mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich durchmischt. Die Synthese der Sonden erfolgte für 30 min bei 37°C. Nach beendeter Synthese wurden nicht inkorporierte Nukleotide mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers abgetrennt. Die markierte DNA wurde zweimal sukzessiv mit jeweils 50 µl Elutionspuffer eluiert und die Cerenkow-Counts mit Hilfe des "easy-count"-Programms im Szintillations-Zähler (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) bestimmt.

#### 2.3.19.4. Hybridisierung einer DNA-Sonde mit immobilisierter RNA

Hoch-Stringen	z-Waschpuffer:	
0.1x	SSC	
0.1%	SDS	
Niedrig-Stringenz-Waschpuffer:		
2x	SSC	
0.1%	SDS	
Hochsalz-Waschpuffer:		
5x	SSC	
0.5%	SDS	

Vor dem Beginn der Hybridisierung wurde die ULTRAhyb<sup>®</sup>-Hybridisierungslösung (Ambion, Darmstadt) in einem Brautschrank auf 68°C gewärmt bis sämtliches Präzipitat in Lösung gegangen war. Die Hybridisierung wurde in einem Hybridisierungsofen der Firma Techne durchgeführt. Die getrocknete Membran wurde mit wenig Wasser befeuchtet und in eine Hybridisierungsflasche überführt. In die Flasche wurden nun 10 ml der vorgewärmten Hybridisierungslösung gegeben. Die Membran wurde bei 42°C für 60 min im Ofen prähybridisiert. Für die Hybridisierung wurde pro Blot eine Aktivität von 10<sup>7</sup> cpm eingesetzt. Dies entsprach ca. 20 µl der markierten und aufgereinigten DNA-Sonde. Membran und Sonde wurden über Nacht bei 42°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung abgekippt, zweimal für 5 min bei 42°C mit dem niedrigstringenten Waschpuffer und anschließend zweimal für 15 min bei 42°C mit dem hochstringenten Waschpuffer gewaschen. Nun erfolgte die Exposition eines Röntgenfilms für 2 h. Abhängig von dem erhaltenen Signal- Rauschverhältnis wurde die Expositionszeit optimiert bzw. die Membran weiteren Waschschritten unterzogen. Hierbei wurde die Inkubationstemperatur auf 60°C erhöht und Waschschritte von jeweils 30 min mit dem Hochsalzwaschpuffer durchgeführt. Alternativ wurden die beiden anderen Waschpuffer verwendet. Die Wahl einer

direkt markierten Sonde erlaubte hierbei, den Waschfortschritt durch Exposition eines Röntgenfilms zu überprüfen.

#### 2.3.20. Automatische DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde nach der Didesoxy-Methode mit dem BigDye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystem (Darmstadt) durchgeführt. Der vom Hersteller gelieferte BigDye-Mix enthielt: FF-Taq-Polymerase, Taq-Reaktionspuffer, dNTPs und die vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxy-NTPs. Für einen 20 µl-Sequenzieransatz wurden maximal 1 µg DNA in 11 µl H<sub>2</sub>O, 1 µl Primer (3,2 pmol/µl) und 8 µl BigDye-Mix eingesetzt. Im Thermocycler wurden 25 Zyklen des folgenden Programms durchlaufen:

Denaturierung:	10 sec	96°C
Primer-Annealing:	15 sec	50°C
Primer-Extension:	4 min	60°C

Der Sequenzieransatz wurde mit 16  $\mu$ l H<sub>2</sub>O versetzt und die DNA durch Zugabe von 64  $\mu$ l 100% igem Ethanol 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert (13000 rpm, 30 min, 4°C) und das Pellet mit 250  $\mu$ l 70% igem Ethanol gewaschen. Danach wurde die DNA für 5-10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die Auftrennung der DNA in einem Polyacrylamid-Gel und die weitere Detektion und Analyse der Sequenzierung erfolgte am Institut für Pathologie (UKE, Hamburg) mit dem Applied Biosystem DNA-Sequencer ABI PRISM (Modell 3100).

## 2.3.21. Erstellung und Auswertung von Expressionsprofilen mittels Mikro-Array-Technologie

In einer Expressionsanalyse wurden die Expressionprofile von parentalen NIH3T3-Zellen mit GRHL2-überexprimierenden NIH3T3-Zellen verglichen. Die Erstellung der Expressionsprofile erfolgte in Zusammenarbeit mit der Firma Indivicon Diagnostics (Ochtrup) unter Verwendung von Whole Genome 4x44 K Mikroarrays der Firma Agilent. Von jeder Zelllinie wurde die Gesamt-RNA aus drei aufeinander folgenden Zellkultur-Passagen mit Hilfe des RNeasy<sup>®</sup> Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und in der Mikroarrays enthielten 44.000 Oligonukleotide für mehr als 41.000 bekannte Gene und Transkripte. Die Durchführung der Expressionsanalysen erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers.

Die Auswertung der Rohdaten wurde von der Firma Indivicon Diagnostics (Ochtrup) durchgeführt. Die Rohdaten wurden zunächst mit der Agilent Feature Extraction Software hinsichtlich grober Unterschiede in der Signalverteilung untersucht. Die Normalisierung der Rohdaten erfolgte im Verfahren des "Median Scalings". Für alle folgenden Analysen wurden Werte für Gene, die sich in mehreren Replikaten auf dem Array vertreten sind, gemittelt. Für die Ermittlung der signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den parentalen und GRHL2-überexprimierenden NIH3T3-Zellen wurde der sog. SAM-Algorithmus (Significance Analysis of Microarrays) verwendet. Für die SAM-Analyse wurde eine FDR (Fehlerquote, False Discovery Rate) von 5% zugelassen. Als signifikant reguliert wurde nur solche Gene betrachtet, für die mindestens eine zweifache Deregulierung festgestellt werden konnte. Ferner wurden nicht exprimierte Gene ausgeschlossen.

## 2.3.22. Bioinformatische Analyse von Promotoren

Um Zielgene zu identifizieren, die unter direkter transkriptioneller Kontrolle des GRHL2-Transkriptionsfaktors stehen, wurde in Kooperation mit Dr. Christian Schulze (Zentrum für molekulare Neurobiologie, UKE, Hamburg) eine bioinformatische Promotor-Analyse für die am stärksten deregulierten Gene durchgeführt. Ziel dieser Analyse war es, mögliche DNA-Bindungsstellen des GRHL2-Proteins innerhalb von 1 kb vor dem Transkriptionsstart der jeweiligen Gene zu identifizieren. Die entsprechenden Promotorsequenzen wurden vom Ensembl Datenbank bezogen (www.ensembl.org, Ensembl release 50, Juli 2008). Für die Motivsuche wurden die kombinierten Häufigkeitsmatrices (position frequency matrix) der Proteine GRHL1 und GRHL3 verwendet [Wilanowski et al., 2008, Ting et al., 2005]. Die Motivsuche erfolgte unter Verwendung des kvasir-Programms [Wong et al., 2007]. Zudem wurde eine Analyse der orthologen Promotorsequenzen von Maus und Mensch angefertigt. Diese Analyse wurde mit Hilfe eines Sequenzabgleichs durch das ClustalW-Programm (www.ebi.ac.uk/clustalw) angefertigt. Die entsprechenden Promotor-Sequenzen (jeweils 1 kb vor dem Transkriptions-Start) der Orthologenpaare wurden von der Ensembl Genom-Datenbank (www.ensembl.org, Ensembl release 50, Juli 2008) bezogen.

#### 2.3.23. Luciferase-Genreporter-Assay

Dieser Assay wird unter anderem zur Bestimmung der spezifischen Promotoraktivität von Transkriptionsfaktoren verwendet. Dabei wird die zu analysierende Promotorsequenz vor die Sequenzen, die für das lumineszierende Reporterprotein Luciferase kodieren, kloniert. Besitzt die Promotorsequenz spezifische Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren kommt es zur Expression des Reporters, mit dessen Hilfe die Quantifizierung der transkriptionellen Aktivität ermöglicht wird.

Die zu untersuchenden Promotorbereiche wurden unter Verwendung der Pfu-Polymerase von genomischer DNA amplifiziert (siehe 2.3.16.1) und in das Reporterplasmid pGL4.10 (Promega, Mannheim) kloniert. Für den Assay wurden NIH3T3 und WNX-eco als Zielzellen verwendet. Die Zellen wurden unter Verwendung von Lipofectamine 2000<sup>TM</sup> (NIH3T3) bzw. Effectene (wNX-eco) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Dem Transfektionsgemisch wurde zudem das Plasmid pGL4.74 (Promega, Mannheim) in einem Verhältnis von 1:10 (NIH3T3) und 1:30 (WNX-eco) zum Reporter-Plasmid beigemischt. Das Plasmid pGL4.74 enthält Sequenzen, die für ein zweites lumineszierende Reporterprotein kodieren, welches unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors steht. Mit Hilfe dieses zweiten Reporterproteins ist es möglich eine Normalisierung hinsichtlich der Transfektionseffizienzen durchzuführen. 100 µl des Transfektionsgemisches wurden in die Vertiefung einer 24-Lochplatte vorgelegt und anschließend  $5x10^5$  Zielzellen in einem Volumen von 500 µl Zellkulturmedium zugeben. Die Zellen wurden für 48 h im Inkubator inkubiert. Die Nachweisreaktion der Promotoraktivität erfolgte mit dem Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Die Messung der Biolumineszenz erfolgte im GloMax<sup>TM</sup> 20/20 Luminometer (Promega, Mannheim). Zur Normalisierung der Messwerte wurde das Verhältnis zwischen dem Messwert des Reporterplasmids und des Kontrollplasmids gebildet.

## 2.4. Proteinbiochemische und immunologische Methoden

## 2.4.1. Herstellung polyklonaler Antiseren

Die Herstellung polyklonaler Antikörper erfolgte durch Peptid-Immunisierung von Kaninchen. Es wurden Peptide ausgewählt, für die eine starke Immunantwort zu erwarten war und außerdem keine Homologien zu anderen bekannten Peptidsequenzen aufwiesen. Hinsichtlich dieser Kriterien wurde vor der Auswahl der Peptide eine bioinformatische Analyse der Protein Primärsequenz mit den Programmen ANTIGENIC (http://srs.ebi.ac.uk/ und Clustalw2 (http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw2/index.html) durchgeführt. Die Synthese der Peptide sowie die Immunisierung der Kaninchen erfolgte in Zusammenarbeit mit der Firma Davids Biotechnologie (Regensburg). Den Peptiden wurde an jeweils einem Terminus ein zusätzlicher Cystein-Rest angefügt. Die Peptide lassen sich über die Sulfhydrygruppe des Cysteins kovalent an ein größeres Protein koppeln, um somit die Immunantwort des Kaninchens zu verstärken. Ferner erlaubt das angefügte Cystein eine spätere Kopplung des Peptids an eine Festphase, mit Hilfe derer die Peptid-spezifischen Antikörper aufgereinigt werden können. Vor der Immunisierung wurde den Kaninchen Primärserum abgenommen. Nach beendeter Herstellung der Antikörper im Kaninchen wurde das Serum mit dem Primärserum hinsichtlich einer veränderten Reaktivität im Western Blot (2.4.3.) getestet. Wurde hierbei eine spezifische Reaktivität des Serums ermittelt, wurde mit der Affinitätsreinigung des polyklonalen Antikörpers begonnen.

## 2.4.2. Affinitätschromatographische Aufreinigung von Antiseren

Bei der affinitätschromatographischen Aufreinigung von Antiseren werden aus der Gesamtheit der in einem Antiserum vorhandenen Antikörper, alle für ein bestimmtes Epitop spezifischen Antikörper aufgereinigt. Die Peptide werden hierfür zunächst immobilisiert, so dass die spezifische, polyklonale Antikörperpopulation daran binden kann. Anschließend werden alle anderen Bestandteile des Antiserums durch mehrfache Waschschritte entfernt und die spezifischen Antikörper können eluiert werden.

## 2.4.2.1. Immobilisierung von Peptiden

Probenpuffer:	
0.1 M	Natriumphosphat
5 mM	Na-EDTA (pH 6,0)
Kopplungspuffer:	
50 mM	Tris/HCl (pH 8,5)
5 mM	Na-EDTA
Waschpuffer:	
1 M	NaCl
0.05%	Natriumazid

Bevor das Peptid an die Matrix gekoppelt werden konnte, musste die Sulfhydrylgruppe des terminalen Cysteins reduziert werden. Zur Reduktion wurden 350 mg des Peptids in 1 ml Probenpuffer aufgenommen. Nun wurden 6 mg 2-Mercaptoethylamine hinzugefügt. Zur Reduktion wurde die Lösung 90 min bei 37°C auf dem Rollschüttler inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde die Sulfolink<sup>®</sup>-Matrix (Perbio, Bonn) präpariert. 4 ml der Sulfolink<sup>®</sup>-Suspension wurden in eine 4 cm Polyprep<sup>®</sup>-Säule (BioRad, München) gefüllt. Die Säule wurde in ein Stativ gespannt und die Matrix 30 min zum Absetzen stehen gelassen. Nach dieser Inkubation wurde der Lagerungspuffer abgelassen und das Gel mit 8 ml Kopplungspuffer equilibriert. Nach der 90-minütigen Reduktionsreaktion des Peptids wurde

die Reaktionslösung auf RT abgekühlt. Nun erfolgte die Entsalzung der Reaktionslösung. Hierfür wurden 5 ml Zeba®-Entsalzungssäulen (Perbio, Bonn) verwendet. Die Säulen wurde in ein 15-ml-Reaktionsgefäß gestellt, welches zuvor an der 14-ml-Markierung abgeschnitten wurde. Zum Entfernen der Lagerungslösung wurde die Säule bei 2400 rpm in einer Rotofix 32-Zentrifuge mit einem 1619-Rotor 2 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Reduktionsgemisch zentral auf die Matrix aufgetragen und für weitere 2 min zentrifugiert. Das reduzierte und entsalzte Peptid befand sich nun im Durchfluss. Zur Kopplung des Peptids an die Matrix wurden beide Lösungen in der Polyprep<sup>®</sup>-Säule zusammen für 15 min unter ständigem Drehen inkubiert. Anschließend wurde die Säule für 30 min in aufrechter Position in ein Stativ gespannt. Sämtlicher Puffer wurde entfernt, ohne dabei die Säule trocken laufen zu lassen. Nun wurde die Matrix mit 6 ml Kopplungspuffer gewaschen. Zur Blockierung ungenutzter Bindungsstellen der Martix wurde diese mit 15,8 mg L-Cystein versetzt, welches zuvor in 2 ml Kopplungspuffer gelöst wurde. Matrix und Cystein-Lösung wurden 15 min unter ständigem Drehen inkubiert. Anschließend wurde die Säule für 30 min in aufrechter Position in ein Stativ gespannt. Nicht gebundenes Cystein wurde mit 12 ml Waschpuffer von der Matrix gewaschen. Anschließend wurde die Matrix mit 12 ml Elutionspuffer gewaschen. Es folgte ein abschließender Waschschritt mit 6 ml PBS. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Matrix mit 2 ml PBS überschichtet, mit dem Deckel verschlossen und bei 4°C gelagert.

## 2.4.2.2. Immunaffinitätschromatographie

<u>Elutionspuffe</u>	<u>er:</u>
0.1 M	Glycin
1 M	HCl (pH 2,5)
Neutralisation	nspuffer:
1 M	Natriumphosphat
1 M	Tris/HCl (pH 8,5)

Die Inkubation des Serums mit der Matrix erfolgte im Batch-Verfahren. Hierfür wurde die Peptid-gekoppelte Matrix (siehe 2.4.2.1.) in 10 ml PBS resuspendiert. Die Suspension wurde in ein 15-ml-Reaktionsgefäß überführt und die Matrix in einer kurzen Zentrifugation sedimentiert. Das PBS wurde abgenommen und 10 ml des zu reinigenden Serums zur Matrix gegeben. Serum und Martix wurden über Nacht bei 4°C unter ständigem Mischen inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Suspension in die Polyprep<sup>®</sup>-Säule überführt. Das 15-ml-Reaktionsgefäß wurde mit 12 ml PBS gespült, um einen Materialverlust zu minimieren. Die

Martix wurde mit insgesamt 24 ml PBS gewaschen. Nun wurde jeweils 1 ml des Elutionspuffers auf die Matrix gegeben. Um eine Schädigung der eluierten Antikörper durch den sauren pH-Wert des Elutionspuffers zu vermeiden, wurde die Fraktionen der Elution in 1.5-ml-Reaktionsgefäßen gesammelt, in denen bereits 100 µl Neutralisationspuffer vorgelegt worden war. Die eluierte Antikörperlösung wurde sofort auf Eis gestellt. Es wurden insgesamt 10 Fraktionen gesammelt. Um Festzustellen welche der Fraktionen den höchsten Gehalt an Antikörper aufwiesen, wurden jeweils 10 µl der Eluate zu 100 µl Bradford-Reagenz gegeben (BioRad, München). Das Bradford-Reagenz wurde zuvor im Verhältnis 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Zwei der Eluate mit der höchsten Antikörperkonzentration wurden für die anschließende Dialyse vereint. Für die Dialyse wurden Slide-A-Lizer<sup>®</sup>-Dialysekassetten (Perbio, Bonn) verwendet. Die vereinten Eluate wurden mit einer Kanüle in die Dialysekassetten eingebracht, ohne dabei die Membran zu beschädigen. Die Dialyse erfolgte zweimal gegen 2 l PBS für 12 h im Kühlraum. Der dialysierten Antikörperlösung wurde 10% iges Natriumazid bis zu einer Endkonzentration von 0.02% zugesetzt. Der Affinitätsgereinigte Antikörper wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

## 2.4.3. Western-Blot-Analyse von Proteinen

Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse können Proteine durch einen spezifischen Antikörper in einem komplexen Proteingemisch nachgewiesen werden. Hierfür werden die Proteine zunächst nach ihrer relativen Größe aufgetrennt und danach auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert. Der spezifische Nachweis erfolgt anschließend mit einem Immunoblot.

## 2.4.3.1. Herstellung von SDS-Ganzzellextrakten

SDS-Lysispuffer:	
2 % (w/v)	SDS
62,5 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
10 % (v/v)	Glycerin

Nach zweimaligem Waschen des Zellrasens mit PBS wurden die Zellen in einem Volumen von 1 ml PBS mit einem Zellschaber vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst. Die Zellsuspension wurde dann in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen 3 min bei 5000 min<sup>-1</sup> in der Tischzentrifuge sedimentiert. Nach Entfernung des PBS wurden die Zellen mit einem geeigneten Volumen Lysispuffer aufgeschlossen. Die Degradierung der DNA erfolgte durch Ultraschallbehandlung. Hierzu wurde das Lysat zweimal mit jeweils 15 Stößen bei einer Amplitude von 60 % behandelt (Ultraschallprozessor, Fa. Dr. Hirschler, Bonn). Nun

wurden 2 µl des Rohlysats für eine Proteinbestimmung abgenommen. Dem Lysat wurden anschließend 0,5 µl einer mit Bromphenolblau gesättigten, ethanolischen Lösung zugesetzt. Die Probe wurden abschließend 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

## 2.4.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration von Ganzzellextrakten

Zur Proteinbestimmung wurde das Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit (Perbio, Bonn) benutzt. Hierzu wurde zunächst die Detektionslösung nach Angaben des Herstellers hergestellt. Für jede zu messende Probe wurden 200  $\mu$ l Detektionsreagenz in der Vertiefung einer 96-Loch-Platte vorgelegt. Anschließend wurden 2  $\mu$ l des Proteinlysates hinzugefügt. Für die Erstellung einer Eichgrade wurden im Duplikat jeweils 2  $\mu$ l einer BSA-Lösung mit einer Konzentration von jeweils 1  $\mu$ l, 2  $\mu$ l, 5  $\mu$ l und 10  $\mu$ l mit 200  $\mu$ l der Detektionslösung vermischt. Die Proben wurden für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Extinktionsmessung bei 562 nm im Photometer (Eppendorf, Hamburg).

#### 2.4.3.3. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngel (8% Acrylamid):

8 % (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
0,4 M	Tris/HCl (pH 8,8)
0,05 % (w/v)	SDS
0,05 % (w/v)	Ammoniumpersulfat
Sammelgel:	
5 % (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
0,2 M	Tris/HCl (pH 6,8)
0,05 % (w/v)	SDS
0,05 % (w/v)	Ammoniumpersulfat
Laemmli-Lau	f-Puffer:
192 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS
25 mM	Tris/HCl (pH 8,3)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer relativen Größe erfolgte mittels einer denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE). Hierzu wurden die zu untersuchenden Proteinproben für 5 min bei 95°C erhitzt, um die Proteine vollständig zu denaturieren und sie mit einer zu ihrer Größe proportionalen Ladung zu bestücken. Für die

Gelelektrophorese wurden Minigelkammern Model SE250 der Firma Hoefer (GE-Healthcare, Freiburg) verwendet. Die Laufstrecke im Sammelgel betrug 0,5 cm, im Trenngel 6 cm. Es wurden jeweils 20 µg Protein ausgetragen. Das Trenngel wurde durch Mischen entsprechender Mengen H<sub>2</sub>O, Acrylamidmix (National Diagnostic, USA), Trenngelpuffer, 10 % SDS-Lösung, 10 % Ammoniumpersulfat-Lösung und TEMED (Sigma-Aldrich, München) angesetzt, zwischen die in den Gießstand eingespannten Glasplatten gegossen und mit H<sub>2</sub>O überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser entfernt, ein Probentaschenkamm in die Gelkammer eingesetzt und das Sammelgel gegossen. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, die Gelapparatur zusammengesetzt und die Pufferreservoirs mit Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurden 20 µg Protein pro Spur geladen. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde der Molekulargewichtsstandard Full Range Rainbow RPN800 (GE-Healthcare, Freiburg) aufgetragen. Die Proteine wurden bei 25 mA/Gel für ca. 60 min aufgetrennt, bis die blaue Lauffront das Gelende erreicht hatte. Der Nachweis der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte entweder mittels Commassie Brilliant Blue (siehe 2.4.4.4.) oder durch eine Immunoblot-Analyse (siehe 2.4.3.5.).

## 2.4.3.4. Semi-Dry-Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Transfer-Puffer:	
48 mM	Tris
39 mM	Glycin
0.04 % (w/v)	SDS
20 % (v/v)	Methanol

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine im Semidry-Blotverfahren auf Hybond-ECl Nitrozellulose-Membranen (GE-Healthcare, Freiburg) transferiert. Für den Transfer wurde die Nitrozellulose- Membran und vier 3MM-Whatmann-Filter (VWR, Darmstadt) auf Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer eingeweicht. Die Membran wurden zuvor 5 min in Wasser durchfeuchtet. Auf der Anodenseite der Blotapparatur (BioRad, München) wurde folgender Aufbau vorgenommen: auf zwei 3MM-Whatmann-Filter folgte die Nitrocellulose-Membran, das Gel wurde luftblasenfrei aufgelegt und mit zwei 3MM-Whatmann-Filter bedeckt. Nach Aufsetzen der Kathode erfolgte der Transfer mit 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 2 h.

#### 2.4.3.5. Immunoblot-Analyse

WB-Waschpuffer:	
1x	PBS
0.05%	Tween-20
ECL-Lösung:	
0,1 M	Tris/ HCl pH 8,5
1,25 mM	Luminol
0,45 mM	p-Cumarinsäure
0.09 %	$H_2O_2$
WB-Blockierungspu	<u>ffer:</u>
1x	WB-Waschpuffer
5% (w/v)	Magermilchpulver

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min bei Raumtemperatur in WB-Blockierungspuffer inkubiert. Der Primär-Antikörper wurde in einer für jeden Antikörper spezifischen Verdünnung in Blockierungspuffer bei 4°C über Nacht mit dem Filter inkubiert. Überschüssiger Primär-Antikörper wurde durch achtmaliges Waschen à 5 min mit WB-Waschpuffer entfernt. Der entsprechende Meerrettichperoxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper (DAKO, Glostrupp) wurde, wenn nicht anders angegeben, im Verhältnis 1:2000 in Blockierungspuffer verdünnt und mit dem Filter bei RT für 60 min inkubiert. Anschließend wurde der Filter achtmal 5 min mit WB-Waschpuffer gewaschen. Die ECL-Lösung wurde direkt vor der Detektion angesetzt. Es wurden 4 ml ECL-Lösung direkt auf die Membran gegeben und 4 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion durch das Auflegen eines Röntgenfilms.

## 2.4.3.6. Entfernung von Antikörper von Nitrozellulosemembranen

Stripping-Puffer:	
100 mM	2-Mercaptoethanol
2 % (w/v)	SDS
62,5 mM	Tris/HCl (pH 6,7)

Um sekundäre sowie primäre Antikörper wieder von der Nitrocellulose-Membran zu entfernen, wurde die Membran zunächst 15 min in WB-Waschpuffer gewaschen. Mit 10 ml Stripping-Puffer wurde die Membran 30 min bei 50°C im Hybridisierungsofen inkubiert und vor einem erneuten Blockierungsschritt nochmals 15 min mit WB-Waschpuffer gewaschen.

#### 2.4.4. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden Proteine einer Probe nach zwei verschiedenen Parametern aufgetrennt. Zuerst erfolgt eine isoelektrische Fokussierung der Proteine, hierbei erfolgt die Trennung der Proteine aufgrund ihrer Eigenladung. Die so getrennten Proteine werden anschließend in einer SDS-PAGE (siehe 2.4.3.3.) nach ihrer relativen Größe aufgetrennt. Diese Methode erlaubt es unter Umständen verschiedene Proteinisoformen bzw. posttranslationale Modifikationen darzustellen.

# 2.4.4.1. Herstellung von Ganzzellextrakten für die zweidimensionale Gelelektrophorese

Lysepuffer:	
8 M	Harnstoff
30 mM	Tris
15 mM	EDTA
Waschpuffer:	
7 M	Harnstoff
2 M	Thioharnstoff
0,3 %	CHAPS
20 mM	DeStreak <sup>™</sup>

Für die Zelllyse wurde jeweils eine konfluente T-75-Zellkulturflasche verwendet. Der Zellrasen wurde zunächst zweimal mit 20 ml auf 37°C erwärmten PBS gewaschen. Anschließend wurde die Flasche für 1 Minute in aufrechte Position gestellt, so dass sich rechtlicher Puffer am Boden der Flasche absetzen konnte. Der restliche Puffer wurde quantitativ entfernt. Auf die Zellen wurde nun 500 µl Lysepuffer gegeben und durch langsames Schwenken der Flasche gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt. Die Lyse der Zellen erfolgte über Nacht bei -20°C. Die Zellkulturflasche befand sich dabei in waagerechter Position, um eine gleichmäßige Verteilung des Lysepuffers zu gewährleisten. Am nächsten Tag wurde die Flasche aus dem Gefrierschrank genommen und 45 min auf dem Schwenkschüttler inkubiert. Mit dem Zellschaber wurden nun die Zellen vom Boden der Flasche gelöst und das Lysat in einer Ecke der Flasche zusammengeführt. Durch leichtes Schwenken der Flasche wurden nun große Teile der genomischen DNA vom Lysat abgetrennt und das Lysat quantitativ in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zugabe von 125 µl 9,8 M Harnstoff/ 6 % CHAPS und 15,76 µl DeStreak<sup>™</sup> (GE-Healthcare, Freiburg). Das Lysat wurde nun für 1 Stunde auf dem Schwenkschüttler inkubiert. Anschließend wurde das Lysat in ein größeres Reaktionsgefäß gefüllt und es wurden 2188  $\mu$ l 7 M Harnstoff / 2 M

Thioharnstoff sowie 16, 2  $\mu$ l DeStreak<sup>TM</sup> und 30  $\mu$ l 2 M Tris hinzugefügt. Restliche DNA wurde nun bei 16000 g für 15 min in der Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit dem Ultraschallprozessor behandelt. Das Lysat wurde nun für weitere 45 min auf dem Schwenkschüttler inkubiert und anschließend mit einer Vivaspin<sup>TM</sup> 500-Säule (Sartorius, Aubagne Cedex) auf ca. 100  $\mu$ l eingeengt. Das Lysat wurde zweimal mit jeweils 500  $\mu$ l Waschpuffer versetzt und anschließend auf 100  $\mu$ l eingeengt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration (siehe 2.4.3.2.) bestimmt.

## 2.4.4.2. Isoelektrische Fokussierung

Rehydrierungspuffer pH 4-7:		
8 M	Harnstoff	
2 M	Thioharnstoff	

Für die Isoelektrische Fokussierung wurden 7-cm-Immobiline<sup>TM</sup> pH-Bereich 4-7 Drystrips verwendet (GE-Healthcare, Freiburg). Die getrockneten Gelstreifen wurden vor der Fokussierung rehydriert. Es wurden 25  $\mu$ g Protein pro Gelstreifen aufgetragen. In einem Gesamtvolumen von 150  $\mu$ l wurden noch 0,81  $\mu$ l IPG-Puffer (pH-Bereich 4-7) und 3,6  $\mu$ l DeStreak<sup>TM</sup> (GE-Healthcare, Freiburg) zugesetzt. Zuletzt wurden Gelstreifen und Probe mit 2 ml Cover Fluid<sup>TM</sup> (GE-Healthcare, Freiburg) überschichtet. Der fertig befüllte Gelstreifenhalter wurde auf die IPGphor<sup>TM</sup> (GE-Healthcare, Freiburg) gelegt und das folgende Programm gestartet:

Rehydrierung 12 h 50 mA bei max. 20 °C

- 1. Schritt (Step and hold): 1h bei 500 V
- 2. Schritt (Step and hold): 1 h bei 1000 V
- 3. Schritt (Step and hold 5): h bei 8000 V

Nach der Isoelektrischen Fokussierung wurden die Gelstreifen umgehend für die Trennung in der zweiten Dimension verwendet oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

## 2.4.4.3. Gelelektrophoretische Auftrennung isoelektrisch fokussierter Proteine

Äquilibrierungspuffer:			
50 mM	Tris/HCl (pH 8,8)		
6 M	Harnstoff		
30 % (v/v)	Glycerin		
2 % (w/v)	SDS		
	Bromphenolblau		
frisch vor dem Gebrauch hinzugefügt:			
10 mg/ml	DTT		
25 mg/ml	Iodacetamid		

Für die elektrophoretische Auftrennung in der zweiten Dimension wurden 8%ige Polyacrylamidgele verwendet. Nach beendeter Isoelektrischer Fokussierung wurden die Gelstreifen zunächst in 3 ml DTT-haltigem Äquilibrierungspuffer in einer Hybridisierungsflasche für 12 min inkubiert. Es folgte eine weitere Inkubation für 12 min mit 3 ml Iodacetamid-haltigem Äquilibrierungspuffer. Nach der Inkubation wurde der Puffer vorsichtig abgegossen und der Gelstreifen in Laufpuffer gewaschen. Die Gelstreifen wurden vor dem Aufbringen an den Enden um jeweils 5 mm gekürzt. Der Gelstreifen wurde dann mit der Folie auf die längere der beiden Glasplatten der Gießkassette gelegt mit 100 µl Laufpuffer befeuchtet und mit einem Mikrospatel auf das obere Ende des Polyacrylamidgels geschoben, ohne dass dabei Luftblasen zwischen Gelstreifen und Gel gelangten. Neben das anodische Ende des Gelstreifens wurde ein Filterpapierstreifen, der mit 5 µl Proteinmarker beladen war, aufgebracht. Gelsteifen und Filterpapier wurden dann mit 1,5 ml 0,5% Agarose überschichtet und Luftblasen mit dem Mikrospatel entfernt. Das Gel wurde in die Laufkammer gespannt und die Elektrophorese gestartet. Es wurde eine Stromstärke von 25 mA pro Gel angelegt. Die Gele liefen so lange, bis der interne Standard der Bromphenolblau-Bande aus dem Gel gelaufen war. Die Detektion der aufgetrennten Proteine erfolgte im Western-Blot-Verfahren (siehe 2.4.3.) oder durch eine Färbung mit Comassie Brilliant Blue (siehe 2.4.4.4.).

## 2.4.4.4. Coomassie Brilliant Blue-Färbung von PAGE-Gelen

Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele aus den Gelkammern genommen. Die Glasplatten wurden vorsichtig aufgehebelt. Das obere Gelende wurde mit H<sub>2</sub>O befeuchtet und das Sammelgel mit einem Mikrospatel abgetrennt. Nun wurde das Gel vorsichtig in eine mit 250 ml Fixierlösung (40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Eisessig) befüllte Färbewanne gelegt. Das Gel wurde für 30 min in der Fixierlösung inkubiert. Danach wurde die Fixierlösung durch 250

ml Coomassie-Färbelösung (0,25% (w/v) Coomassie Blue R-250, Sigma) ersetzt. Das Gel wurde 2 h lang in der Färbelösung inkubiert, und diese anschließend abgegossen. Das Gel wurde nun 1 min in Entfärbelösung (25% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig) und dann über Nacht in 25% (v/v) Methanol entfärbt und anschließend in H<sub>2</sub>O gelegt.

## 2.4.5. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der auch als "Band-Shift"-Assay bezeichnete EMSA, dient dem spezifischen Nachweis der Bindung von Proteinen an DNA. Hierbei wird ein Zellkern-Extrakt, welches das zu analysierende Protein enthält, und ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment, welches die zu analysierende spezifische DNA-Sequenz enthält, in einer Bindungsreaktion inkubiert. Das Reaktionsgemisch wird anschließend mit Hilfe einer nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Bei einer spezifischen Bindung beobachtet man hier eine Verschiebung der markierten Bande in den höhermolekularen Bereich ("Band-Shift").

#### 2.4.5.1. Herstellung von Zellkern-Extrakten

Hypotoner Lysepuffe	er:		
10 mM	HEPES/KOH (pH 7,9 bei 4°C)		
1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>		
10 mM	KCL		
frisch vor dem Gebrauch hinzugefügt:			
0,5 mM	DTT		
0,2 mM	PMSF		
Hypertoner Lysepuffer:			
20 mM	HEPES/KOH (pH 7,9 bei 4°C)		
25 %	Glycerol		
420 mM	NaCl		
1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>		
1,5 mM 0,2 mM	MgCl <sub>2</sub> EDTA		
1,5 mM 0,2 mM frisch vor dem Gebra	MgCl <sub>2</sub> EDTA nuch hinzugefügt:		
1,5 mM 0,2 mM frisch vor dem Gebra 0,5 mM	MgCl <sub>2</sub> EDTA auch hinzugefügt: DTT		

Es wurden kultivierte, subkonfluente Zellen für die Herstellung der Zellkernextrakte verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden des Kulturgefäßes gelöst.  $2x10^6$  wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 3 min bei 3300 g und 4°C pelletiert. Der

Überstand wurde quantitativ entfernt. Die Zellen wurden nun in einem Volumen von 400 µl im hypotonen Lysepuffer durch vorsichtiges Pipettieren resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert. Nun erfolgte die Zugabe von 25 µl einer 10%igen (v/v) NP-40-Lösung. Die Probe wurde anschließend für 10 s bei maximaler Umdrehung auf dem Vortexer durchmischt. Es folgte eine Zentrifugation für 1 min bei 8000 g und 4°C. Der so erhaltene Überstand stellt die zytosolische Fraktion dar und wurde verworfen. Die sedimentierten Zellkerne wurden in 20-40 µl hypertonen Lysepuffer resuspendiert und 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden Zelltrümmer für 15 min bei 10000 g und 4°C abzentrifugiert. Der nun erhaltene Überstand stellt das Kernextrakt dar. Es wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe des Bradford-Protein-Assays (BIORAD, München nach Angaben des Herstellers bestimmt und die Extrakte in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

## 2.4.5.2. Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden

Die lyophilisierten Oligonukleotide (Con+, Con-, Mut+, Mut-, siehe Anhang) wurden in einer Konzentration von 20 pmol/ $\mu$ l in Oligonukleotid-Lagerungspuffer (10 mM Tris/HCl (pH 7,0), 1 mM EDTA) resuspendiert. In einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden 25,6  $\mu$ l H<sub>2</sub>O vorgelegt und jeweils 4  $\mu$ l der Oligonukleotidlösungen hinzugefügt. Es erfolgte die Zugabe von 1,6  $\mu$ l 0.5 M NaCl, 4,0  $\mu$ l 100 mM Tris/HCl (pH 7,5) und 0,8  $\mu$ l 50 mM EDTA (pH 8,0). Die Reaktionslösung wurde gemischt und für 2 min in ein 95°C warmes Wasserbad gestellt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß in ein auf 70°C erwärmtes Wasserbad gestellt. Das Wasserbad wurde ausgeschaltet und mitsamt der Reaktionslösung innerhalb von 2-3 h auf RT abgekühlt. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 10 min auf Eis gestellt. Für die weitere Verwendung wurde die Lösung aliquotiert und bei -20°C gelagert.

## 2.4.5.3. Herstellung von [γ-<sup>32</sup>P]-markierten Oligonukleotiden

Es wurden 2 µl komplementären Oligonukleotiden (2 pmol/µl bzw. 4 pmol/µl zu markierende 5'-Enden) in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Auf Eis erfolgte die Zugabe von 2 µl 10x T4 Polynukleotid Kinase Reaktionspuffer (New England Biolabs, Frankfurt a. M.), 11 µl H<sub>2</sub>O, 3 µl 5'-[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3000 Ci/mmol) und 2 µl T4 Polynukleotid Kinase (10000 U/ml, New England Biolabs, Frankfurt a. M.). Die Reaktionslösung wurde 60 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Kinase wurden anschließend 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) hinzugefügt. Zum Entfernen nicht-eingebauter Nukleotide wurden Probe Quant G-50 Mikrosäulen (GE-Healthcare, Freiburg) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Elutionsvolumen betrug 50 µl. 1 µl der erhaltenen Lösung wurden in 3 ml Szintillations-Lösung gegeben und die

Cerenkow-Counts mit Hilfe des "easy-count"-Programms im Szintillations-Zähler (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) bestimmt.

## 2.4.5.4. Bindungsreaktion

<u>3x Bindungspuffer:</u>	
60 mM	HEPES/KOH (pH 7,9 bei 4°C)
180 mM	KCl
3 mM	DTT
3 mM	EDTA
900 µg/ml	BSA
36 % (v/v)	Glycerol

Jede Bindungsreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 21 µl angesetzt und auf Eis zusammen pipettiert. Es wurden 7 µl 3x Bindungspuffer vorgelegt. Zur Blockierung unspezifischer DNA-Bindung wurde zu jeder Probe poly(dIdC)-Lösung (Roche, Karlsruhe) zu einer Endkonzentration von 50 ng/µl gegeben. Je nach Zusammensetzung der Bindungsreaktion erfolgte nun die Zugabe von 2 µl Zellkernextrakt (1,5 µg/µl, siehe 2.4.5.1.), 1 µl nicht-markierter Oligonukleotid-Lösung (2 pmol/µl) und 1 µl markierter Oligonukleotid-Lösung (100000 cpm/µl, siehe 2.4.5.3.). Das restliche Volumen wurde mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Bindungsreaktion erfolgte für 60 min auf Eis.

## 2.4.5.5. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

10x TBE-Puffer:	
890 mM	Tris
890 mM	Borsäure
20 mM	EDTA

Ein 4% iges Polyacrylamid-Gel wurde am Tag vor der Gelelektrophorese durch Mischen von 13,33 ml Protogel-Lösung (30 %, National Diagnostic, USA), 5 ml 10x TBE-Puffer, 81,67 ml H<sub>2</sub>O, 600  $\mu$ l APS (10%) und 100  $\mu$ l TEMED hergestellt und in eine vertikale Gelelektrophorese-Apparatur (20 cm x 20 cm) gegossen. Die Polymerisation des Gels erfolgte bei 4 °C über Nacht im Kühlraum. Vor dem Auftragen der Bindungsreaktions-Lösungen erfolgte eine Äquilibrierung des Gels durch einen Vorlauf. Hierfür wurde zunächst der Kamm aus dem Gel gezogen und die Taschen mit 0,5 x TBE-Puffer gespült und anschließend 10  $\mu$ l 1x DNA-Ladepuffer (siehe 2.3.9.) in eine Tasche aufgetragen. Für die Elektrophorese wurde 0,5-facher TBE-Puffer als Laufpuffer verwendet. Der Vorlauf erfolgte für 45 min bei 200V.

Die elektrophoretische Auftrennung der Bindungsreaktionen erfolgte für 2 h bei 250 V. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel für 2 h auf dem Geltrockner (BIORAD, München) unter Vakuum bei 80°C getrocknet. Das getrocknete Gel wurde in eine Röntgenfilmkassette überführt und es erfolgte zunächst ein Röntgenfilm über Nacht bei -80°C exponiert.

## 2.4.6. Immunzytochemische Färbung von Zellen

Zellen wurden auf Vierkammer-Objektträgern (Nunc, Wiesbaden) ausgesät. Vor der Färbung wurde zweimal mit jeweils 750µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 4% Formaldehyd in PBS für 15 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit jeweils 750 µl PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen mit 0.1% Triton X-100 in PBS für 15 min bei RT behandelt und anschließend dreimal mit jeweils 750 µl PBS gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen mit 1% (w/v) BSA in PBS für 30 min bei RT inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in geeigneter Verdünnung in 1% (w/v) BSA in PBS verdünnt und für 90 min bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen viermal mit 750 µl PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 donkey anti-rabbit IgG) wurde im Verhältnis 1:500 in 1% (w/v) BSA in PBS verdünnt und für 90 min im Dunkeln mit den Zellen inkubiert. Die Zellen wurden nun einmal mit 750 µl PBS gewaschen. Zur unspezifischen Färbung der Zellkerne wurden 2 µl DAPI-Färbelösung in 10 ml PBS verdünnt und jeweils 500 µl dieser Lösung auf die Zellen gegeben und 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 750 µl PBS gewaschen. Zur Entfernung der Plastikkammern von dem Objektträger wurden 500 µl 70% Ethanol in die Kammern gefüllt und 10 min inkubiert. Dies führte zu einer Auflösung des Klebstoffes, so dass die Plastikkammern entfernt werden konnten. Restliche Klebereste wurden mechanisch entfernt. Die Zellen wurden abschließend in jeweils 30 µl Mowiol (siehe 2.4.7.) eingebettet und bis zur Begutachtung an einem dunklen Ort gelagert. Die gefärbten Zellen wurden bei 40facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop (Fa. Leica, Type DM LB) begutachtet. Die Bildaufnahme erfolgte mit dem digitalen Bildverarbeitungssystem KAPPA (KAPPA opto-electronics GmbH, Gleichen).

## 2.4.7. Herstellung von Mowiol

Zur Herstellung der Mowiollösung wurden zuvor 6g Glycerin mit 2.4 g Mowiol Typ 4-88 in einem 50-ml-Reaktionsgefäß verrührt und nach Zugabe von 6 ml  $H_2O$  auf einem Drehschüttler vermischt. Nach Zugabe von 12 ml 200 mM Tris/HCl (pH 8,5) wurde die Lösung für 10 min auf 50°C erwärmt und nach dem Abkühlen auf RT 15 min mit 5000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand bei -20°C aufbewahrt. Die jeweilige Gebrauchslösung wurde bei 4°C gelagert und vor Gebrauch auf RT erwärmt.

## 2.4.8. Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten

Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete Gewebeschnitte wurden zunächst deparaffiniert und anschließend im Dampfdruckinkubator (BioGenex, San Ramon, USA) für 5 min in Zitrat-Puffer (BioGenex, San Ramon, USA) bei 125°C inkubiert. Die Schnitte wurden nun dreimal für 3 min mit TBS, 0.05% Tween 20 gewaschen. Endogene Peroxidase-Aktivität wurde durch eine Behandlung mit 100 µl DAKO REAL<sup>TM</sup> (Fa. DAKO, Glostrupp) nach Herstellerangaben blockiert. Anschließend wurden die Schnitte wiederum dreimal 3 min mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:500 über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Schnitte dreimal 3 min mit TBS-T gewaschen. Die Schnitte wurden 15 min bei RT mit 150 µl DAKO REAL<sup>TM</sup> Envision<sup>TM</sup>/HRP (Fa. DAKO, Glostrupp) inkubiert und erneut dreimal 3 min mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion wurde 10 min mit DAB (3,3'-Diaminobenzidine inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 2 s mit der Hemalaun-Lösung (Merck, Darmstadt) durchgeführt, hierfür wurden die Schnitte für 2 s mit der Hemalaun-Lösung behandelt und anschließend mit H<sub>2</sub>O 2 min gewaschen.

# 3. Ergebnisse

## 3.1. Retrovirale cDNA-Expressionsklonierung von Proto-Onkogenen

Das Ziel dieses Promotionsvorhabens war es, neue Proto-Onkogene zu identifizieren, die möglicherweise eine Rolle bei der Initiation und Progression des humanen Mammakarzinoms spielen könnten. Zu diesem Zweck wurde ein experimenteller Ansatz, den man als "Retrovirus-vermittelte cDNA-Expressionsklonierung von Proto-Onkogenen" bezeichnen kann, durchgeführt. Das Prinzip dieses experimentellen Ansatzes ist in Abb. 5 dargestellt.



Abb. 5: Prinzip der Retrovirus-vermittelten cDNA-Expressionsklonierung von Proto-Onkogenen

Dieser Ansatz beruht auf der Generierung einer retroviralen cDNA-Expressionsbibliothek, die durch transiente Transfektion in die ecotrophe Verpackungs-Zelllinie Phoenix-eco in Retroviren konvertiert wird. Die so erzeugten Retroviren werden dann zur Infektion präneoplastischer, muriner NIH3T3-Fibroblasten, die sich durch Kontaktinhibition auszeichnen, verwendet. Zellen, die durch Integration eines Retrovirus und Expression des entsprechenden Transgens die Kontaktinhibition verlieren, lassen sich ca. 14 Tage nach Erreichen der Zellkonfluenz makroskopisch als sogenannte Foki identifizieren. Nach Isolation genomischer DNA aus den expandierten Zellklonen kann die jeweils als Provirus in das Wirtsgenom integrierte cDNA mittels PCR amplifiziert werden. Die Verwendung von Oligonukleotiden, die sich vom retroviralen Vektor ableiten und somit die inserierten cDNA-Sequenzen flankieren, erlaubt die exakte Wiedererzeugung des parentalen Plasmids. Dieser Arbeitsschritt ist immer dann wichtig, wenn ein Zellklon mehrere retrovirale Integrationen aufweist oder der Selektionsprozeß nicht gleich nach einer Selektionsrunde zu genetisch homogenen Zellpopulationen führt. Eine zweite Selektionsrunde mit individuellen Plasmiden statt mit der gesamten retroviralen cDNA-Expressionsbibliothek führt dann zur Identifizierung von Proto-Onkogenen, die eine Aufhebung der Kontaktinhibition und maligne Transformation der NIH3T3-Fibroblasten bewirkt haben.

#### 3.1.1. Herstellung der retroviralen cDNA-Expressionsbibliothek

Zur Herstellung der retroviralen cDNA-Expressiomsbibliothek wurde mRNA aus der Zelllinie GI-101 verwendet, die zweifach mit oligo(dT)-Agarose aufgereinigt wurde (siehe 2.3.12.1.). Um die Reinheit und die Qualität der mRNA zu überprüfen, wurde nach Abschluss der Isolierung eine gelelektrophoretische Analyse durchgeführt. Dies erlaubte den Vergleich der aufgereinigten Fraktionen mit einer Gesamt-RNA-Präparation aus GI-101-Zellen (Abb. 6).



Abb. 6: Gelelektrophoretische Analyse verschiedener RNA-Proben. Analysiert wurden Gesamt-RNA aus GI-101-Zellen sowie mRNA nach einfacher und zweifacher Aufreinigung mit oligo(dT)-Agarose. In jeder Bahn wurden 5 µg RNA geladen. Die Laufhöhe der ribosomalen 28S- und 18S-rRNA wurden markiert.

Im Zuge der Aufreinigung der mRNA mit oligo(dT)-Agarose konnten die Verunreinigungen durch ribosomale RNA erfolgreich entfernt werden. Außerdem erkennt man, dass die mRNA keine erkennbare Degradation aufweist. Es konnte somit gezeigt werden, dass sich diese mRNA-Präparation zur Herstellung einer cDNA-Expressionbibliothek eignet.

Um die mRNA in komplementäre DNA umzuschreiben, erfolgte eine cDNA-Erststrangsynthese unter Verwendung von Hexaoligonukelotiden. Für die Erststrangsynthese wurden 5 µg der gereinigten mRNA verwendet. Nach Beendigung der Erststrangsynthese wurde die Ausbeute der Reaktion anhand inkorporierter,  $[\alpha^{-32}P]$ -markierter Oligonukelotide bestimmt. Es wurde eine relativen Ausbeute von 40% ermittelt.

Für die Zweitstrangsynthese wurde die gesamte Reaktion der Erststrangsynthese verwendet. Um zu verhindern, dass zu kleine cDNA-Fragmente in den Vektor inserieren, wurde die cDNA nach erfolgreicher Adapterligation und Phosphorylierung mittels Gelfiltration chromatographisch aufgetrennt. Um möglichst große cDNA-Fragmente zu klonieren, wurden die zwei ersten Elutions-Fraktionen verwendet, deren spezifische Aktivität deutlich über der Hintergrundstrahlung lag. Die erhaltene cDNA-Lösung hatte ein Volumen von 120 μl und eine DNA-Konzentration von 1 ng/μl. Diese cDNA wurde anschließend mit 400 ng BstXIverdauten pMXs-Vektor ligiert. Jeweils 1 μl des Ligationsansatzes wurde für eine Elektroporation von DH10B-*E.coli*-Bakterien verwendet. Anschließend wurden die 24 Elektroporations-Ansätze vereinigt. Diese Bakteriensuspension stellt die unamplifizierte cDNA-Expressionsbibliothek im retroviralen Vektor pMXs dar.

#### 3.1.2. Charakterisierung der retroviralen cDNA-Expressionsbibliothek

Um zu ermitteln, ob sich die hergestellte cDNA-Expressionsbibliothek für weiterführende Experimente eignet, wurden die Eigenschaften der unamplifizierten cDNA-Bibliothek genauer analysiert. Zur Bestimmung der Anzahl unabhängiger Klone der unamplifizierten Bibliothek wurde eine Testplattierung ausgeführt und am folgenden Tag die Anzahl der Klone bestimmt. Außerdem wurden der Prozentsatz rekombinanter Klone und die durchschnittliche Größe der klonierten cDNA-Fragmente bestimmt, indem Plasmid-DNA, die aus 20 zufällig ausgewählten Bakterienklonen isoliert wurde, durch eine Restriktionsanalyse mit den Restriktionsenzymen BamHI und SalI analysiert wurde (Abb. 7).



Abb. 7: Restiktionsanalyse von Plasmid-DNA aus 20 zufällig ausgewählten Bakterienklonen der unamplifizierten cDNA-Expressionsbibliothek der humanen Mammakarzinom-Zelllinie GI-101. Die cDNA-Fragmente wurden durch Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen BamHI und SalI aus dem retroviralen Vektor pMXs herausgeschnitten. Ein Restriktionsverdau des leeren pMXs-Vektors diente als Kontrolle. Flankierend zu den analysierten Proben wurde DNA-Größenstandard auf das Gel aufgetragen.

In Tab. 5 sind die ermittelten Charakteristika der unamplifizierten, retroviralen cDNA-Expressionsibliothek zusammengefasst.

Merkmal	
Anzahl unabhängiger Klone	$\sim 2 \mathrm{x} 10^7$
Größenbereich der inserierten cDNAs	0,3 - 5,0 kb
Durchschnittliche Insertgröße	~ 1,3 kb
Anteil rekombinanter Klone	> 95%

 Tab. 5: Charakteristika der unamplifizierten retroviralen cDNA-Expressionsibliothek

Diese Daten zeigen, dass es gelungen ist, eine retrovirale cDNA-Expressionsbibliothek von hoher Qualität herzustellen, die sich für die Durchführung eines genetischen "Screenings" eignet.

#### 3.1.3. Standardisierung des retroviralen Gentransfers

wichtige Eine Voraussetzung für das Gelingen einer retroviralen cDNA-Expressionsklonierung ist ein hohes Maß an Standardisierung des retroviralen Gentransfers. So könnte eine zu hohe Infektionsrate das Wiederfinden der Phänotyp-übertragenden cDNA-Fragmente erschweren oder gar unmöglich machen. Umgekehrt bedeutet eine zu geringe Infektionsrate, dass wenige cDNA-Fragmente retroviralen cDNAzu der Expressionsbibliothek in Hinblick auf die transformierenden Eigenschaften der jeweiligen Genprodukte untersucht werden.

Vorexperimente zeigten, dass eine 20-30% ige Infektion der Zielzellen in einer angestrebten Anzahl von 1 bis 3 retroviralen Integrationen pro Zelle resultiert. Die Standardisierung erfolgte mit Hilfe des pMX-IG-Expressionsplasmids. Dieses Plasmid besitzt alle Eigenschaften des pMXs-Vektors und trägt zudem eine für des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) kodierende cDNA. Durch dieses Reportergen ist eine direkte Bestimmung der retroviralen Gentransfer-Effizienz möglich. Die standardisierte Herstellung des retroviralen Überstandes erfolgte wie unter 2.2.5. beschrieben. Anschließend wurden verschiedene Volumina des retroviralen Überstandes zur Infektion von NIH3T3-Zellen verwendet. Die infizierten Zellen wurden anschließend fixiert und die Zellkerne mit dem DAPI-Farbstoff markiert. Die Infektionsrate ergibt sich aus dem Verhältnis der GFP-exprimierenden Zellen zur Gesamtzahl der Zellen.

Tab. 6: Bestimmung der Infektionsrate in Abhängigkeit vom       eingesetzten Volumen an retroviralen Zellkulturüberstand			
eingesetztes Volumen an retroviralem Überstand	250 µl	500 µl	1000 µ1
Gentransfer-Effizienz	18%	25%	38%

Die Ergebnisse zeigen, dass bei der Verwendung von 750  $\mu$ l unter Standardbedingungen hergestellten, retroviralen Überstand eine Infektionsrate von ca. 30 % zu erwarten ist.

#### 3.1.4. Identifizierung von Proto-Onkogenen mittels des Fokus-Assay

Für die phänotypische Selektion transformierender cDNA-Fragmente wurden Kontaktinhibierte NIH3T3-Zellen mit der retroviralen cDNA-Expressionsbibliothek transduziert und anschließend für zwei Wochen kultiviert. Zellklone, die von einem Proto-Onkogen-tragenden Retrovirus infiziert wurden, wuchsen in dieser Zeit zu einem sogenannten Fokus aus (Abb. 8).



Abb. 8: Phänotypische Selektion transformierender cDNA-Fragmente mittels Fokus-Assay. NIH3T3-Zellen wurden mit der retroviralen cDNA-Expressionsbibliothek transduziert und anschließend zwei Wochen ohne Passagierung kultiviert. Gezeigt ist NIH3T3-Zellrasen ohne Fokusbildung (A) und drei Beispiele für eine Fokusbildung nach zweiwöchiger Inkubationszeit (B-D).

Da die NIH3T3-Zellen zu spontaner Transformation neigen, wurden parallel zu den infizierten Zellen zwei Zellkulturschalen mit unbehandelten Zellen als Negativ-Kontrolle kultiviert. Wie in Abb. 8 gezeigt ist die Morphologie der Foki nicht uniform. In den beiden Zellkulturschalen der Negativ-Kontrolle kam es im Durchschnitt zur Bildung von 2 Foki pro Zellkulturschale. In den Kulturschalen, die mit retroviralem Überstand behandelt wurden, lag die Frequenz der Fokusbildung zwischen 5 und 6 Foki pro Schale. Dies deutet darauf hin, dass die retrovirale Infektion der Zellen mit der retroviralen cDNA-Expressionbibliothek zur vermehrten Fokusbildung geführt hat. Alle 65 Foki, die sich in den mit retroviralem Überstand behandelten Kulturschalen gebildet hatten, konnten erfolgreich als stabil transformierte Zelllinien etabliert werden.

## 3.1.5. Reklonierung der als Provirus in das Wirtsgenom integrierten cDNA-Fragmente

Um die Identität der ins Wirtsgenom integrierten cDNA-Fragmente identifizieren zu können und deren transformierenden Eigenschaften in einer zweiten Selektionsrunde zu bestätigen, war eine Reklonierung der Fragmente in den Plasmidvektor pMXs nötig. Hierfür wurde zunächst aus allen expandierten Zellklonen des Fokus-Assays genomische DNA extrahiert. Zur PCR-Amplifikation der in das Wirtsgenom integrierten cDNA-Fragmente wurden die Oligonukleotid-Primer PMXS-1 und PMXS-2 verwendet. Beide Primer sind spezifisch für Sequenzen des pMXs-Vektors und flankieren die proviralen cDNA-Sequenzen, so dass PCR-Amplifikation jedes cDNA-Fragments aus der genomischen DNA der expandierten Foki möglich war. Abb. 9 zeigt exemplarisch die gelelektrophoretische Analyse der Amplifikationsprodukte von zehn expandierten Zellklonen.



Abb. 9: PCR-Amplifikations-Produkte von cDNA-Fragmenten, die als Provirus in das Genom von 10 expandierten Foki integriert sind. Die PCR-Reaktion erfolgte durch Verwendung der Vektor-spezifischen Primer PMXS-1 und -2. Flankierend zu den 10 PCR-Reaktionen sind zwei DNA-Größenstandards aufgetragen.

In der überwiegenden Anzahl der Reaktionen wurden mehrere PCR-Produkte gebildet, die sich auf multiple provirale Integrationen zurückführen lassen. Außerdem ist eine Kontamination der expandierten Zellklone mit nicht-transformierten, aber dennoch retroviraltransduzierten NIH3T3-Zellen wahrscheinlich. Für die Reklonierung der PCR-Produkte in den retroviralen Vektor pMXs wurden nur Hauptamplifikationsprodukte verwendet. Es wurden insgesamt 184 Expressionsplasmide aus den Amplifikationsprodukten der 65 Reaktionsansätze hergestellt, die als singuläre Plasmide einer zweiten Selektionsrunde im Fokus-Assay unterworfen wurden. Stellte sich hierbei eine erneute morphologische Transformation der NIH3T3-Zellen ein, wurde das entsprechende Expressionsplasmid sequenziert. Für 31 der 184 getesteten cDNAs konnten transformierende Eigenschaften in der zweiten Selektionsrunde bestätigt werden.

## 3.1.6. Ergebnis der retroviralen Expressionsklonierung

Die für ein mögliches Proto-Onkogen kodierenden Expressionsplasmide wurden beidseitig unter Verwendung der Primer PMXS-1 und -2, die das jeweilige cDNA-Fragment flankieren, ansequenziert. Die ermittelten Sequenzen wurden mit Hilfe einer BLASTN-Analyse (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) mit Datenbankeinträgen humaner Sequenzen verglichen. So wurde ermittelt, dass sich die 31 transformierenden cDNA-Fragmente von insgesamt 17 unterschiedlichen Genen ableiteten. Sieben der identifizierten Gene sind bisher noch nicht als Proto-Onkogene bekannt, so dass ein wesentliches Ziel dieses Promotionsvorhabens, nämlich die Identifikation von unbekannten Proto-Onkogen, erreicht werden konnte. Darüber hinaus ist die Identifikation von bereits charakterisierten Proto-Onkogenen ein Beleg dafür, dass sich der gewählte experimentelle Ansatz der Retrovirus-vermittelten cDNA-Expressionsklonierung zur Identifizierung von Proto-Onkogenen eignet.

Tab. 7 fasst die Ergebnisse der retrovirus-vermittelten cDNA-Expressionsklonierung von Proto-Onkogenen zusammen. Die identifizierten Gene sind entsprechend der subzellulären Lokalisation bzw. der möglichen Funktion der entsprechenden Genprodukte einer der folgenden Katagorien zugeordnet: Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Signalweiterleitende Moleküle und Transkriptionsfaktoren. Gene bzw. Genprodukte, die sich nicht eindeutig einer dieser Kategorien zuordnen ließen, sind unter der Rubrik "Sonstige Gene" zusammengefasst.

## 3.2. Expression der identifizierten Gene in humanen Mammakarzinom-Zelllinien

Um ein Gen für weiterführende, funktionelle Studien auszuwählen, wurden Northern-Blot-Hybridisierungen durchgeführt. In dieser Analyse wurde die Expression von sechs Genen, die bisher nicht als Proto-Onkogen beschriebenen wurden, in zehn humanen Mammakarzinom-Zelllinien analysiert. Außerdem erfolgte die Expressionsanalyse der bereits als Onkogen bekannten Gene LTβR und TCB1D3, deren Bedeutung für die Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms noch unbekannt ist. Hierzu wurden die entsprechenden cDNAs mittels PCR amplifiziert und nach radioaktiver Markierung für die Northern-Blot-Hybridisierung eingesetzt. Die immobilisierte Gesamt-RNA wurde aus 10 unterschiedlichen humanen Mammakarzinom-Zelllinien isoliert.

Gen-Name	Gen-Symbol	Genebank-Nr.	Länge und Region der klonierten cDNA	Anzahl Klone	Kodiertes Protein*	
Wachstumsfaktoren						
	keine c	DNA-Klone identif	iziert			
	Wachs	tumsfaktor-Rezept	toren			
Lymphotoxin Beta Rezeptor	LTβR	NM_002342	760 bp / 655-1415	3	С	
]	Moleküle der in	trazellulären Signa	lweiterleitung			
v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	RAF1	NM_002880	2321 bp / 374-2695	1	К	
ARHGEF1 Rho guanine nucleotide exchange factor 1	ARHGEF1	NM_004707.3	1405 bp / 1047-2452 2045 bp / 91-2136 2131 bp / 327-2458	1 1 1	N+C C N+C	
ARHGEF2 Rho guanine nucleotide exchange factor 2	ARHGEF2	NM_004723.2	2595 bp / 306-2901 3538 bb / 385-3923	1 1	N+C N	
ARHGEF5 Rho guanine nucleotide exchange factor 5	ARHGEF5	NM_005435.3	1885 bp / 3339-5224	4	Ν	
ARHGEF19 Rho guanine nucleotide exchange factor 19	ARHGEF19	NM_153213.2	1960 bp / 383-2343	1	Ν	
Ras homolog gene family, member A	RHOA	NM_001664.2	1092 bp / 1-1092	1	К	
Guanine nucleotide binding protein, alpha 13	GNA13	NM_006572.3	3261 bp / 39-3298	1	K	
vav2 nucleotide exchange factor	VAV2	NM_003371.2	2635 bp / 512-3147	1	Ν	
TBC1 domain family, member 3	TBC1D3	NM_032258.1	1416 bp / 95-1511 1836 bp / 95-1931	3 3	C G	
PCTAIRE protein kinase 1	PCTK1	NM_006201.3	373 bp / 1795-2168	1	N+C	
Drebrin-like**	DBNL	NM_001014436	794 bp / 399-1193	1	N+C	
Transkriptionsfaktoren						
Ras responsive element binding protein 1	RREB1	NM_001003699	1313 bp / 183-1496	1	С	
v-fos FBJ murine sarcoma viral oncogene	FOS	NM_005252.2	992 kb / 2-994	1	С	
Grainyhead-like 2	GRHL2	NM_024915.1	2390 kb / 1-2390 3459 kb / 1-3459	1 1	K K	
Sonstige Gene***						
Leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 4	LRCH4	NM_002319.3	1017 kb / 7-1024	1	С	
Chromosome 14 open reading frame 108	C14orf108	NM_018229.2	1480 kb / 146-1626	1	С	

Tab. 7: Gene mit transformierenden Eigenschaften, die im Zuge der retroviralen cDNA-Expressionsklonierung identifiziert werden konnten

Bisher unbekannte Proto-Onkogene sind in der Tabelle dunkel hinterlegt

\* Deletionen des von der cDNA kodierten Proteins: K: komplettes Protein; C: C-terminal trunkiert; N: N-terminal trunkiert; N+C: N- und C-terminal trunkiert

\*\* Die cDNA dieses Gens war in "Antisense"-Orientierung in der retroviralen Vektor pMXs inseriert \*\*\* Diese Kategorie umfasst Gene, deren Genprodukte sich funktionell nicht eindeutig einer der anderen Kategorien zuordnen lassen



Abb. 10: Northern-Blot-Analyse von humanen Mammakarzinom-Zelllinien. Für die Hybridisierungen wurden <sup>32</sup>P-markierte cDNA-Fragmente der angegebenen Gene verwendet. Als Ladekontrolle diente ein Ethidium-Bromid-gefärbtes Agarosegel. Die Lauffront der 28S- und 18S-rRNA sind am Rand markiert.

Aus den in Abb. 10 dargestellten Ergebnissen der Northern-Blot-Hybridisierungen ist zu erkennen, dass sich Gentranskripte aller acht Kandidatenge in kultivierten Mammakarzinom-Zelllinien nachweisen lassen. Darüber hinaus konnten zumindest für das LRCH4- und das C14orf108-Gen in der Northern-Blot-Analyse auch multiple Gen-Transkripte nachgewiesen werden, die möglicherweise durch alternatives Spleißen der Primärtranskripte generiert werden.

Aus den Resultaten ist erkennbar, dass alle acht Gene, die in der Northern-Blot-Analyse analysiert wurden, eine Expression in den untersuchten Zelllinien und somit eine mögliche physiologische Relevanz für das humane Mammakarzinom besitzen und sich prinzipiell für weiterführende Expressionsstudien und funktionellen Analysen eignen.

#### 3.3. Transformierende Eigenschaften des GRHL2-Proteins

Aufgrund des sehr interessanten biologischen Hintergrundes und der bisher fehlenden, funktionellen Charakterisierung wurde der Transkriptionsfaktor GRHL2 für weiterführende Studien ausgewählt (siehe auch 4.3.). Um die transformierenden Eigenschaften des GRHL2-Gens genauer zu untersuchen, sollten NIH3T3-Zellen stabil mit einem GRHL2-kodierenden Expressionsplasmid transfiziert werden. Die hergestellten Transfektanden sollten in verschiedenen Transformations-Assays hinsichtlich der Zellmorphologie, der Teilungsaktivität, des Potentials zum Substrat-unabhängigen Wachstum und der Fähigkeit zur Tumorbildung *in vivo* analysiert werden. Bei allen durchgeführten Experimenten dienten parentale und Vektor-transfizierte sowie NIH3T3-Zellen mit einer Überexpression des gut charakterisierten Onkogens RAF1 als Negativ- bzw. Positivkontrollen.

## 3.3.1. Stabile Transfektion von NIH3T3-Zellen mit einem GRHL2-Expressionsplasmid

Zur Herstellung von Zellklonen mit stabiler GRHL2-Überexpression wurde die GRHL2cDNA unter Verwendung der Oligonukleotid-Primer BOMFL-f und BOMFL-r aus cDNA von GI-101-Zellen amplifiziert und in den bicistronischen Expressionsvektor pIRES-N1 kloniert. Mit diesem Expressionsplasmid wurden NIH3T3-Zellen transfiziert und anschließend Zellklone durch Zugabe von Geneticin zum Zellkulturmedium selektioniert. Um einen Zellklon mit besonders starker GRHL2-Proteinexpression für die Transformations-Assays auszuwählen, wurde die GRHL2-Proteinexpression in den hergestellten Zelllinien durch eine Western-Blot-Analyse untersucht.



Abb. 11 Western-Blot-Analyse von NIH3T3-Zellklonen mit stabiler GRHL2-Überexpression. Ganzzellextrakte von Geneticin-resistenten Zellklonen wurden einer Western-Blot-Analyse mit dem anti-GRHL2-Peptid-1-Antikörper unterzogen. Zur Kontrolle der geladenen Proteinmengen diente eine Western-Blot-Analyse des HSC-70-Proteins.
In Abb. 11 ist exemplarisch die Western-Blot-Analyse von zwölf GRHL2überexprimierenden Zellklonen gezeigt. Der für die Durchführung der Transformations-Assays ausgewählte Zellklon, für den die höchste GRHL2-Expression ermittelt wurde, wird im Folgenden als NIH3T3/GRHL2 bezeichnet.

# 3.3.2. GRHL2 induziert eine morphologische Transformation von NIH3T3-Zellen

Veränderungen der Zellmorphologie stellen ein wichtiges Merkmal der Transformation von NIH3T3-Zellen dar. Um die Morphologie GRHL2-überexprimierender Zellen im Vergleich zu den parentalen und Vektor-transfizierten sowie den RAF1-überexprimierenden NIH3T3-Zellen beurteilen zu können, wurden die Zellen bei 40-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop begutachtet.



Abb. 12: Vergleich der Morphologie von parentalen, Vektor-transfizierten sowie von RAF1- und GRHL2überexprimierenden NIH3T3-Zellen. Die Zellen wurden bei einer 50%igen Konfluenz im Lichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung begutachtet.

Die parentalen und Vektor-transfizierten NIH3T3-Zellen wachsen geordnet und haben eine flache Zellmorphologie. Im Vergleich dazu sind GRHL2-überexprimierende NIH3T3-Zellen kleiner und wachsen ungeordnet. Des Weiteren sind die GRHL2-überexprimierenden Zellen stark lichtbrechend, so dass die Zellen im Lichtmikroskop besser sichtbar sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des GRHL2-Gens zur morphologischen Transformation der NIH3T3-Zellen führt.

## 3.3.3. GRHL2 bewirkt eine Steigerung der Teilungsaktivität von NIH3T3-Zellen *in vitro*

Um den Einfluss der GRHL2-Expression auf die Zellteilung zu bestimmen, wurde die Teilungsaktivität von GRHL2-überexprimierenden Zellen mit der Teilungsaktivität von parentalen, Vektor-transfizierten und RAF1-überexprimierenden NIH3T3-Zellen verglichen. Die Auftragung der ermittelten Zellzahlen gegen die Inkubationsszeiten ist in Abb. 13 dargestellt.



Abb. 13: Proliferations-Analyse von parentalen, Vektor-transfizierten sowie von RAF1- und GRHL2überexprimierenden NIH3T3-Zellen. Es wurden die ermittelten Zellzahlen der verschiedenen NIH3T3-Zellen gegen die Inkubationszeiten aufgetragen.

Die Proliferationsanalyse zeigt, dass die GRHL2-Expression in NIH3T3-Zellen eine deutliche Zunahme der Teilungsaktivität bewirkt. Der beobachtete Effekt liegt dabei sogar deutlich über dem Anstieg der Proliferation, der durch die Expression des RAF1-Gens in den NIH3T3-Zellen induziert wird.

# 3.3.4. GRHL2 induziert ein Substrat-unabhängiges Wachstum von NIH3T3-Zellen

Ein weiteres Merkmal transformierter Zellen, stellt die Fähigkeit dar, ohne die Anhaftung an ein festes Substrat proliferieren zu können. Um diese Eigenschaft *in vitro* zu untersuchen, wurde ein Soft-Agar-Assay durchgeführt. Die zu untersuchenden Zellen wurden in Agarhaltigem Zellkulturmedium ohne Anheftung an ein festes Substrat kultiviert. Abb. 14 zeigt repräsentative Zellkolonien der untersuchten Zelllinien, die im Laufe des Experiments entstanden sind.



Abb. 14: Analyse des Substrat-unabhängigen Wachstums von parentalen, Vektor-transfizierten sowie von RAF1- und GRHL2-überexprimierenden NIH3T3-Zellen. Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von repräsentativen Zellkolonien bei 20-facher Vergrößerung der unterschiedlichen NIH3T3-Zellen, die sich nach zweiwöchiger Inkubation im Soft-Agar gebildet haben.

In den Zellkulturgefäßen der parentalen und Vektor-transfizierten Zellen kam es nicht zur Bildung von Zellkolonien im Soft-Agar. Nur vereinzelt konnten Zwei- und Vierzellstadien beobachtet werden. NIH3T3-Zellen, die das RAF1- oder GRHL2-Gen überexprimieren, sind hingegen in der Lage, ohne Anheftung an die Kulturschale zu proliferieren und Kolonien im Soft-Agar zu bilden. Dabei konnte kein Unterschied in Größe und Frequenz der Kolonien der beiden Zelllinien festgestellt werden. Durch die Expression des GRHL2-Gens erhalten die NIH3T3-Zellen also die Fähigkeit zum substratunabhängig Wachstum.

### 3.3.5. **GRHL2** induziert Tumorwachstum von NIH3T3-Zellen in immundefizienten Mäusen

Um das Tumorwachstum der GRHL2-überexprimierenden NIH3T3-Zellen in vivo zu untersuchen, wurden diese Zellen in immundefiziente Mäuse implantiert (siehe 2.2.9.). Parallel erfolgte die Implantation der als Kontrolle dienenden, parentalen und Vektortransfizierten sowie der RAF1-überexprimierenden NIH3T3-Zellen. Pro Zelllinie wurden fünf Mäuse injiziert. In Abb. 15 ist exemplarisch eine Maus aus jeder Gruppe gezeigt.



NIH3T3

NIH3T3/ Vektor

NIH3T3/ RAF1

NIH3T3/ GRHL2

Abb. 15: Analyse des Tumorwachstums verschiedener NIH3T3-Zellen in vivo. 2x10<sup>6</sup> der entsprechenden NIH3T3-Zellen wurden subkutan zwischen die Schulterblätter von immundefizienten NMRI-Mäuse injiziert. Gezeigt sind Aufnahmen von jeweils einem repräsentativen Versuchstier aus jeder Gruppe nach Termination des Experiments. Die Tötung der Tiere erfolgte bei Implantation von parentalen und Vektortransfizierten NIH3T3-Zellen nach 28 Tagen und bei den RAF1- und GRHL2-transfizierten Zellen nach 14 Tagen.

Die parentalen und Vektor-transfizierten NIH3T3-Zellen waren nicht in der Lage, Tumoren in den immundefizienten Mäusen zu bilden. Die RAF1- und GRHL2-überexprimierenden Zellen hingen wuchsen in allen Versuchstieren zu Tumoren aus. Die Latenzzeit der Tumorbildung ist in der Gruppe der GRHL2-überexprimierenden NIH3T3-Zellen im Vergleich zu den RAF1-überexprimierenden Zellen verzögert (Tab. 8).

	NIH3T3	NIH3T3/ Vektor	NIH3T3/ RAF1	NIH3T3/ GRHL2
Tumore per Injektion	0/5	0/5	5/5	5/5
Latenzzeit [Tage]	-	-	13-19	13-31
Durchschnitt [Tage]	-	-	15	23

Tab. 8: Frequenz und Latenz der Tumorentstehung verschiedener NIH3T3-Zellen nach Implantation in immundefiziente Mäuse

Es konnte gezeigt werden, dass NIH3T3-Zellen durch die Expression des GRHL2-Gens die Fähigkeit zur Tumorbildung *in vivo* erlangen. In allen durchgeführten Transformations-Assays konnte gezeigt werden, dass die Expression des GRHL2-Gens zur Transformation von NIH3T3-Zellen führt. Das GRHL2-Gen konnte somit als Proto-Onkogen klassifiziert werden. Außerdem belegen diese Ergebnisse, dass sich der experimentelle Ansatz der Retrovirusvermittelten cDNA-Expressionsklonierung tatsächlich zur Identifizierung von neuen Proto-Onkogenen eignet.

## 3.3.6. Transformierende Eigenschaften einer GRHL2-Isoform

Eine bioinformatische Analyse wies darauf hin, dass für das GRHL2-Gen zwei Gentranskripte existieren (siehe www.ensembl.org; ENST0000251808 und ENST00000395927). Das Genprodukt des kürzeren GRHL2-Transkriptes (GRHL2-2) ist im Vergleich zur GRHL2-Standardform (GRHL2-1) um 16 Aminosäuren am N-Terminus verkürzt. Dieses Genprodukt wird im Folgenden als GRHL2<sub>17-625</sub>-Protein bezeichnet. Um zu untersuchen, ob auch das GRHL2<sub>17-625</sub>-Protein transformierende Eigenschaften besitzt, wurde ein für GRHL2<sub>17-625</sub> kodierendes Expressionsplasmid hergestellt. Mit dem Expressionsplasmid erfolgte die stabile Transfektion von NIH3T3-Zellen. Die GRHL2<sub>17-625</sub>-Proteinexpression wurde mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung des α-GRHL2-Peptid-2-Antikörpers (siehe 3.5.) untersucht (Abb. 16).

Die Western-Blot-Analyse führte zur Identifikation von nur zwei Zellklonen mit transgener GRHL2<sub>17-625</sub>-Expression. Obwohl die gleiche Anzahl von Geneticin-resistenten Zellklonen analysiert wurde, war die Frequenz an Zellklonen mit stabiler, transgener Proteinexpression deutlich geringer als bei der Etablierung von GRHL2-überexprimierenden NIH3T3-Zellen. Der Zellklon mit der höchsten GRHL2<sub>17-625</sub>-Proteinexpression zeigt zudem keine morphologischen Veränderungen, während der Zellklon mit einer deutlich geringeren GRHL2<sub>17-625</sub>-Proteinexpression morphologische Veränderungen aufwies, die auf eine onkogene Transformation schließen lassen. Eine eindeutige Aussage zum transformierenden Potential von GRHL2<sub>17-625</sub> ist daher nicht möglich.



Abb. 16: Western-Blot-Analyse von NIH3T3-Zellklonen mit stabiler  $GRHL2_{\Delta 17-625}$ -Überexpression. Ganzzellextrakte von Geneticin-resistenten Zellklonen wurden einer Western-Blot-Analyse mit dem anti-GRHL2-Peptid-2-Antikörper unterzogen. Zur Kontrolle der geladenen Proteinmengen diente eine Western-Blot-Analyse des HSC-70-Proteins. Parallel dazu erfolgte die Beurteilung der Zellmorphologie der analysierten Zellklone.

In beiden GRHL2<sub>17-625</sub>-exprimierenden Zellklonen wurden drei unterschiedliche GRHL2-Proteine mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 70 kDa, 68 kDa und 54 kDa detektiert. Eine Analyse der Kozak-Sequenz am ersten Translationsstartkodon (ATG) des GRHL2-2-Transkripts ergab, dass die für eine effektive Translation wichtigsten Nukleotide an Positionen -3 und +4 suboptimal besetzt sind [Kozak, 2007]. Es wurde deshalb angenommen, dass interne Translationsstartpunkte genutzt werden, die zur Bildung kleinerer Genprodukte führen. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Verwendung der beiden nachfolgenden Translationsstartpunkte zur Bildung von Proteinen führen würde, deren Größe mit dem scheinbaren Molekulargewicht der in der Western-Blot-Analyse detektierten Proteine übereinstimmt. Bei der Verwendung des zweiten Startkodons als Translationsstart würde im Vergleich zur Standardform ein um 50 Aminosäuren verkürztes Protein (GRHL250-<sub>625</sub>) und bei der Verwendung des dritten Startkodons ein um 157 Aminosäuren verkürztes Protein (GRHL2<sub>157-625</sub>) ohne Transaktivierung-Domäne gebildet werden. Es lag die Vermutung nahe, dass der relative Anteil der durch das GRHL2-2-Gentranskript gebildeten Proteine, die eine vollständige Transaktivierungsdomäne besitzen, entscheidend für die Transformation von NIH3T3-Zellen ist und dass kleinere Genprodukte, denen die Transaktivierungs fehlt, wohlmöglich einen dominant-negativen Effekt ausüben könnten. Um die Eigenschaften der vom GRHL2-002-Gentranskript gebildeten Genprodukte genauer

zu charakterisieren, wurden retrovirale Expressionskonstrukte für die Genprodukte GRHL2, GRHL2<sub>17-625</sub> und GRHL2<sub>157-625</sub> unter Verwendung des retroviralen Expressionsvekotrs pMXs

hergestellt und zur Infektion von NIH3T3-Zellen verwendet. Anschließend erfolgten die Beurteilung der Zellmorphologie und die Western-Blot-Analyse der GRHL2-Proteinexpression in den transduzierten Zellen (Abb. 17).



Abb. 17: Durch alternativen Gebrauch von Translationsstartkodons generierte GRHL2-Genprodukte. A, Schematische Darstellung der möglichen GRHL2-2-Genprodukte. Da das erste verfügbare Startkodon eine suboptimale Kozak-Sequenz besitzt [Kozak, 2007], führt die Translation des GRHL2-002-Transkripts möglicherweise durch Verwendung von internen Startkodons zu zwei alternativen Genprodukten. B, Western-Blot-Analyse von NIH3T3-Zellen, die mit unterschiedlichen GRHL2-Expresionsplasmiden transduziert wurden sowie die Beurteilung der morphologischen Transformation der analysierten Zellen. Zur Kontrolle der geladenen Proteinmengen wurde das HSC-70-Protein mittels Western-Blot-Analyse detektiert.

NIH3T3-Zellen, die das GRHL2-Protein exprimieren, zeigen morphologische Veränderungen, während die Expression von GRHL2<sub>17-625</sub> und GRHL2<sub>157-625</sub> nicht zu einer veränderten Zellmorphologie führt. Darüber hinaus zeigt die Western-Blot-Analyse, dass das rekombinante GRHL2<sub>157-625</sub>-Protein das gleiche elektrophoretische Migrationsverhalten besitzt wie das kleinste vom GRHL2-2-Transkript translatierte Protein. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Existenz von unterschiedlichen GRHL2-2-Genprodukten in den Gesamtzellextrakten von GRHL2-2-exprimierenden Zellen möglicherweise auf den alternativen Gebrauch von Translationsstartkodons zurückzuführen ist.

## **3.3.7.** Das GRHL2<sub>157-625</sub>-Genprodukt übt einen dominant-negativen Effekt aus

Um einen möglichen dominant-negativen Effekt des GRHL2<sub>157-625</sub>-Proteins zu überprüfen, wurden GRHL2-überexprimierende NIH3T3-Zellen (Klon A7, Abb. 11) mit einem GRHL2<sub>157-625</sub>-Expressionsplasmid retroviral infiziert. Danach erfolgten die Beurteilung der Zellmorphologie und die Western-Blot-Analyse der GRHL2-Proteinexpression in den transduzierten NIH3T3-Zellen (Abb. 18).



Abb. 18: Western-Blot-Analyse von GRHL2-überexprimierende NIH3T3-Zellen, die mit einem GRHL2<sub>157-625</sub>-Expressionsplasmid transduziert wurden. Zur Kontrolle der geladenen Proteinmengen diente die Detektion des HSC-70-Proteins.

Durch die Expression des rekombinanten GRHL2<sub>157-625</sub>-Proteins in NIH3T3-Zellen mit GRHL2-Proteinexpression konnte die Rückkehr zu einer untransformierten Morphologie bewirkt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass das GRHL2<sub>157-625</sub>-Protein tatsächlich die transformierende Wirkung des GRHL2-Proteins aufhebt und einen dominant-negativen Effekt ausüben kann.

## 3.4. Identifizierung von potentiellen GRHL2-Zielgenen

Transkriptionsfaktoren sind DNA-bindende Proteine, die die Transkription von anderen Genen regulieren. Im Zuge der funktionellen Charakterisierung des GRHL2-Gens sollten Gene identifiziert werden, deren Expression direkt durch den GRHL2-Transkriptionsfakotor reguliert wird. Der Ablauf der zu diesem Zweck durchgeführten Experimente und Analysen ist in Abb. 19 dargestellt.

Das verwendete Verfahren beruht darauf, dass zunächst mit Hilfe einer vergleichenden Mikro-Array-Analyse von parentalen NIH3T3 und GRHL2-überexprimierenden NIH3T3-Zellen Unterschiede im Transkriptom beider Zelllinien ermittelt werden. Bei den so ermittelten deregulierten Genen handelt es sich um Gene, die entweder direkt oder aber auch nur indirekt durch GRHL2 reguliert sein könnten. Um Zielgene, also ausschließlich direkt durch GRHL2-regulierte Gene, zu identifizieren, sind somit weitere Analysen notwendig. Um die Anzahl potentieller Zielgene einzugrenzen, wird die willkürliche Annahme getätigt, dass relevante Zielgene mindestens einen 20-fachen relativen Expressionsunterschied aufweisen.

Die Festlegung dieses relativ stringenten Schwellenwertes beruhte auf der Annahme, dass eine direkte Regulation der Expression eines Zielgens durch den Transkriptionsfaktor GRHL2 sich in einer besonders signifikanten Veränderung im Expressionsniveau widerspiegeln sollte. Die anschließende bioinformatische "Phylogenetic Footprinting" Analyse zielt darauf ab, diejenigen Gene innerhalb dieser Gruppe zu identifizieren, in deren Promotorregionen sich über Speziesgrenzen (Maus/Mensch) hinweg eine durch einen "Elektrophoretic Mobility Shift Assay" (EMSA) definierte GRHL2-spezifische Konsensus-DNA-Sequenz nachweisen lässt. Eine evolutionäre Konservierung wird also als wichtiges Indiz für eine tatsächliche physiologische Relevanz von identifizierten GRHL2-Bindungstellen gewertet. Die erhaltene Vorhersage für eine direkte Regulation durch GRHL2 sollen abschließend exemplarisch für ein Zielgen in einem Genreporter-Assay gezeigt werden.



Abb. 19: Schematische Darstellung der Strategie zur Identifizierung von Genen, deren Expression direkt durch den GRHL2-Transkriptionsfaktor reguliert wird.

## 3.4.1. Ermittlung von GRHL2-induzierten Expressionsunterschieden mittels Mikro-Array-Analyse

Um Expressionsunterschiede, die durch die Expression des GRHL2-Transkriptionsfaktors hervorgerufen werden, zu bestimmen, wurde eine vergleichende Mikro-Array-Analyse der Zelllinien NIH3T3 und NIH3T3/GRHL2 durchgeführt. Unter Verwendung von Agilent Whole Mouse Genome 4x44 K Mikro-Arrays wurden die Expressionsprofile der beiden Zelllinien im Triplikat bestimmt. Im Zuge der bioinformatischen Auswertung der MikroArray-Analyse (siehe 2.3.21) konnten 1543 Transkripte in den beiden Zelllinien als signifikant differenziell reguliert identifiziert werden.

Gen-Name	Gen-Symbol	Genebank-Nr.	FC*
Hochreguliert	e Gene**		
Glutathione S-transferase A	Gsta3	NM_010356	+1280
RIKEN cDNA 4732474O15Rik	4732474O15Rik	XM_138397	+688
Transmembrane protein 40	Tmem40	NM_144805	+300
Adhesion molecule, interacts with CXADR antigen 1	Amica1	NM_001005421	+287
1110018M03Rik	1110018M03Rik	NM_026271	+168
Phospholipase A2, group V	Pla2g5	NM_011110	+153
Myelin protein zero-like 2	Mpzl2	NM_007962	+142
Killer cell lectin-like receptor subfamily A, member 22	Klra22	NM_053152	+107
Killer cell lectin-like receptor subfamily A, member 15	Klra15	NM_013793	+105
Killer cell lectin-like receptor subfamily A, member 7	Klra7	NM_014194	+96
Herunterregulie	rte Gene**		
Serum amyloid A3	Saa3	NM_011315	-321
Chitinase 3-like1	Chi3l1	NM_007695	-185
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3, structural gene Y-linked	Eif2s3y	NM_012011	-173
Deiodinase, iodothyronine, type II	Dio2	NM_010050	-150
Haptoglobin	Нр	NM_017370	-137
Serine peptidase inhibitor, clade A, member 3F	Serpina3f	NM_001033335	-120
STEAP family member 4	Steap4	NM_054098	-114
Lipopolysaccharide binding protein	Lbp	NM_008489	-112
Serine peptidase inhibitor, clade A, member 3g	Serpina3g	NM_009251	-93
Insulin-like growth factor 2	Igf2	NM_010514	-89

Tab. 9: Durch den Transkriptionsfaktor	GRHL2 regulierte Gene	(Auswahl)
--	-----------------------	-----------

\* "Fold Change", relativer Expressionsunterschied zur parentalen Zelllinie

\*\* Exemplarisch sind nur die jeweils zehn am stärksten hoch- und herunterregulierten Gene aufgelistet

662 von diesen Genen sind in der Zelllinie NIH3T3/GRHL2 im Vergleich zur parentalen Zelllinie hoch- und 881 herunterreguliert. Auf die vollständige Auflistung der deregulierten Gene wird in dieser Arbeit verzichtet. In Tab. 9 sind jeweils die zehn Gene zusammengefasst, deren Expression in der Zelllinie NIH3T2/GRHL2 im Vergleich zur parentalen Zelllinie am stärksten hoch- bzw. herunterreguliert ist.

Um die Resultate der Mikroarray-Analyse zu bestätigen, wurden die relativen Expressionsunterschiede von zehn zufällig ausgewählten Genen mit Hilfe einer quantitativen PCR-Analyse (qRT-PCR) bestimmt. Ein Vergleich der Expressionsunterschiede, die mit Hilfe der beiden Methoden ermittelt wurden, ist in Abb. 20 dargestellt. Die Ergebnisse beider Methoden zeigen eine sehr gute Übereinstimmung, so dass die mit der Mikro-Array-Analyse ermittelten Expressionsunterschiede bestätigt werden konnten.



Abb. 20: Vergleich der relativen Expressionsunterschiede von zehn deregulierten Genen in den Zelllinien NIH3T3 und NIH3T3/GRHL2. Die Expressionsunterschiede wurden mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR- und der Mikro-Array-Analyse ermittelt. Für beide Analysen wurden identische Gesamt-RNA-Präparationen verwendet. \* "Fold Change", relativer Expressionsunterschied im Vergleich zur parentalen Zelllinie

## 3.4.2. Bestimmung der GRHL2-spezifischen Konsensus-DNA-Bindungssequenz

Zur Bestimmung der GRHL2-spezifischen Konsensus-DNA-Bindungssequenz wurde ein EMSA durchgeführt. Hierbei die wurde Annahme getätigt, dass die GRHL2-spezifische Konsensus-DNA-Bindungssequenz mit der Konsensus-DNA-Bindungssequenz AACCGGTT der Transkriptionsfaktoren GRHL1 und GRHL3 identisch ist [Ting et al., 2005; Wilanowski et al. 2008].

Um die spezifische Bindung des GRHL2-Proteins an die Sequenz AACCGGTT zu zeigen, doppelsträngiges Oligonukleotid potentieller GRHL2wurde zunächst ein mit (GRHL2-WT) hergestellt und anschließend Bindungssequenz radioaktiv markiert. Zellkernextrakte der Zellinien NIH3T3 und NIH3T3/GRHL2 wurden mit dem radioaktivmarkierten GRHL2-WT-Oligonukleotid inkubiert und anschließend elektrophoretisch unter nativen Bedingungen in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.



Abb. 21: Elektrophoretische Analyse von Bindungsreaktionen mit Zellkernextrakten der Zelllinien NIH3T3 und NIH3T3/GRHL2. Für den EMSA wurde ein radioaktiv-markiertes Oligonukleotid, das die potentielle GRHL2-Konsensus-Erkennungssequenz AACCGGTT enthielt und Kernextrakte parentaler und GRHL2-exprimierender NIH3T3-Zellen verwendet. Als Kontrolle dienten Bindungsreaktionen ohne Kernextrakt. Die Spezifität der Bindung wurde durch die Zugabe eines nicht-markierten Oligonukleotids mit "Wildtyp" (GRHL2-WT) oder mutierter GRHL2-Konsensus-Erkennungssequenz (GRHL2-MT) gezeigt.

In der in Abb. 21 gezeigten gelelektrophoretischen Analyse der unterschiedlichen Bindungsreaktionen ist zu erkennen, dass im Zellkernextrakt der parentalen NIH3T3-Zellen keine Faktoren zur Bindung der markierten GRHL2-WT-Oligonukleotide vorhanden sind. Im Zellkernextrakt der GRHL2-überexprimierenden NIH3T3-Zellen kommt es hingegen zu einer spezifischen Bindung des markierten Oligonukleotids durch den GRHL2-Transkriptionsfaktor. Die Bindung lässt sich durch einen Überschuss an GRHL2-WT-Oligonukleotiden kompetitieren. Bei Verwendung des GRHL2-MT-Oligonukleotids mit mutierter Konsensus-Erkennungssequenz erfolgt keine Kompetition. Somit konnte eine spezifische Bindung des GRHL2-Proteins an die DNA-Sequenz AACCGGTT gezeigt werden.

# 3.4.3. Identifizierung ortholog-konservierter GRHL2-Bindungsstellen innerhalb der Promotorsequenzen deregulierter Gene

Ein bioinformatischer Ansatz, der als "Phylogenetic-Footprinting" bezeichnet wird, nutzt für eine zuverlässigere Vorhersage von physiologisch relevanten Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen aus, dass funktionelle DNA-Sequenzen stets einem hohen evolutionären Druck ausgesetzt und daher häufig zwischen verschiedenen Spezies konserviert sind. Um Gene zu identifizieren, deren Expression durch den GRHL2-Transkriptionsfaktor direkt reguliert wird, wurden alle Gene, für die in der Mikro-Array-Analyse mindestens eine 20-fache Deregulation ermittelt wurde, mit Hilfe einer "Phylogenetic-Footprinting"-Analyse untersucht.

Gen-Name	Gen- Symbol	Genebank-Nr.	GRHL2-Motiv	Score*	FC (Array)
		Hochregulierte G	ene		
v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3	Erbb3	NM_001982	AACCGGCT	91,92	29,0
Interleukin 17 receptor	Il17re	NM_145826	ACCTGGTT	85,97	66,8
Anaplastic lymphoma kinase	Alk	NM_007439	AACCTGCT	83,71	59,0
Tumor suppressor candidate 1	Tusc1	NM_026954	TACCTGTC	82,75	30,2
Semaphorin 4A	Sema4a	NM_013658	TTCTGGTT	81,57	30,1
Cystatin A	Csta	NM_001033239	AACATGTT	81,36	24,9
Transmebrane protein 40	Tmem40	NM_144805	ACCCAGTT	80,91	299,6
Glutathione S-transferase A3	Gsta3	NM_010356	AACCTGGT	80,70	1279,5
	Н	erunterregulierte	Gene		
Chemokine (C-X-C) ligand 11	Cxcl1	NM_008176	AACTGGTT	95,11	-66,7
Colony stimulating facotr 3	Csf3	NM_009971	ATCCGGTT	90,86	-22,1
Serine peptidase inhibitor clade A, member 3G	Serpina3g	NM_009251	TACCTGTT	87,4	-92,5
Ets homologous factor	Ehf	NM_007914	TCCCGGTT	86,46	-50,2
Dermokine	Dmkn	NM_028618	AACTGGCC	82,38	-21,7
Calcium channel, voltage- dependent, T type, alpha 1G subunit	Cacna1g	NM_009783	AACTGGCC	82,38	-45,5
Phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent	Pde1a	NM_016744	AACCAGCT	81,98	-21,7
Deiodinase, iodothyronine, type II	Dio2	NM_010050	AACTGGAT	81,25	-150,4
STEAP family member 4	Steap4	NM 054098	AACCCCTT	80,99	-113,7

Tab. 10: Deregulierte Gene mit ortholog-konservierter GRHL2-Bindungssequenz in der proximalen Promotorregion

\* Der Wert beschreibt die Übereinstimmung der gefunden GRHL2-Bindungsstelle mit der Häufigkeitsmatrix sowie den Grad der Konservierung der Bindungsstelle und der benachbarten Sequenzen in den humanen und murinen Promotoren Zu diesem Zweck wurden jeweils 1 kbp der proximalen Promotorsequenzen von 49 aktivierten und 64 reprimierten Genen unter Verwendung einer Häufigkeitsmatrix, die Substitutionen einzelner Basen innerhalb der Konsensus-DNA-Bindungssequenz zulässt, nach Anwesenheit potentieller GRHL2-Bindungstellen abgesucht. Um sicherzustellen, dass die dabei identifizierten, potentiellen GRHL2-Bindungstellen physiologische Relevanz besitzen, erfolgte parallel eine Analyse der proximalen Promotorsequenzen der humanen, orthologen Gene mit denselben Parametern. Der Schwellenwert für die Übereinstimmung mit der verwendeten Häufigkeitsmatrix des Bindungsmotivs wurde auf 85% gesetzt. Anschließend wurde ermittelt, ob die identifizierten, potentiellen GRHL2-Bindungstellen in Promotoren zweier Spezies konserviert sind. Der Schwellenwert der orthologen Konservierung des Motivs zwischen den menschlichen und den murinen Promotorsequenzen wurde auf 80 % festgesetzt. Es konnten in den proximalen Promotorsequenzen von 8 hoch- und 9 herunterregulierten Genen potentielle, ortholog-konservierte GRHL2-Bindungsstellen identifiziert werden. Die Ergebnisse der bioinformatischen Promotor-Analyse sind in Tab. 10 zusammengefasst.

### 3.4.4. Das GRHL2-Protein transaktiviert den Erbb3-Promotor

Die höchste Übereinstimmung mit der verwendeten Häufigkeitsmatrix wurde für eine potentielle GRHL2-Bindungsstelle in der proximalen Promotorregion des Erbb3-Gens gefunden. Bei diesem Gen handelt es sich um ein Mitglied der "Epidermal Growth Factor Receptor" (EGFR) -Familie. Dieses Gen verstärkt bei Koexpression mit dem Erbb2-Gen, dessen transformierende Wirkung [Holbro et al. 2003] und wird häufig in Mammakarzinomen überexprimiert [Naidu et al., 1998]. Die potentielle, ortholog-konservierte GRHL2-Bindungsstelle wurde an Position -369 vor dem Transkriptionsstart des Erbb3-Gens identifiziert. Um zu zeigen, dass der GRHL2-Transkriptionsfaktor direkt an den Erbb3-Promotor bindet und die Transkription des Erbb3-Gens steuert, wurde eine Mutationsanalyse mit verschiedenen Erbb3-Promotorfragmenten durchgeführt. Hierfür wurden sieben Reporter-Plasmide hergestellt, bei denen unterschiedliche proximale Errb3-Promotorsequenzen mit entweder deletierter, mutierter oder nativer GRHL2-Bindungsstelle vor das Luciferase-Reporter-Gen in den pGL4.10-Vektor kloniert wurden. Diese Reporter-Plasmide wurden anschließend entweder mit einem GRHL2-Expressionsplasmid oder mit einem Leervektor in wNX-eco-Zellen transient kotransfiziert und die relative Luciferase-Aktivität in den transfizierten Zellen bestimmt. Parallel dazu erfolgte die transiente Transfektion der Reporter-Plasmide in parentale NIH3T3 oder NIH3T3/GRHL2-Zellen. Zur Normalisierung wurde in allen Ansätzen das Reporter-Plasmid pGL4.74 verwendet. In Abb. 22 sind die wichtigsten

Charakteristika der hergestellten Reporter-Plasmide und die ermittelten, relativen Luciferase-Aktivitäten (RLU) zusammenfassend dargestellt.

Α



Abb. 22: Mutations-Analyse der GRHL2-vermittelten Transaktivierung des Erbb-3-Promotors. A, Wichtige Charakteristika und schematische Darstellung der hergestellten Reporter-Plasmide. \*Position der klonierten Promotorfragmente relativ zum Transkriptionsstart. B, Bestimmung der relativen Luciferase-Aktivität (RLU) der Reporterplasmide nach transienter Transfektion in  $\psi$ NX-eco- und NIH3T3-Zellen.

7

2

3

4

Reporter-Konstukte

5

6

6

5

2

3

4

Reporter-Konstukte

Aus den Ergebnissen der Mutations-Analyse geht hervor, dass es nur dann zu einem signifikanten Anstieg der relativen Luciferase-Aktivität kommt, wenn ein Reporter-Plasmid mit nativer GRHL2-Bindungsstelle in eine Zelllinie mit GRHL2-Überexpression transfiziert wurde. So reicht die Mutation nur einer der beiden invarianten Nukleotide innerhalb der Konsensus-DNA-Bindungssequenz AACCGGTT bereits aus, um eine Transaktivierung des

Erbb3-Promotors zu unterbinden. Es konnte somit gezeigt werden, dass der GRHL2-Transkriptionsfaktor den Erbb3-Promotor über die zuvor identifizierte Bindungsstelle an Position -369 vor dem Transkriptionsstart transaktiviert. Die Vorhersage für eine direkte Regulation durch GRHL2, die mit Hilfe der "Phylogenetic Footprinting" Analyse aufgestellt wurde, konnte bestätigt werden.

## 3.5. Herstellung von GRHL2-spezifischen, polyklonalen Antikörpern

Für die umfassende Expressions-Analyse eines Proteins stellt die Verfügbarkeit eines spezifischen Antikörpers eine Grundvoraussetzung dar. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten deshalb polyklonale, GRHL2-spezifische Antikörper in Kaninchen generiert werden. Zu diesem Zweck erfolgte zunächst die Auswahl von geeigneten Peptiden für die Immunisierung. Um eine Kreuzreaktivität der Antikörper mit anderen Mitgliedern der Grainyhead-like Proteinfamilie auszuschließen, wurde eine vergleichende Clustalw2-Analyse (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2) der primären Proteinsequenzen mit den jeweils längsten Isoformen der Grainyhead-like Proteine durchgeführt. (Genebank-Einträge: GRHL1: NP\_055367.2; GRHL2: NP\_079191.2; GRHL3: NP\_067003.2). Auf die Darstellung des Ergebnisses der Clustalw2-Analyse wird in dieser Arbeit verzichtet. Aus der ClustalW2-Analyse geht hervor, dass die drei Proteine der Grainyhead-like Transkriptionsfaktor-Familie auf Proteinebene einen hohen Grad an Sequenzhomologie aufweisen. Einzig die Proteinsequenzen, die zwischen der Transaktivierungs-Domäne und der DNA-Bindungs-Domäne liegen, sind weniger hoch konserviert. Deshalb wurden aus diesem Bereich die Peptidsequenzen SLATHSAYLKDDQRS (Peptid-1) und KDAATEKFRSASVGAEE (Peptid-2) zur Immunisierung ausgewählt. Die relative Lage der Peptid-Sequenzen innerhalb der primären Proteinsequenz ist in Abb. 23 dargestellt.



Abb. 23: Schematische Darstellung der relativen Lage der zur Immunisierung verwendeten Peptide innerhalb der GRHL2-Proteinsequenz. Für das GRHL2-Protein sind eine Transaktivierungs-, eine DNA-Bindungs- und eine Dimerisierungsdomäne als funktionelle Proteindomänen bekannt. Die ausgewählten Peptide liegen in der Region zwischen der Transaktivierungs- und der DNA-Bindungsdomäne.

Um Homologien der ausgewählten Peptide mit anderen bekannten Proteinsequenzen auszuschließen, wurde zudem eine BLAST-Analyse (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) durchgeführt. Im Zuge der BLAST-Analyse konnten keine Sequenzhomologien mit Einträgen der Datenbank festgestellt werden, so dass die beiden Peptide nach chemischer Kopplung an das KLH-Protein ("Keyhole Limpet Hemocyanin") zur Immunisierung von Kaninchen verwendet wurden (siehe 2.4.1.). GRHL2-spezifische polyklonale Antikörper wurden aus den Seren der Versuchstiere mittels Affinitätschormatographie aufgereinigt.

Um zu analysieren, ob die generierten Immunseren bzw. affinitätschormatographisch gereinigten Immunseren das GRHL2-Protein detektieren, wurden verschiedene Western-Blot-Analysen von Ganzzellextrakten, die aus zwei GRHL2-exprimierenden Zelllinien (MCF7 und ZR-75-1) und aus zwei Zelllinien ohne GRHL2-Expression (MDA-MB-435s und MDA-MB-231) hergestellt wurden, durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle diente ein Ganzzellextrakt aus  $\psi$ NX-eco-Zellen, die transient mit einem GRHL2-Expression-Konstrukt transfiziert wurden. In Abb. 23 sind Ergebnisse der Western-Blot-Analysen gezeigt, die mit den unterschiedlichen Antiseren von Peptid-1 ( $\alpha$ -GRHL2-P1) und Peptid-2 ( $\alpha$ -GRHL2-P2) erhalten wurden.



Abb. 24: Herstellung GRHL2-spezifischer polyklonaler Antikörper. Die Reaktivität der Prä-Immunseren, Immunseren und affinitätschromatographisch gereinigten Antiseren wurde mittels Western-Blot-Analyse von Ganzzellextrakten der angegebenen humanen Mammakarzinom-Zelllinien ermittelt.

Die Resultate zeigen, dass es gelungen ist zwei polyklonale anti-GRHL2-Antikörper zu generieren, die spezifisch ein Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von ca. 70 kDa in GRHL2-exprimierenden nicht aber in GRHL2-negativen humanen Mammakarzinom-Zelllinien detektieren. Ferner ist aus Abb. 24 ersichtlich, dass die affinitätschromatographische Reinigung zur Anreicherung hochspezifischer Antikörper führte, die keine nennenswerte Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen in der Western-Blot-Analyse aufwiesen.

### **3.6. GRHL2-Expression in humanen Mammakarzinom-Zelllinien**

Um die GRHL2-Expression in zehn humanen Mammakarzinom-Zelllinien auf transkriptioneller Ebene und auf Protein-Ebene zu bestimmen, wurden eine Northern-Blot-Analyse, eine Western-Blot-Analyse und eine RT-PCR-Analyse durchgeführt.

Für die Northern-Blot-Analyse wurde die elektrophoretisch aufgetrennte und immobilisierte Gesamt-RNA der Mammakarzinom-Zelllinien mit einer radioaktiv-markierten, GRHL2-spezifischen cDNA-Sonde hybridisiert. Für die Western-Blot-Analyse wurden Ganzzellextrakte und der  $\alpha$ -GRHL2-P1-Antikörper eingesetzt. Für die RT-PCR-Analyse wurde zunächst die Gesamt-RNA der untersuchten Zelllinien in cDNA konvertiert. Um unterschiedliche GRHL2-Transkripte zu analysieren, erfolgte dann eine PCR-Reaktion mit GRHL2-spezifischen Oligonukleotidprimern, die den varianten Bereich am 5'-Ende der GRHL2-cDNA flankieren.

Aus denen in Abb. 25 gezeigten Ergebnissen der Expressions-Analyse von GRHL2 ist ersichtlich, dass die Expression des GRHL2-Proteins sehr gut mit der Menge an GRHL2-Gentranskripten korreliert. Außerdem ist zu erkennen, dass GRHL2 differentiell in den zehn untersuchten humanen Mammakarzinom-Zelllinien exprimiert ist. Erstaunlicherweise ist GRHL2 besonders stark in den eher gutartigen (ZR-75-1, T47-D), nicht aber in den vergleichsweise aggressiven Mammakarzinom-Zelllinien (MDA-MB-435s und MDA-MB-231) exprimiert. Mit Hilfe der RT-PCR-Analyse konnte gezeigt werden, dass für das GRHL2-Gen zwei alternative Gentranskripte existieren.



Abb. 25: Analyse der GRHL2-Expression in zehn humanen Mammakarzinom-Zellinien. In der Western-Blot-Analyse erfolgte der Nachweis der GRHL2-Proteinexpression in Ganzellextrakten der untersuchten Zelllinien. Als Ladekontrolle diente eine Western-Blot-Analyse des HSC70-Proteins. In der Northern-Blot-Analyse wurde eine radioaktiv-marktierte Sonde zur Detektion von GRHL2-Gentranskripten in Gesamt-RNA-Präparationen verwendet. Als Ladekontrolle diente ein Ethidium-Bromid-gefärbtes Agarosegel. In der RT-PCR-Analyse wurden GRHL2-spezifische PCR-Amplifikationsprodukte, die aus der cDNA der Zelllinien hergestellt wurden, gelelektrophoretisch analysiert.

## 3.7. Expression der GRHL2-Isoformen in humanen Brustkrebszelllinien

Um zu ermitteln, in welchem Verhältnis zueinander die beiden GRHL2-Gentranskripte in den zehn humanen Mammakarzinom-Zelllinen exprimiert sind, erfolgte eine absolute Quantifizierung (siehe 2.3.18.) der GRHL2-Gentranskripte. Zunächst wurde cDNA aus Gesamt-RNA-Präparationen der Zelllinien synthetisiert. Dann wurden die absoluten Mengen beider GRHL2-Transkripte unter Verwendung der Oligonukleotid-Primer BOMq-f und BOMq-r mit einer quantitativen PCR-Reaktion bestimmt. Für die selektive Quantifizierung des GRHL2-1-Transkripts erfolgte eine Quantifizierung mit den Oligonukleotid-Primern BOM1q-f und BOM1q-r. Der relative Anteil von GRHL2-1 und -2 in den jeweiligen Zelllinien ergab sich aus der Differenz der absoluten Mengen beider Transkripte und der absoluten Menge des GRHL2-1-Transkripts. Um festzustellen, ob es in den humanen Mammakarzinom-Zelllinien zu einer uneinheitlichen Translation kommt, wurde paralell eine

Western-Blot-Analyse unter Verwendung des polyklonalen Peptid-Antikörpers-2 (α-GRHL2-P2) an den Zelllinien durchgeführt (Abb. 26).



Abb. 26: Expressionsanalyse der beiden GRHL2-Gentranskripte in zehn humanen Mammakarzinom-Zelllinien. A, Relative Verhältnisse der GRHL2-Gentranskripte in den gezeigten Zelllinien, die durch eine absolute Quantifizierung mittels qRTPCR ermittelt wurden. B, Western-Blot-Analyse von GRHL2-Genprodukten in Ganzzellextrakten der gezeigten Zelllinien. Zur Kontrolle der geladenen Proteinmengen erfolgte eine Western-Blot-Analyse des HSC-70-Proteins.

Mit Hilfe der absoluten Quantifizierung konnte gezeigt werden, dass in allen GRHL2exprimierenden Zelllinien beide GRHL2-Gentranskripte gebildet werden. Der Anteil des GRHL2-2-Gentranskripts an der gesamten GRHL2-Transkriptmenge liegt in den untersuchten Zelllinien zwischen 10% und 40%. Die Western-Blot-Analyse zeigt, dass in den humanen Mammakarzinom-Zelllinien auch kleinere GRHL2-Genprodukte nachweisbar sind. Das elektrophoretische Migrationsverhalten dieser Genprodukte lässt darauf schließen, dass auch in den humanen Mammakarzinom-Zelllinien interne Translationsstartpunkte des GRHL2-2-Gentranskripts genutzt werden. Die alternativen Genprodukte üben möglicherweise eine tatsächliche physiologische Funktion aus.

## 3.8. Das GRHL2-2-Gentranskript wird durch alternatives Spleißen erzeugt

Es konnte gezeigt werden, dass in humanen Mammakarzinom-Zelllinien zwei unterschiedliche GRHL2-Gentranskipte existieren. Um den spezifischen Mechanismus zu ermitteln, der zur Entstehung dieser GRHL2-Gentranskripte führt, wurden die beiden PCR-Amplifikationsprodukte, die in der RT-PCR-Analyse mit cDNA aus der Mammakarzinom-Zellinie GI-101 erzeugt wurden, sequenziert und mit Hilfe einer globalen Lalign-Analyse (www.ch.embnet.org/cgi-bin/lalign) untersucht (Abb. 26).

GRHL2-1 GRHL2-2	GTGTCTGO :::::: GTGTCTGO	10 CCATTGCC CCATTGCC 10	20 ACGATCCAG ACGATCCAG 20	30 GAGGACTCCG GAGGACTCCG 30	40 CGCCGCCCG0 ::::::::::: CGCCGCCCG0 40	50 GCCGCCTCCGA GCCGCCTCCGA 50	60 AGCTCGGGCC AGCTCGGGCC 60	70 CCCATGTGAGG CCCATGTGAGG 70	80 	90 FATCCCACCTT FATCCCACCTT 90	100 TCCGGCTAGO TCCGGCTAGO TCCGGCTAG- 100	110 ST SAGGGCGCO	120 GAGCGG
CDIII 2.1	COCACCO		140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
GKHL2-1	GCGAGCG	AGCGAGAGI	GGTGAGGGG	GGACGGAAAA	GCAGAATTAC		Idificiace				ACAGACTIGA	AAAGTCCAGT	ITCACC
GRHL2-2													
	-	250	260	270	280	290	300	31)	320	330	340	350	360
GRHL2-1	AGAGGCT	GAGGCTCCA	IGGAAAAGCG	GAGCAAGTTC	ATTGGATCAA	ACATGTCACA	AGAGTCGG/	ACAATAATAAA	AGACTAGTGG	CTTAGTGCCC	ATGCCCAGT(	SACCCTCCAT	ΓርΑΑΤΑ
CDIRAA								T					
GKHL2-2								110	AGACTAGTGG	130	.AIGCCCAGIC	150	
								110	120	100	740	100	
	3	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
GRHL2-1	CCCGAAG	AGCCTACAC	CAGTGAGGA	TGAAGCCTGG	AAGTCATACT	TGGAGAATCO	CCTGACAG	EAGCCACCAAG	GCCATGATGA	FCATTAATGGT	GATGAGGACA	AGTGCTGCTG	CCTCG
											::::::::		
GRHL2-2	CCCGAAG		CAGTGAGGA	TGAAGCCTGG	AAGTCATACT	TGGAGAATCC	CCTGACAG		GCCATGATGA	ICATTAATGGT	GATGAGGAC	AGTGCTGCTG	CCTCG
	100	1/0	180	190	200	210	220	J 230	240	250	260	270	
	220	230	240	250	260	270							
	2	190	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
GRHL2-1	GCCTGCT	TATGACTA	<b>ICTACAAGGT</b>	TCCTCGAGAC	AAGAGGCTGC	TGTCTGTAAG	SCAAAGCAA	STGACAGCCAA	GAAGACCAGG	AGAAAAGAAAC	TGCCTTGGC	ACCAGTGAAG	CCAGA
	:::::::										::::::::		
GRHL2-2	GCCTGCTO	TATGACTA		TCCTCGAGAC	AAGAGGCTGO	TGTCTGTAAG	ICAAAGCAA	STGACAGCCAA	GAAGACCAGG	AGAAAAGAAAC	TGCCTTGGC	ACCAGTGAAG	ECCAGA
	280	290	300	310	320	550	340	550	360	370	580	390	

Abb. 27: Lalign-Analyse der Sequenzen von zwei unterschiedlichen PCR-Amplifikationsprodukten der GRHL2-cDNA. Beide Amplifikationsprodukte wurden in einer RT-PCR-Analyse des 5'-Bereichs vom GRHL2-Gen mit den Primern BOMRT-0 und BOM-RT-3 aus cDNA von GI-101-Zellen erzeugt. Die Grenzen einer ermittelten Deletion sind farblich markiert.

Aus der in Abb. 27 gezeigten Lalign-Analyse geht hervor, dass im kürzeren GRHL2-2-Gentranspript 203 Basenpaare deletiert sind. Das erste GRHL2-Exon enhält eine Konsensus-Sequenz für eine interne 5'-Spleißstelle [Ast, 2004] (AGGT; Position 104 bis 107, grüne Markierung in Abb. 27), die alternativ zur natürlichen Speißstelle (Position 307 bis 310, rote Markierung in Abb. 27) genutzt werden kann und somit zur Bildung eines varianten Gentranskriptes (GRHL2-2) führt. Der vorgeschlagene Spleißmechanismus des GRHL2-2-Gentranskripts ist in Abb. 28 schematisch dargestellt.



Abb. 28: Schematische Darstellung des Spleißmechanismus, der zur Bildung des GRHL2-2-Gentranskripts führt. Durch die Verwendung einer alternativen 5'-Spleißstelle im ersten GRHL2-Exon kommt es bei der Erzeugung des GRHL2-2-Gentranskripts zur Deletion des 3'-Bereiches der ersten GRHL2-Exons. Diese Deletion umfasst auch das erste Start-Kodon des offenen Leserahmens der GRHL2mRNA.

Durch den in Abb. 28 gezeigten Spleißmechanismus des GRHL2-2-Gentranskripts werden Sequenzen am 3'-Ende des ersten GRHL2-Exons, die das erste Start-Kodon enthalten, deletiert. Beim GRHL2-2-Gentranskript beginnt die Proteintranslation deshalb am zweiten Start-Kodon, wodurch ein am N-Terminus um 16 Aminosäuren verkürztes Protein entsteht. Dieser Mechanismus deckt sich somit mit den bereits publizierten Proteinsequenzen der beiden Isoformen (www.expasy.org/uniprot; Einträge Q6ISB3-1 und Q6ISB3-2).

#### 3.9. Das GRHL2-Protein besitzt eine nukleäre Lokalisation

Um die subzelluläre Lokalisation des GRHL2-Proteins zu bestimmen, wurden kultivierte GI-101-Zellen einer immunzytologischen Färbung unterzogen. Als primäre Antikörper wurden hierfür die GRHL2-spezifischen, polyklonalen Antikörper α-GRHL2-P1 und -P2 verwendet (Abb. 29). Aus den in Abb. 28 dargestellten immunzytochemischen Färbungen ist ersichtlich, dass das GRHL2-Protein in GI-101-Zellen ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist.





Abb. 29: Ermittlung der subzellulären Lokalisation des GRHL2-Proteins in GI-101-Zellen durch immunzytochemische Färbungen mit den polyklonalen Antikörpern a-GRHL2-P1 und -P2. Zellkerne wurden durch Gegenfärbung mit DAPI-Farbstoff dargestellt. Die Dokumentation erfolgte bei 40-facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop.

## 3.10. Etablierung und Charakterisierung von MDA-MB-468-Zellen mit stabiler GRHL2-Überexpression

Um die Bedeutung des GRHL2-Gens während der Entwicklung und Progression des humanen Mammakarzinoms genauer zu analysieren, sollte ein Modellsystem zur Durchführung weiterführender *in vitro* und *in vivo* Studien etabliert werden. Da ein Überexpressionssystem etabliert werden sollte, wurde für die Etablierung dieses Modellsystems die Zelllinie MDA-MB-468 ausgewählt. Diese Zelllinie hat eine relativ geringe GRHL2-Proteinexpression und bildet außerdem bei subkutaner Implantation in Nacktmäuse Tumore [Price, 1990], so dass sie sich prinzipiell auch für *in vivo* Analysen eignet.

Zur Herstellung von MDA-MB-468-Zellen mit stabiler GRHL2-Überexpression, wurde zunächst ein GRHL2-Expressionplasmid hergestellt. Die GRHL2-cDNA wurde aus GI-101-Zellen unter Verwendung der Oligonukleotid-Primer BOMFL-f und BOMFL-r amplifiziert und in den Expressionsvektor pCMV3 kloniert. Durch die Verwendung dieses Expressionsvektors wurde an den C-Terminus des GRHL2-Proteins eine zusätzliche Hämaglutinin-Peptid-Sequenz (HA) fusioniert. Dieser so genannte HA-Tag erlaubt eine selektive Detektion des rekombinaten Proteins vor dem Hintergrund der basalen GRHL2-Proteinexpression. Mit dem GRHL2-Expressionplasmid wurden MDA-MB-468-Zellen transfiziert und Zellklone mit stabiler GRHL2-Überexpression mit Geneticin-haltigem Zellkulturmedium selektioniert. Die Zellklone wurden anschließend mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines HA-spezifischen Antiköpers hinsichtlich der transgenen GRHL2-Expression untersucht.

Die Expression des HA-markierten GRHL2-Proteins in parentalen, Vektor-transfizierten und zwei besonders stark GRHL2-überexprimierenden MDA-MB-468-Zellklonen (MDA-MB-468/GRHL2#1 und #2) wurde auf der Ebene der Gentranskripte mittels qRT-PCR und auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Außerdem wurde die Proteinexpression von E-Cadherin, dessen Expression direkt von GRHL2 reguliert wird [Wilanowski et al., 2008], in den jeweiligen Zellen durch eine weitere Western-Blot-Analyse analysiert. Um Veränderungen im Proliferationsverhalten der GRHL2-überexprimierenden Zellklone zu untersuchen, erfolgte außerdem eine Analyse der Teilungsaktivität der Zellen.

Aus den in Abb. 30 gezeigten Ergebnissen geht hervor, dass es gelungen ist, in den stabil transfizierten MDA-MB-468-Zellklonen eine etwa 16-fache bzw. 20-fache Überexpression des GRHL2-Transkriptes, die mit einer deutlich erhöhten Proteinexpression einhergeht, zu erzeugen. In der Analyse der Proteinexpression von E-Cadherin und der Analyse der Teilungsaktivität der GRHL2-überexprimierenden Zellklone ist jedoch kein Unterschied zu

den parentalen und Vektor-transfizierten Zellen festzustellen. Die Überexpression des GRHL2-Proteins in MDA-MD-468-Zellen führt in Bezug auf die untersuchten Merkmale zu keinen Veränderungen. Die transfizierten Zellen eignen sich aufgrund fehlender phänotypischer Unterschiede zur parentalen Zelllinie nicht als Modellsystem für weitere Studien.



Abb. 30: Charakterisierung von GRHL2-überexprimierenden MDA-MB-468-Zellklonen. A, Western-Blot-Analyse von Ganzzellextrakten der gezeigten Zelllinien. Es wurde die GRHL2-Proteinexpression unter Verwendung des α-GRHL2-Peptid-1-Antikörpers und eines HA-spezifischen Antikörpers analysiert. Außerdem erfolgte die Analyse der Proteinexpression des GRHL2-Zielgens CDH1. Zur Kontrolle der geladenen Proteinmengen wurde die HSC70-Proteinexpression untersucht. B, relative Quantifizierung der GRHL2-Transkripte durch eine qRT-PCR-Analyse. C, Analyse der Teilungsaktivität von den gezeigten Zellen.

## 3.11. Etablierung und Charakterisierung von MCF-7-Zellen mit stabiler GRHL2-Überexpression

Da mit den MDA-MB-468-Zellen kein geeignetes GRHL2-Überexpressionssystem generiert werden konnte, sollten MCF-7-Zellen mit stabiler GRHL2-Überexpression erzeugt werden. Auch diese Zelllinie hat eine relativ geringe GRHL2-Proteinexpression und bildet nach subkutaner Implantation in Nacktmäuse Tumore [Price, 1990]. Um Zellklone mit einer stabilen GRHL2-Überexpression zu erzeugen, wurde dasselbe Expressionsplasmid wie für die Transfektion der MDA-MB-468-Zellen verwendet. MCF-7-Zellklone mit stabiler GRHL2-Überexpression wurden durch eine Western-Blot-Analyse mit einem HA-spezifischen Antikörper identifiziert. Wiederum wurden zwei Zellklone mit besonders starker GRHL2-Überexpression (MCF-7/GRHL2#1 und #2) hinsichtlich der bereits bei der Charakterisierung der MDA-MB-468-Zellen untersuchten Zelleigenschaften analysiert. Zusätzlich erfolgte die Western-Blot-Analyse des GRHL2-Zielgens ERBB3 in den untersuchten Zellen, welches mittlerweile durch parallel durchgeführte Experimente als GRHL2-Zielgen identifiziert werden konnte (siehe 3.4.).

Aus den in Abb. 31 gezeigten Ergebnissen geht hervor, dass es gelungen ist, in den stabil transfizierten MCF-7-Zellen eine 10- bzw. 15-fache Überexpression des GRHL2-Transkriptes zu erzeugen. In den Zellklonen mit einer GRHL2-Überexpresion kommt es überraschenderweise zu einer deutlichen Repression der ERBB3-Proteinexpression, während die E-Cadherin-Proteinexpression leicht ansteigt. Erstaunlicherweise proliferieren die GRHL2-überexprimierenden langsamer als die parentalen und Vektor-transfizierten MCF-7-Zellen, so dass die GRHL2-Überexpression in den MCF-7-Zellen in Hinblick auf die ERBB3-Expression und die Teilungsaktivität die genau gegenteiligen Effekte wie in NIH3T3-Zellen induziert hat. Womit gezeigt wurde, dass GRHL2 in MCF-7-Zellen eher eine Tumorsuppressor-Funktion ausübt.



Abb. 31: Charakterisierung von GRHL2-überexprimierenden MCF-7-Zellklonen. A, Western-Blot-Analyse von Ganzzellextrakten der gezeigten Zelllinien. Es wurde die GRHL2-Proteinexpression unter Verwendung des α-GRHL2-Peptid-1-Antikörpers und eines HA-spezifischen Antikörpers analysiert. Außerdem erfolgte die Analyse der Proteinexpression der GRHL2-Zielgene ERBB3 und CDH1. Zur Kontrolle der geladenen Proteinmengen wurde die HSC70-Proteinexpression untersucht. B, relative Quantifizierung der GRHL2-Transkripte durch eine qRT-PCR-Analyse. C, Analyse der Teilungsaktivität von den gezeigten Zellen.

### 3.12. Studien zur Regulation der Aktivität des GRHL2-Proteins

Es konnten erfolgreich GRHL2-überexprimierende Zellklone der Zelllinien MCF7 und MDA-MB-468 generiert werden (siehe 3.10. und 3.11.). Die Überexpression des GRHL2-Transkriptionsfaktors führte in MCF-7-Zellen jedoch nicht in MDA-MB-468-Zellen zu Veränderungen der Expression von GRL2-Zielgenen und der Teilungsaktivität. Dies ließ den Schluss zu, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors GRHL2 möglicherweise noch durch andere Faktoren, wie z.B. durch Phosphorylierung und Interaktion mit anderen Proteinen bestimmt sein könnte.

## 3.12.1. Darstellung des GRHL2-Proteins in einer Western-Blot-Analyse nach zweidimensionaler Proteinauftrennung

Um zu untersuchen, ob die Aktivität von GRHL2 durch Phosphorylierung reguliert sein könnte, wurde eine 2D-Western-Blot-Analyse durchgeführt. Durch eine Phosphorylierung wird zusätzliche negative Ladung an ein Protein angefügt. Dies bewirkt eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes in den sauren Bereich. Proteine mit unterschiedlichen Phosphorylierungsstatus lassen sich daher in der zweidimensionalen Gelelektrophorese als multiple Signale darstellen, die sich nicht wesentlich in ihrem scheinbaren Molekulargewicht jedoch in ihrem isoelektrischen Punkt unterscheiden. Um aus den Zellextrakten von drei Zelllinien mit stabiler GRHL2-Überexpression, die im Laufe dieser Doktorarbeit hergestellt wurden, derartige Signalmuster darzustellen, wurden die entsprechenden Ganzzellextrakte mit Hilfe einer zweidimensionalen Proteinauftrennung und anschließender Western-Blot-Analyse mit einem GRHL2-überexprimierenden NIH3T3- MCF-7- und MDA-MB-468-Zellen ist in Abb. 32 dargestellt.

In den 2D-Western-Blot-Analysen konnte das GRHL2-Protein in multiplen Signalen dargestellt werden. Möglicherweise lassen sich die Signale auf eine Phosphorylierung des GRHL2-Proteins zurückführen. Die multiplen Signale sind aber allenfalls Indizien für eine Phosphorylierung, weil auch andere Proteinmodifikationen oder auch Proteinisoformen zur Bildung von Signalketten führen können. Die ermittelten Ergebnisse der 2D-Western-Blot-Analysen besitzen daher nur vorläufigen Charakter.



Abb. 32: Zweidimensionale Western-Blot-Analyse des GRHL2-Proteins in GRHL2-überexprimierenden Zelllinien. Ganzzellextrakte der gezeigten Zelllinien wurden durch eine zweidimensionale Elektrophorese im pH-bereich von 4 bis 7 aufgetrennt und anschließend immobilisiert. Die spezifische Detektion des GRHL2-Proteins erfolgte mit dem α-GRHL2-Peptid-1-Antikörper.

## 3.12.2. Expressions analyse der Transkriptionsfaktoren GRHL1 und GRHL3 in humanen Mammakarzinom-Zelllinien

Die Transkriptionsfaktoren GRHL1 und GRHL3 bilden mit dem GRHL2-Protein Hetero-Dimere [Wilanowski et al., 2002, Ting et al., 2003] und binden zudem an die gleiche Konsensus-DNA-Sequenz [Ting et al., 2005; Wilanowski et al. 2008]. Um mögliche Interaktionspartner von GRHL2 zu identifizieren, wurden Northern-Blot-Hybridisierungen durchgeführt. Es wurden Gesamt-RNA-Präparationen der zehn Mammakarzinom-Zelllinien in einer denaturierenden Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf einer Nylonmembran immobilisiert. Der spezifische Nachweis der mRNA-Expression von GRHL1 und GRHL3 erfolgte durch Hybridisierung mit spezifischen, radioaktiv-markierten DNA-Sonden. In Abb. 33 sind die Ergebnisse der Northern-Blot-Analyse von GRHL1 und GRHL3 gezeigt.

Die Northern-Blot-Analysen von GRHL1 und GRHL3 zeigen, dass beide Gene in humanen Mammakarzinom-Zelllinien exprimiert werden. Wie schon bei der GRHL2-Expressionanalyse zu beobachten war, ist die Expression von GRHL1 und GRHL3 in den untersuchten Zelllinien differentiell. Außerdem ist die Expression von Genen der Grainyheadlike Familie in den analysierten Zelllinien jeweils unterschiedlich, was vermuten lässt dass die Expression von GRHL2-Proteinen unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterworfen ist. Aufgrund der hohen Expression des GRHL3-Gens in der Zelllinie MDA-MB-468 kommt eine mögliche Interaktion des GRHL3-Genproduktes mit dem GRHL2-Genprodukt in Frage.



Abb. 33: Northern-Blot-Analyse von humanen Mammakarzinom-Zelllinien hinsichtlich der Expression von GRHL1 und GRHL3. Für die Hybridisierungen wurden <sup>32</sup>P-markierte cDNA-Fragmente der beiden Gene verwendet. Als Ladekontrolle diente ein Ethidium-Bromid-gefärbtes Agarosegel. Die Lauffront der 28S- und 18S-rRNA sind am Rand markiert.

## 3.13. GRHL2-Protein-Expression in humanen Geweben

Für die Bestimmung der GRHL2-Protein-Expression in humanen Geweben wurde ein kommerziell erhältlicher, multipler Gewebe-Array (TMA, ISU ABXIS CO., LTD, A103 (IV), Seoul, Süd-Korea) verwendet. Dieser TMA, auf dem insgesamt 54 Gewebetypen mit jeweils zwei Stanzen (Durchmesser 1 mm) lokalisiert waren, wurde mit dem Affinitätschromatographisch gereinigten Antikörper  $\alpha$ -GRHL2-P2 Antikörpers immungefärbt (siehe 2.4.10). Da es sich bei der überwiegenden Anzahl der GRHL2-exprimierenden Gewebe um Epithelien handelte, sind die wichtigsten Ergebnisse der Immunfärbungen epithelialer Strukturen verschiedener Lokalisation in Tab. 11 zusammengefasst.

Gewebelokalisation	GRHL2-Expression
Larynx	++
Pharynx	++
Cavum oris	++
Cutis	++
Pulmo	+++
Mamma	+
Hepar	+
Vesica billaris	++
Oesophagus	+
Gaster	-/+
Duodenum	+
Jejunum	++
Ileum	+
Appendix	++
Colon	+++
Rectum	+
Appendix vermiformis	+
Prostata	++
Exocervix	++/+++
Endocervix	+
Endometrium, proliferativ	++/+++
Endometrium, sekretorisch	-/+
Ovarium	++
Cortex renalis	+
Medulla renalis	+
Cortex glandulae suprarenalis	+
Ureter	++
Vesica urinaria	++

Tab. 11: GRHL2-Expression in humanen Geweben

+: schwache, ++: moderate, +++: starke GRHL2-Expression

Die GRHL2-Immunfärbung war vorwiegend im Nukleus zu beobachten. Endothelzellen der gewebeständigen Gefäße zeigten teilweise schwache bis mäßige zytoplasmatische GRHL2-Immunreaktion. Auch in der Plazenta und Dezidua wird GRHL2 exprimiert. In den folgenden Geweben ließ sich mit dem vorliegenden Normalgewebe-TMA jedoch keine GRHL2-Expression nachweisen: Kleinhirn, Herz, Tonsillen, Milz, Speicheldrüsen, Schilddrüse, Skelettmuskulatur, Pankreas, Nabelschnur, Eileiter, Hoden oder im Nebennierenmark. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das GRHL2-Protein in einer Vielzahl von adulten Geweben exprimiert wird. Aufgrund der geringen Größe der Gewebeproben sowie der limitierten Anzahl an Stanzen lassen sich jedoch keine weiteren allgemeingültigen Aussagen zum jeweiligen Gewebetyp treffen. Dennoch lässt sich zusammenfassend festhalten, dass GRHL2 vorwiegend im Kern von Epithelzellen exprimiert wird.

## 3.14. GRHL2-Protein-Expression in humanen Tumoren

Zur Untersuchung der GRHL2-Proteinexpression in unterschiedlichen Tumorentitäten wurde der kommerziell erhältliche Tumor-TMA (ISU ABXIS CO., LTD, A301(V), Seoul, Süd-Korea) mit dem polyklonalen Antikörper  $\alpha$ -GRHL2-P2 Antikörpers immungefärbt (siehe 2.4.10). Auf diesem TMA waren Gewebe von 30 unterschiedlichen Tumorentitäten (je 2 Stanzen eines Tumorgewebes sowie eine Stanze mit Normalgewebe, das angrenzend an den Tumor mit resektiert wurde) mit jeweils einem Durchmesser von 1 mm aufgebracht. Die Auswertung des Arrays ist in Tab. 12 zusammengefasst. Aus der Auswertung ist ersichtlich, dass das GRHL2-Protein in verschiedenen, vorwiegend epithelialen malignen Tumoren exprimiert wird. Zur Bestätigung der ebenfalls in der Tabelle erfassten Expressionsstärke müssen jedoch weitere Fälle der entsprechenden Tumorentitäten bzw. Gewebetypen analysiert werden.

Gewebe	Art des Tumors	GRHL2-Expression im Tumorgewebe	GRHL2-Exp. im korrespondierenden Normalgewebe
Cutis	Plattenepithelkarzinom	++	+++
Cutis	Melanom	+++	++
Larynx	Plattenepithelkarzinom	+++	+++
Pharynx	Plattenepithelkarzinom	+++	++
Tonsilla	Plattenepithelkarzinom	+++	+++
Glandula	Papilläres Adenokarzinom	-	n.a.
thyroidea			
Glandula thyroidea	Follikuläres Adenokarzinom	++	n.a.
Pulmo	Plattenepithelkarzinom	+++	++
Pulmo	Papilläres Adenokarzinom	+	n.a.
Nephros	Renalzellkarzinom	+	+
Nephros	Papilläres TCC	+++	n.a.
Vesica urinaria	Adenokarzinom	+++	n.a.
Vesica urinaria	Urothel-Karzinom	+++	+++
Mamma	Duktales Mammakarzinom	+	++
Mamma	Lobuläres Mammakarzinom	++	+++
Cervix uteri	Plattenepithelkarzinom	+++	++
Cervix uteri	Muzines Adenokarzinom	++	++
Endometrium	Adenokarzinom	+	+
Ovarium	Seröses Adenokarzinom	+	++
Ovarium	Muzines Adenokarzinom	+++	+
Testis	Seminoma	++/+++	++
Prostata	Adenokarzinom	++	++
Gaster	Adenokarzinom	++	+
Gaster	Siegelring-Karzinom	++	++
Hepar	Leberzellkarzinom	-	-
Hepar	Adenokarzinom	++	+
Vesica billaris	Papilläres Adenokarzinom	+/++	++
Pancreas	Adenokarzinom	++/+++	n.a.
Colon	Adenokarzinom	-/+	n.a.
Nodus lymphaticus	Metastase	++	+

### Tab. 12: GRHL2-Expression in unterschiedlichen Tumorgewebe und korrespondierenden Normalgewebe

+: schwache GRHL2-Expression, ++: moderate GRHL2-Expression, +++: starke GRHL2-Expression, -: keine GRHL2-Expression

### 3.15. GRHL2-Protein-Expression in humanen Mammakarzinomen

Um die Protein-Expression in humanen Mammakarzinomen zu untersuchen, wurde der kommerziell erhältliche TMA (ISU ABXIS CO., LTD, A202(I), Seoul, Süd-Korea) mit dem polyklonalen Antikörper  $\alpha$ -GRHL2-P2 (siehe 2.4.10) immungefärbt. Auf dem TMA befinden sich 78 Stanzen von 39 verschiedenen duktalen Mammakarzinomen und 8 angrenzenden nicht-neoplastischen Geweben.

GRHL2-Expression		-	+	++	+++
Gesamtanzahl der untersuchten Fälle		0	5	13	20
Differenziemungeered	1	0	0	6	1
(Black's Nuclear Grade)	2	0	1	4	8
(Black 51 (defeat Grade)	3	0	4	3	11
T	1	0	1	3	1
(Bloom-Richardson's Grade)	2	0	1	4	12
(Diooni filonardson s orado)	3	0	3	6	7
I multi stan Ctata	+	0	4	5	7
Lympnknoten-Status	-	0	1	8	11
Ö	+	0	3	9	12
Ostrogenrezeptor-Status	-	0	2	4	6
Description	+	0	3	7	7
Progesteronrezeptor-Status	-	0	2	6	11
	+	0	1	8	14
HER2-Status	-	0	4	5	4

$1 a_0$ , $13$ , Auswei tung ues 1 MAS nint Di ustri eusgewei
---

-: keine GRHL2-Expression, +: schwache GRHL2-Expression, ++: mittlere GRHL2-Expression, +++: starke GRHL2-Expression

In allen untersuchten Tumoren konnte eine nukleäre GRHL2-Expression nachgewiesen werden. In 20 Tumoren konnte eine starke GRHL2-Expression detektiert werden, 13 Karzinome zeigten eine moderate GRHL2-Expression, und in 5 Karzinomen war eine leichte GRHL2-Expression zu beobachten. In Tab. 13 sind die Ergebnisse der GRHL2-Immunfärbungen in Abhängigkeit von klinisch-pathologischen Parametern, die vom Hersteller des TMAs zur Verfügung gestellt wurden, dargestellt.

Eine statistische Auswertung, der in Tab. 11 gezeigten Daten ist aufgrund der geringen Fallzahlen nicht sinnvoll. Tumoren mit geringer GRHL2-Expression scheinen jedoch mit der Lymphknotenmetastasierung und einer fehlenden HER2-Überexpression assoziiert zu sein. An den Tumor angrenzendes normales Brustdrüsengewebe, das von 6 Fällen ausgewertet werden konnte, zeigte moderate bis meistens starke nukleäre GRHL2-Expression.

Da Gewebestanzen nur bedingt Aussagen zur Verteilung der Expression innerhalb des Gewebes zulassen, wurden zusätzlich Paraffinschnitte von 10 Mammakarzinompräparaten, die freundlicherweise von Prof. Dr. T. Löning aus dem Institut für Pathologie, UKE zur Verfügung gestellt wurden, mit dem polyklonalen Antikörper  $\alpha$ -GRHL2-P2 (Verdünnung 1:500) immungefärbt (siehe 2.4.10.).

Auch in diesen Mammakarzinomen konnte die nukleäre GRHL2-Expression mit überwiegend mäßiger bis starker Intensität (Abb. 34 C und D) bestätigt werden. Insgesamt konnte eine homogene Verteilung der GLRH2-positiven Tumorzellen im Tumorgewebe beobachtet werden (Abb. 34 C). Interessanterweise ließen sich jedoch vereinzelt invasive Bereiche an der Invasionsfront mit fehlender GLHR2-Expression erkennen (Abb. 34 D, Pfeilmarkierung). Angrenzendes normales Brustdrüsengewebe mit regelrechten Läppchen imponierte ebenfalls mit mäßiger bis starker nukleärer Immunfärbung (Abb. 34 A und B).



Abb. 34: Immunhistochemischer Nachweis der GRHL2-Expression in normalen Brustdrüsengewebe mit regelrechten Läppchen (A, B) und angrenzendem Mammakarzinomen (C, D). Braun: nukleäre GLHR2-Expression, blau: Kerngegenfärbung mit Hämalaun. Der Pfeil markiert den Verlust der GRHL2-Expression in einem invasiven Focus des Tumors. Originalvergrößerung (A. x50, B: x100, C: x200, D: x400).

## 4. Diskussion

Ziel dieses Promotionsvorhabens war es, neue Proto-Onkogene zu identifizieren, die an der Entstehung oder Progression des humanen Mammakarzinoms beteiligt sein könnten. Da die Identifizierung von Proto-Onkogenen experimentell sehr aufwendig ist und sich gleichzeitig andere heutzutage vielfach eingesetzte Arbeitstechniken, wie z.B. der Nachweis differenziell exprimierter Gene mittels "Differential Display" (DD), "Serial Analysis of Gene Expression" (SAGE), DNA-Microarrays, Proteomanalyse oder verwandte Techniken a priori nur bedingt dazu geeignet sind, an der malignen Transformation von Zellen beteiligte Gene zu identifizieren, wurde ein anderer experimenteller Ansatz gewählt, der als "retrovirale cDNA-Expressionsklonierung von Brustkrebs-assoziierten Genen" bezeichnet werden kann. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass sich mit Hilfe dieses experimentell doch sehr aufwendigen Verfahrens interessante Kandidatengene identifizieren lassen, die dann in weiterführenden Expressionsstudien oder funktionellen Analysen im Hinblick auf eine mögliche Bedeutung für das humane Mammakarzinom untersucht werden können.

## 4.1. Methodische Aspekte der retroviralen cDNA-Expressionsklonierung von Proto-Onkogenen

Mit Hilfe der retroviralen cDNA-Expressionsklonierung konnten insgesamt 31 cDNAs mit transformierenden Eigenschaften, die sich von 17 unterschiedlichen Genen ableiten, identifiziert werden. Sieben dieser Kandidatengene sind bisher noch nicht als Proto-Onkogene klassifiziert und meist auch funktionell wenig oder gar nicht charakterisiert worden. Als "proof-of-concept" konnten darüber hinaus weitere zehn Gene identifiziert werden, die bereits als Onkogene in der Literatur beschrieben sind. Somit lässt sich zweifelsfrei feststellen, dass der gewählte experimentelle Ansatz mit großem Erfolg durchgeführt worden ist.

Ein wichtiges Ziel dieses Promotionsvorhabens bestand auch darin, diesen methodischen Ansatz weiterzuentwickeln. Deshalb wurden im Gegensatz zu einer vorangegangenen retroviralen cDNA-Expressionsklonierung von Proto-Onkogenen nicht Oligo(dT)- sondern randomisierte Hexaoligonukleotide für die cDNA-Erststrangsynthese eingesetzt. Obwohl beide Verfahren unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden und auch zur Identifizierung einer gleichen Anzahl von cDNAs mit transformierenden Eigenschaften führten, zeigen die erhaltenen Ergebnisse, dass die Verwendung einer "randomgeprimten" cDNA-Expressionsbibliothek zu favorisieren ist. So gelang bei diesem experimentellen Ansatz die Identifizierung von insgesamt 17 Proto-Onkogenen, während der Einsatz einer "random-geprimten" cDNA-Expressionsbibliothek zur Isolierung von nur fünf unterschiedlichen Proto-Onkogenen führte. Als wesentliche Ursache für diesen gravierenden

Unterschied ist anzuführen, dass die Anzahl von cDNA-Fragmenten, die für den Lymphotoxin-ß Rezeptor (LTBR) kodieren, drastisch reduziert werden konnte. cDNA-Fragmente, die sich vom LTBR-Gen ableiten, stellten die Mehrzahl (16 von 31 cDNAs) der identifizierten cDNA-Fragmente mit onkogenen Eigenschaften bei der Durchführung der retroviralen cDNA-Expressionsklonierung von Proto-Onkogenen mit Hilfe von "Oligo(dT)geprimten" cDNA-Expressionsbibliotheken dar. Die Verwendung "randomgeprimter" cDNA-Expressionsbibliotheken führt also zur Identifizierung von cDNA-Fragmenten, die sich von einer größeren Zahl unterschiedlicher Gene ableiten. Der hauptsächliche Vorteil des in diesem Promotionsvorhaben gewählten experimentellen Ansatzes besteht demnach in der Identifizierung einer größeren Vielfalt von Kandidatengenen, die die Wahrscheinlichkeit deutlich erhöht, noch weitestgehend uncharakteriserte Proto-Onkogene zu finden.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung einer "random-geprimten" cDNA-Expressionsbibliothek könnte darin bestehen, dass gehäuft cDNA-Fragmente generiert werden, die für trunkierte Genprodukte kodieren. Möglicherweise entspricht dies eher der Situation in Tumorzellen, in denen nicht etwa die intakten, sondern mutierte oder trunkierte Proteine als Onkogene wirken. In gewisser Weise ist aber das sehr gute Ergebnis der im Rahmen dieses Promotionsvorhabens durchgeführten cDNA-Expressionsklonierung auch etwas überraschend, weil im statistischen Mittel nur 50 Prozent der in das retrovirale Expressionsplasmid inserierten cDNAs in der richtigen Orientierung vorliegen und somit die Bildung eines Genproduktes ermöglichen. Obwohl bei der Verwendung von "Oligo(dT)geprimten" cDNA-Expressionsbibliotheken 100 Prozent der cDNAs die gewünschte Orientierung innerhalb des retroviralen Expressionsvektors aufweisen sollten, hat sich dieser mögliche Nachteil bei der Verwendung "random-geprimter" cDNA-Expressionsbibliotheken nicht gravierend ausgewirkt. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen im Gegenteil, dass dieser experimentelle Ansatz sogar zur Identifizierung von möglichen Tumorsuppressorgenen führen kann. Dies ist immer dann der Fall, wenn es zur Bildung von "anti-sense"-Transkripten kommt, die durch Komplexierung mit in NIH3T3 exprimierten, endogenen Gentranskripten die Expression des entsprechenden Genproduktes unterbinden. Tatsächlich konnte deshalb auch ein Gen, nämlich das DBNL-Gen, identifiziert werden, das ein mögliches neues Tumorsuppressor-Gen darstellen könnte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine retrovirale cDNA-Expressionsklonierung von Proto-Onkogenen mit großem Erfolg durchgeführt wurde. Durch den Einsatz einer "random-geprimten" cDNA-Expressionsbibliothek konnte darüber hinaus eine deutliche Verbesserung des genetischen "Screenings" erzielt werden. Somit konnten zwei wesentliche Ziele dieses Promotionsvorhabens erreicht werden.

## 4.2. Mittels der retroviralen cDNA-Expressionsklonierung identifizierte Proto-Onkogene

Die zur phänotypischen Selektion von transformierenden cDNA-Fragmenten verwendeten NIH3T3-Zellen haben sich als Modellsystem zur Identifizierung von Genen mit transformierenden Eigenschaften bewährt. Diese Zelllinie wurde als eine Kontakt-inhibierte Zelllinie aus einer Maus-Embryonen-Kultur gewonnen [Jainchill et al., 1969] und erwies sich als exzellentes Modellsystem für eine induzierte Zelltransformation [Der et al., 1982; Parada et al., 1982]. NIH3T3-Fibroblasten sind immoralisiert und zudem präneoplastisch, d.h. sie sind empfänglich für eine Transformation durch das Einbringen einer einzigen genetischen Veränderung. Entsprechend dem mehrstufigen Charakter der Transformation von Zellen kommt es hierbei zu komplexen Wechselwirkungen zwischen dem induzierten genetischen Ereignis und den genetischen Veränderungen, die NIH3T3-Zellen als präneoplastische Zellen ohnehin besitzen. In den NIH3T3-Zellen beobachtet man häufig eine Transformation durch die Aktivierung Ras-assoziierter Signalwege [Land et al., 1983]. Dies kann anhand der Gene, die durch die cDNA-Expressionsklonierung als Proto-Onkogene identifiziert wurden, bestätigt werden. Tatsächlich sind viele der isolierten Kandidatengene funktionell dem Ras-Signalweg zuzuordnen. Beispielsweise interagiert die Raf-1-Kinase direkt mit der Ras-GTPase und trägt somit zur Signalweiterleitung bei [Moodie et al., 1993]. Mit dem REBB1-Gen, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert, wurde zudem ein unmittelbarer Effektor der Ras-vermittelten Signalkaskade als Proto-Onkogen identifiziert [Thiagalingam, 1997]. Es konnten zahlreiche Kandidatengene identifiziert werden, die als GTP-Austauschfaktoren (GEFs) die Aktivität des Ras-Proteins oder anderer Mitglieder der Ras-Familie von GTPbindenden Proteinen beeinflussen [Sondek et al., 2005]. Auch gibt es Hinweise dafür, dass das VAV2-Onkogen und das GNA13-Gen in den Ras-Signalweg eingreifen [Tamas et al., 2003; Fiedler, 2008]. Dennoch ist unmittelbar erkennbar, dass nicht nur Proto-Onkogene, die zuzuordnen mit Hilfe Retrovirus-vermittelten dem Ras-Signalweg sind. cDNA-Expressionsklonierung Als identifiziert wurden. Beispiele hierfür sind der Transkriptionsfaktor GRHL2 und auch das Oberflächenprotein LTßR zu nennen.

Im Folgenden sollen kurz die einzelnen Kandidatengene der retroviralen cDNA-Expressionsklonierung im Hinblick auf ihre mögliche Bedeutung in der Kanzerogenese diskutiert werden. Allerdings möchte ich mich hierbei ausschließlich auf die sieben neuen, mit Hilfe der retroviralen cDNA-Expressionsklonierung identifizierten Proto-Onkogene konzentrieren:

ARHGEF19: Das ARHGEF19-Gen Familie der Guaningehört zu der nukleotidaustauschfaktoren (GEFs). Die Genprodukte dieser Genfamilie sind zytoplasmatisch lokalisiert und an der intrazellulären Weiterleitung der Wachstumssignale von Rezeptor-Tyrosinkinasen beteiligt, indem sie die Aktivität von kleinen GTPasen (z.B. der Ras-GTPase) regulieren. Bei einer Überexpression der GEF-Faktoren kann es zu einer Aktivierung der GTPasen und damit zur konstitutiven Signalweiterleitung kommen [Schiller, 2006]. Dieser Mechanismus ist für einige Mitglieder der GEF-Familie beschrieben, wie beispielsweise für das ebenfalls in der Retrovirus-vermittelten cDNA-Expressionsklonierung als Proto-Onkogen identifizierte ARHGEF1-Gen [Chikumi et al., 2004]. Über die Bedeutung des ARHGEF19-Gens bei Krebserkrankungen liegen bisher keine Erkenntnisse vor. Es existiert lediglich eine Studie, bei der die Gewebsexpression dieses Gens untersucht wurde [Wang et al., 2004].

<u>PCTAIRE</u>: Dieses Gen gehört zu der Cdc2-Subfamilie der Serin/Threonin-Proteinkinasen. Interessanterweise erwies sich eine sehr kurze cDNA-Sequenz dieses Gens von nur etwa 380 Basenpaaren im durchgeführten "Screening" als transformierend. Demnach reicht die Expression eines N- und C-terminal trunkierten PCTAIRE-Genprodukts aus, um die Transformation der NIH3T3-Zellen zu induzieren. Dieses Gen ist bisher nur sehr unzureichend charakterisiert und seine genaue zelluläre Funktion ist nicht bekannt. Die Zugehörigkeit zur Genfamilie der Cdc2-Proteinkinasen deutet jedoch auf eine Funktion in der Regulation des Zellzyklus hin [Okuda et al., 1992].

<u>DBNL</u>: Das DBNL-Genprodukt ist mit dem Aktinzytoskelett assoziiert und zudem am intrazellulären Vesikeltransport beteiligt [Garces et al., 1999; Connert et al., 2006]. Eine Verbindung dieses Gens zu einer Krebserkrankung konnte bisher nicht gezeigt werden. Die Identifizierung des DBNL-Gens im durchgeführten "Screening" sticht dadurch hervor, dass die cDNA dieses Gens in "Antisense"-Orientierung in den retroviralen Vektor pMXs inseriert war. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass es zur Bildung von "anti-sense"-Transkripten kommt, die durch Komplexierung mit in NIH3T3 exprimierten, endogenen Gentranskripten die Expression des entsprechenden Genproduktes unterbinden [Wu und Belasco, 2008]. Das DBNL-Gen wäre somit nicht als potentielles Proto-Onkogen sondern als potentielles Tumorsuppressor-Gen zu klassifizieren.
<u>RREB1</u>: Das RREB1-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor mit einer Zink-Finger-DNA-Bindungsdomäne. In Folge einer Aktivierung des Ras-Signalweges beeinflusst das RREB1-Genprodukt die Transkription von unterschiedlichen Effektorgenen [Thiagalingham et al., 1996]. Im Einklang mit den von uns erhaltenen Daten wird dieses Gen mittlerweile zu Recht als mögliches Proto-Onkogen eingestuft [Uren et al., 2008]. Obwohl eine Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors für das Prostatakarzinoms jüngst erkannt wurde [Mukhopadhyay et al., 2007], ist die mögliche Rolle des RREB1-Genproduktes für das Mammakarzinom bisher noch nicht untersucht worden.

<u>LRCH4</u>: Zum Zeitpunkt des Abschlusses der Expressionsklonierung war das LRCH4-Gen völlig uncharakterisiert. Mittlerweile wurden aber zwei Arbeiten publiziert, in denen gezeigt werden konnte, dass das LRCH4-Genprodukt ein Transportprotein ist, welches sowohl im zytoplasmatischen als auch im nukleären Raum lokalisiert sein kann [Shiio et al., 2006] [Sahu et al., 2008]. Im Kern bindet es an den mSin3-Ko-Repressor-Komplex, der mit DNA-Deacetylasen assoziiert ist und die Repression unterschiedlicher Gene bewirken kann [Sahu et al., 2008]. In beiden genannten Arbeiten wird die Genbezeichnung SAP25 bevorzugt.

<u>C14orf10</u>: Dieses Gen war zunächst nur als offener Leserahmen auf Chromosom 14 annotiert und eine mögliche Funktion und Lokalisation innerhalb der Zelle ließ sich nur schwer zuordnen. In einer kürzlich publizierten Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass dieses Gen, das mittlerweile die Bezeichnung MUDENG trägt, an der FAS-induzierten Apoptose beteiligt ist [Lee et al., 2008].

<u>GRHL2</u>: Mit dem GRHL2-Gen gelang es, einen weiteren Transkriptionsfaktor mit transformierenden Eigenschaften zu identifizieren. Das GRHL2-Gen ist als nahezu uncharakterisiert einzustufen. Kürzlich wurde aber in zwei Arbeiten gezeigt, dass sowohl das orthologe Grainyhead-Gen aus *Drosophila* als auch das murine Grhl3-Gen essentiell für Wundheilungsprozesse ist [Mace et al., 2005; Ting et al., 2005]. Aufgrund der bereits in der Einleitung erläuterten Parallelen zwischen der Wundheilung und Krebsprogression konnte deshalb ein enger Zusammenhang zwischen dem GRHL2-Gen und Krebs vermutet werden.

# 4.3. Kriterien für die Auswahl eines Kandidatengens für weiterführende Studien

Obwohl sich prinzipiell alle sieben mit Hilfe der retroviralen cDNA-Expressionsklonierung identifizierten Proto-Onkogene für weitere Studien eignen, sollte im Rahmen dieses Promotionsvorhabens aufgrund der zeitlichen Limitation nur eines davon in weiterführenden Untersuchungen im Hinblick auf seine mögliche Bedeutung für das humane Mammakarzinom näher charakterisiert werden.

Es wurden deshalb verschiedene Auswahlkriterien definiert, anhand derer das vermeintlich interessanteste Gen herausgefiltert werden sollte. Zu diesen Kriterien gehörte u.a. eine Expression des betreffenden Gens in kultivierten Mammakarzinom-Zelllinien als mögliche Indikation für eine physiologische Relevanz für diese Tumorentität. Differentiell in verschiedenen Tumorzelllinien unterschiedlicher Malignität exprimierte Gene sind möglicherweise als interessanter einzustufen als solche, für die sich keine wesentlichen Expressionsunterschiede nachweisen ließen. Gerade auch im Hinblick auf die Erzeugung von Modellsystemen, z.B. durch eine Überexpression des betreffenden Gens in defizienten Mammakarzinomzellen, war das Expressionsmuster ein ganz wichtiges Kriterium für die Auswahl eines Kandidatengens. Natürlich wurden auch die bereits publizierten Daten berücksichtigt und bioinformatische Analysen durchgeführt. Neben den genannten Auswahlkriterien war es außerdem wichtig, ob die zur funktionellen Charakterisierung eines Gens notwendigen Analysemethoden in der Arbeitsgruppe etabliert sind und eine entsprechende apparative Ausstattung vorhanden ist. Ferner ist nicht ganz auszuschließen, dass zusätzlich zu einer Vielzahl eher wissenschaftlichen Kriterien auch eine persönliche Präferenz bei der Auswahl eines geeigneten Kandidatengens eine Rolle gespielt haben könnte. Auf der Basis dieser Kriterien wurde letztlich das GRHL2-Gen als das vermeintlich interessanteste Gen für weiterführende Studien ausgewählt. Diese Auswahl impliziert keineswegs, dass die nicht ausgewählten Proto-Onkogene uninteressant sind. Es ist sehr gut möglich, dass mit sich stetig verändernder Datenlage andere Kandidatengene in Zukunft in den Vordergrund des Interesses rücken und die Basis für weitere Projekte der Arbeitsgruppe bilden könnten.

### 4.4. Onkogene Eigenschaften des GRHL2-Gens

Die phänotypische Selektion von cDNAs mit transformierenden Eigenschaften mittels der Retrovirus-vermittelten cDNA-Expressionsklonierung basiert ausschließlich auf der Aufhebung der Kontaktinhibition. Um ein Kandidatengen tatsächlich als Proto-Onkogen einstufen zu können, mussten deshalb weitere Transformationsassays durchgeführt werden. Um zu untersuchen, ob der Transkriptionsfaktor GRHL2 zur malignen Transformation von Zellen befähigt ist, wurden NIH3T3-Fibroblasten mit einem Expressionskonstrukt, das für ein FLAG-getaggtes GRHL2-Protein kodiert, stabil transfiziert und die Transfektanden anschließend in verschiedenen Transformationsassays getestet. Die Ergebnisse der Transformationsassays lassen eindeutig den Schluss zu, dass GRHL2 ein onkogenes Potential besitzt. So induziert die Überexpression von GRHL2 deutliche morphologische Veränderungen, einen Anstieg in der Zellproliferation, ein verankerungsunabhängiges Wachstum im Weich-Agar-Assay und auch Tumorbildung in Nacktmäusen. Zusammenfassend lässt sich deshalb festhalten, dass der Transkriptionsfaktor GRHL2 tatsächlich ein neues Proto-Onkogen darstellt.

In einer kürzlich publizierten Studie, in der genetische Determinanten identifiziert werden sollten, die an der Progression des Leberzellkarzinoms beteiligt sind, konnte gezeigt werden, dass eine durch eine Gen-Amplifikation bedingte erhöhte Expression von GRHL2 mit einem frühen Rezidiv des Leberzellkarzinoms assoziiert ist [Tanaka et al., 2008]. Dieser Befund ist ein Indikator dafür, dass GRHL2 zumindest in bestimmten Tumorentitäten tatsächlich eine onkogene Funktion ausüben könnte. Ob die Expression von GRHL2 auch die Entstehung und Progression des Mammakarzinoms begünstig, müssen jedoch weiteren Studien erst zeigen.

## 4.5. Mechanismen der GRHL2-induzierten malignen Transformation von Zellen

Die onkogenen Eigenschaften des Transkriptionsfaktors GRHL2 werden durch Veränderungen in der Expression einer Vielzahl von Genen vermittelt. Bis auf das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin [Wilanowski et al., 2008] und die Telomerase [Kang et al., 2008] konnten bisher noch keine Gene identifiziert werden, deren Expression direkt durch den GRHL2-Transkriptionsfaktor reguliert wird. Um weitere direkt regulierte Gene zu identifizieren und so die Mechanismen der GRHL2-vermittelten Transformation besser zu verstehen, wurde ein komplexer Ansatz gewählt, der sowohl experimentelle als auch bioinformatische Analysen beinhaltete.

Das verwendete Verfahren beruht darauf, dass zunächst mit Hilfe einer vergleichenden Mikro-Array-Analyse von parentalen NIH3T3-Zellen und GRHL2-überexprimierenden NIH3T3-Zellen Unterschiede im Transkriptom beider Zelllinien ermittelt werden. Bei den insgesamt 1543 deregulierten Genen handelt es sich um Gene, die entweder direkt oder nur indirekt durch GRHL2 reguliert sein könnten. Um Zielgene, also ausschließlich direkt durch GRHL2 regulierte Gene, zu identifizieren, waren somit weitere Analysen notwendig. Um die potentiellen Zielgene auf eine überschaubare Anzahl zu reduzieren, wurde die willkürliche Annahme getätigt, dass relevante Zielgene mindestens einen 20-fachen relativen Expressionsunterschied in der vergleichenden Mikro-Array-Analyse aufweisen sollten. Die Festlegung dieses relativ stringenten Schwellenwertes beruhte auf der Annahme, dass eine direkte Regulation der Expression eines Zielgens durch den Transkriptionsfaktor GRHL2 sich in einer besonders signifikanten Veränderung im Expressionsniveau widerspiegeln sollte. Mit Hilfe dieser letztlich willkürlichen Festlegung konnte die Anzahl der Zielgene von 1543 auf 113 reduziert werden, was die nachfolgenden bioinformatischen Analysen deutlich vereinfachte. Die anschließende bioinformatische "Phylogenetic Footprinting"-Analyse zielte darauf ab, diejenigen Gene innerhalb dieser Gruppe von 113 Genen zu identifizieren, in deren Promotorregionen sich über Speziesgrenzen (Maus/Mensch) hinweg eine durch einen "Elektrophoretic Mobility Shift Assay" (EMSA) definierte GRHL2-spezifische Konsensus-DNA-Sequenz nachweisen lässt. Eine evolutionäre Konservierung wurde also als wichtiges Indiz dafür gewertet, dass eine Regulation der Genexpression durch den Transkriptionsfaktor GRHL2 physiologisch sehr bedeutsam sein muss. Diese Form der bioinformatischen Analyse stellt ein progressives Verfahren dar, um aus dem unübersichtlichen Expressionsdatensatz einer Mikro-Array-Analyse relevante Informationen zu extrahieren [Zhang und Gerstein, 2003]. Es konnten in den proximalen Promotorsequenzen von acht hoch- und neun herunterregulierten Genen potentielle ortholog-konservierte GRHL2-Bindungstellen identifiziert werden. Abschließend konnten durch eine Promotoranalyse eines der identifizierten GRHL2-Zielgene, nämlich des ERBB3-Gens, die Resultate exemplarisch auch bestätigt werden.

Die hier verwendete Strategie führt sicher durch die letztlich willkürliche Festlegung von Parametern und Schwellenwerten auch dazu, dass wichtige Zielgene des GRHL2-Transkriptionsfakors möglicherweise nicht identifiziert werden konnten. Diese Problematik wird besonders am Beispiel des murinen Gsta3-Gens deutlich. Für das Gsta3-Gen wurde in der vergleichenden Mikro-Array-Analyse eine 1280-fache Hochregulation durch den Transkriptionsfaktor GRHL2 ermittelt. Im Einklang hiermit befinden sich in der proximalen Promotorregion dieses Gens entsprechend gleich drei potentielle GRHL2-Bindungsstellen. Da das Gsta3-Gen Mitglied einer Genfamilie ist, die je nach Spezies entweder aus drei (Maus) oder fünf Mitgliedern (Mensch) besteht, war eine eindeutige Annotation eines orthologen humanen Gens und auch eine "Phylogenetic Footprinting"-Analyse nicht möglich. Obwohl die extreme Deregulation und die drei potentiellen GRHL2-Bindungsstellen im Gsta3-Promotor sehr starke Indizien für eine direkte Regulation darstellen, konnte keine direkte Regulation der Expression dieses Gens durch den GRHL2-Transkriptionsfaktor vorhergesagt werden.

Interessanterweise gelang aber mit der Identifikation von ortholog-konservierten GRHL2-Bindungsstellen in den proximalen Promotoregionen von ERBB3 und ALK der Nachweis, dass der Transkriptionsfaktor GRHL2 auch die Expression von Genen steuert, denen eine besondere Bedeutung in der Karzinogenese zukommt. Beispielsweise handelt es sich bei ALK um eine Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) mit onkogenem Potential, die für eine Vielzahl von Tumorentitäten von Bedeutung ist [Chiarle et al., 2008]. Das ERBB3-Gen ist Mitglied der "Epidermal Growth Factor Receptor" (EGFR) -Familie. Dieses Gen verstärkt bei Ko-Expression mit der Erbb2-Rezeptor-Tyrosinkinase deren transformierende Wirkung und wird häufig in Mammakarzinomen überexprimiert [Holbro et al. 2003; Naidu et al., 1998].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die gewählte Strategie zur Identifizierung von GRHL2-regulierten Zielgenen überaus erfolgreich war, indem aus einem komplexen Expressionsdatensatz von 1543 differentiell exprimierten Genen 17 besonders wichtige Zielgene herausgefiltert werden konnten. Die Identifikation von ERBB3 und ALK als GRHL2-Zielgene ist als ein herausragendes Ergebnis dieser Arbeit anzusehen.

## 4.6. Die Expression von GRHL2 in Mammakarzinom-Zelllinien, normalen und malignen Geweben

Mit der Generierung von zwei GRHL2-spezifischen, polyklonalen Antikörpern ist es gelungen, ein essentielles Werkzeug für die Analyse der GRHL2-Expression zu erzeugen. Deshalb wurde zunächst die Expression von GRHL2 auf Transkript- und Proteinebene in kultivierten humanen Mammakarzinom-Zelllinien unterschiedlicher Malignität untersucht. Dabei zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung der GRHL2-Proteinexpression mit der Expression des GRHL2-Gentranskripts. Das GRHL2-Gen besitzt in den untersuchten Zelllinien ein sehr interessantes, differentielles Expressionsmuster. Erstaunlicherweise ist GRHL2 besonders stark in den eher gutartigen (ZR-75-1, T47-D), nicht aber in den vergleichsweise aggressiven Mammakarzinom-Zelllinien (MDA-MB-435s und MDA-MB-231) exprimiert. In den meisten anderen Zelllinien hingegen ist der Transkriptionsfaktor GRHL2 nur schwach exprimiert. Diese Expressionsdaten deuten eher auf eine mögliche Tumorsuppressor-Funktion von GRHL2 beim Mammakarzinom hin und stehen im krassen Widerspruch zu den Resultaten dieser Arbeit, die eine onkogene Aktivität des GRHL2-Proteins wahrscheinlich erscheinen lassen.

Um diesen möglichen Widerspruch näher zu untersuchen, wurden auch zahlreiche immunhistochemische Studien an diversen normalen und malignen Geweben unter Verwendung von Tissue Micro-Arrays (TMAs) durchgeführt. Eine ausschließlich nukleäre Lokalisation in nahezu allen Epithelien konnte für das GRHL2-Protein nachgewiesen werden. In der bisher einzigen Studie, die sich mit der Gewebsexpression von GRHL2 beschäftigt, konnte das GRHL2-Gentranskript im Innenohr und im Prostatagewebe nachgewiesen werden [Peters et al., 2002]. Ansonsten dominiert eher die Vorstellung, dass es sich bei dem GRHL2-Gen um ein Gen handelt, das bevorzugt während der Embryonalentwicklung exprimiert wird [Auden et al., 2006]. Die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate zeigen erstmalig, das GRHL2 auch in adulten Geweben exprimiert ist und dort eine wichtige Funktion besitzen muss.

Ein Vergleich der Expression von GRHL2 in diversen nicht-neoplastischen und neoplastischen Geweben ergab keine gravierenden Unterschiede, die auf eine Deregulation der Expression in bestimmten Tumorentitäten hinweisen könnten. Beispielsweise ließ sich GRHL2-Protein sowohl im normalen Brustepithel als auch im Tumorgewebe ohne signifikante Expressionsunterschiede nachweisen. Trotz der geringen Anzahl der auf den TMA aufgebrachten Gewebestanzen ließ sich aber die Tendenz ablesen, dass diejenigen Tumore, die eine verminderte GRHL2-Expression besitzen, weniger gut differenziert sind und zudem zur Metastasierung in benachbarte Lymphknoten neigen. Auch wurde vereinzelt beobachtet, dass es zu einem Verlust der GRHL2-Expression an der Invasionsfront kommt, also in dem Bereich, in dem sich Tumorzellen aus der Tumormasse herauslösen und in das umliegende Stroma einwandern. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass eine verminderte GRHL2-Expression eine Dedifferenzierung und Disseminierung von Mammakarzinomzellen begünstigt. Obwohl diese Hypothese durch eine immunhistochemische Analyse der GRHL2-Expression eines sehr großen Kollektivs an Tumorgeweben verifiziert werden müsste, könnte diese hochinteressante Beobachtung erklären, warum die meisten Mammakarzinom-Zelllinien (z.B. MCF-7-Zellen), die ursprünglich aus der Pleura von Tumorpatientinnen isoliert und als permanente Zelllinien etabliert wurden und somit disseminierte Tumorzellen repräsentieren, wenig oder gar kein GRHL2 exprimieren. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob sich der Widerspruch zwischen der scheinbar stabilen Expression des GRHL2-Proteins in normalem und malignen Brustgewebe und der meist geringen Expression in kultivierten Tumorzellen dadurch tatsächlich erklären lässt.

Ferner ist hervorzuheben, dass eine immunhistochemische Analyse mittels der im Rahmen dieses Promotionsvorhabens erzeugten polyklonalen Antikörper den Aktivierungszustand des GRHL2-Proteins nicht darzustellen vermag. Es ist gut möglich, dass GRHL2 ähnlich wie viele andere Transkriptionsfaktoren in seiner Aktivität positiv oder negativ durch Phosphorylierung oder durch Interaktion mit anderen Proteinen (Ko-Aktivatoren bzw. Repressoren) reguliert sein könnte. Obwohl es in der Literatur Hinweise für beide Arten der Regulation der Aktivität von Mitgliedern der Grh-Familie gibt [Ting et al, 2005; Liaw et al., 1995] und auch in dieser Studie erste Hinweise für eine mögliche Phosphorylierung von GRHL2-Proteinen gefunden werden konnten, sind zweifelsohne weitere detaillierte Untersuchungen erforderlich. Es ist somit nicht auszuschließen, dass z.B. die Verwendung

Phospho-spezifischer Antikörper in immunhistochemischen Untersuchungen noch viele unerwartete und spannende Ergebnisse bringen könnte.

### 4.7. Etablierung eines Modellsystems zur Analyse der Funktion von GRHL2 in Mammakarzinom-Zellen

Um die Funktion des Transkriptionsfaktors GRHL2 in humanen Mammakarzinomzellen näher untersuchen zu können, war die Etablierung eines geeigneten Modellsystems unabdingbare Voraussetzung. Es wurde einer Überexpression des GRHL2-Proteins in einer defizienten bzw. GRHL2-schwach-exprimierenden Mammakarzinom-Zelllinie der Vorzug gegenüber einem experimentellen Ansatz gegeben, bei dem die Expression von GRHL2 z.B. durch die siRNA-Technologie vermindert wird. Zunächst wurden MDA-MB-468 Zellen als Rezipientenzellen ausgewählt, weil diese als tumorigen in immundefizienten Mäusen in der Literatur beschrieben sind und zudem eine nur sehr schwache Expression von GRHL2 aufweisen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es gelungen ist, MDA-MB-468-Zellklone mit stabiler GRHL2-Überepression zu erzeugen. Allerdings wiesen diese Zellklone in Bezug auf das Proliferationsverhalten und die Expression von GRHL2-Zielgenen (z.B. E-Cadherin) im Vergleich zu der parentalen MDA-MB-468-Zelllinie keinerlei messbare Veränderungen im Zellverhalten auf.

Da die Überexpression des GRHL2-Gens in der Zelllinie MDA-MB-468 nicht zur Etablierung eines geeigneten Modellsystems führte, wurde eine zweite Zelllinie (MCF-7-Zellen) mit einem GRHL2-Expressionsplasmid stabil transfiziert. Es konnten erfolgreich MCF-7-Zellklone GRHL2-Überexpression mit einer stabilen erzeugt werden. Erstaunlicherweise führte die Expression des GRHL2-Gens in diesen Zellen zu einer Retardierung des Zellwachstums und zu einer Repression der Expression des GRHL2-Zielgens ERBB3 sowie einer Erhöhung der Expression des Metastasierungs-Suppressorproteins E-Cadherin. Das GRHL2-Gen hat demnach in dieser Zelllinie eher den Effekt eines Tumorsuppressorgens als den eines Onkogens.

Aus diesen Transfektionsexperimenten ergeben sich zwei wichtige Fragen. Beispielsweise bleibt offen, warum die Überexpression von GRHL2 nur in ausgewählten Zellsystemen (MCF-7-Zellen) nachweisbare Veränderungen im Zellverhalten induziert. Eine mögliche Ursache könnte darin bestehen, dass die Aktivität des GRHL2-Proteins von weiteren Faktoren wie beispielsweise einer Phosphorylierung oder dem Vorhandensein von Ko-Aktivatoren abhängig ist. Interessanterweise konnte mit Hilfe einer Northern-Blot-Analyse bestimmt werden, dass ein weiteres Mitglied der Grainyhead-like Transkriptionsfaktorfamilie, nämlich das GRHL3-Gen, in der Zelllinie MDA-MB-468 eine ausgesprochen hohe Expression

aufweist. In vorangegangenen Studien anderer Arbeitsgruppen konnte bereits gezeigt werden, dass die Genprodukte von GRHL2 und GRHL3 Heterodimere bilden und zudem an identische DNA-Sequenzen binden [Ting et. al 2003; Ting et al. 2005]. Diese Beobachtungen geben zu der Vermutung Anlass, dass verfügbare DNA-Bindungsstellen in den Promotorregionen von Zielgenen in MDA-MB-468-, nicht aber in MCF-7-Zellen bereits mit GRHL3-Transktiptionsfaktoren abgesättigt sind und die zusätzliche Expression des GRHL2 dadurch keinen weiteren Einfluss auf die Transaktivierung der entsprechenden Gene hat. Wenn diese Hypothese richtig ist, müsste die Analyse der Expression von allen Mitgliedern der Grainyhead-like Transkriptionsfaktorfamilie durchgeführt werden, um die Bedeutung der GRHL2-Proteins in der Karzinogenese abschätzen zu können.

## 4.8. Die Bedeutung des GRHL2-Gens für die Entstehung und Progression des Mammakarzinoms

Um die Bedeutung des GRHL2-Gens bei der Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms einschätzen zu können, muss zunächst einmal die Frage geklärt werden, wie die in dieser Arbeit ermittelten onkogenen Eigenschaften, die dieses Protein zweifelsohne hat. mit Tumorsuppressor-Funktion, sich der möglichen die aus den Transfektionsexperimenten in humanen MCF-7 Mammakarzinom-Zellen ableiten lässt, miteinander in Einklang bringen lassen. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, noch einmal hinzuweisen, dass eine supprimierende darauf Aktivität sich bereits in den immunhistochemischen Studien angedeutet hat, indem gezeigt werden konnte, dass eine verminderte **GRHL2-Expresssion** mit Dedifferenzierung von Zellen und Tumordisseminierung einherzugehen scheint. Trotz des nur vorläufigen Charakters der invitro-Studien und auch der immunhistochemischen Untersuchungen ergeben die Resultate durchaus ein einheitliches Bild und weisen auf eine mögliche Tumorsuppressor- bzw. Metastasierungssuppressor-Funktion des GRHL2-Proteins in Epithelzellen hin. Diese Rolle steht im Einklang mit Daten, die im Zusammenhang mit "Knock-Out"-Experimenten von anderen Mitgliedern der Grainyhead-like Genfamilie bzw. dem orthologen grh-Gen (Drosophila) erhoben wurden. So führt der "Knock-Out" des Grhl3-Gens (Maus) und auch des grh-Gens (Drosophila) dazu, dass sich z.B. neuronale und epidermale Zellen in den entsprechenden Embryonen nicht terminal differenzieren [Ting et al., 2005, Bray und Kafatos, 1991; Maurange et al., 2008]. In Folge dessen entwickeln diese Embryonen bereits in frühen Stadien Dysplasien im Bereich der Epidermis bzw. der Kutikula und sterben nach wenigen Tagen aufgrund eines hohen Flüssigkeitsverlustes [Ting et al., 2005; Mace et al., 2005]. Aus einer Mikro-Array-Analyse von epidermalen Zellen einer GRHL1 "Knock-out" Maus geht

zudem hervor, dass eine Vielzahl desmosomaler Adhäsionsproteine bei fehlender GRHL1-Expression herunterreguliert sind [Wilanowski et al., 2008]. Somit konnte für verschiedene GRHL2-verwandte Gene gezeigt werden, dass sie unmittelbar an der Regulation von Differenzierungs- und auch Zelladhäsionprozessen beteiligt sind, die ganz entscheidend für die Metastasierung von soliden Tumoren sind.

Auch erscheint es möglich, dass die Funktion des GRHL2-Gens von Zelltyp-spezifischen Faktoren abhängig ist, zu denen epigenetische Faktoren, die An- oder Abwesenheit von Ko-Aktivatoren bzw. Repressoren und natürlich auch die Aktivität bestimmter Signalwege, die eine Phosphorylierung des GRHL2-Proteins bewirken können, gehören. So wurde für das grh-Gen (Drosophila) bereits gezeigt, dass neben den anderen Mitgliedern der Grainyheadlike Transkriptionsfaktorfamlilie noch weitere Proteine mit GRHL2 interagieren und an der transkriptionellen Steuerung von Zielgenen mitwirken [Blastyak, 2006]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass das grh-Gen (Drosophila) ein Substrat der mitogen aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase) ERK2 darstellt [Liaw et al., 1995]. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Aktivität des GRHL2-Proteins durch extrazelluläre Stimuli reguliert wird. Möglicherweise sind solche zelltypspezifischen Faktoren dafür verantwortlich, dass die Expression des GRHL2-Gens in den in dieser Arbeit generierten Überexpressionssystemen zu unterschiedlichen Effekten geführt hat. Dennoch scheint es nicht so zu sein, dass sich die onkogene Aktivität von GRHL2 nur in mesenchymalen Zellen, die Suppressoreigenschaften hingegen nur in epithelialen Zellen entfalten. So weisen kürzlich publizierte Daten zum Leberkarzinom darauf hin, dass eine onkogene Funktion von GRHL2 zumindest für diese Tumorentität bedeutsam sein könnte [Tanaka et al., 2008]. In dieser Arbeit konnte der Nachweis erbracht werden, dass das GRHL2-Gen beim Leberkarzinom häufig amplifiziert vorkommt. Interessanterweise korreliert eine GRHL2-Genamplifikation mit einem gehäuften Auftreten von Rezidiven und damit auch mit einer verringerten Überlebenschance der Patienten mit Leberkarzinomen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das GRHL2-Gen wahrscheinlich eher einen reprimierenden Einfluss auf die Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms ausübt. Jedoch sind noch weitere Experimente notwendig, um die möglichen Suppressorfunktionen des Transkriptionsfaktors GRHL2 beim humanen Mammakarzinom zu bestätigen.

### 4.9. Ausblick

Um die Funktion und letztlich auch die klinische Bedeutung des Transkriptionsfaktors GRHL2 für das humane Mammakarzinom zu ermitteln, sind vielfältige molekulare

Untersuchungen notwendig. Eine wichtige Voraussetzung hierfür wurde durch die Generierung eines Modellsystems, den GRHL2-überexprimierenden MCF-7 Zellen, geschaffen. Diese Zellen könnten in zahlreichen in-vitro-Assays (Migrations-, Invasion- und Adhäsionsassays) untersucht werden. Der Einfluss auf Tumorwachstum und Metastasierung könnte durch Implantation der Zellklone in immundefiziente Mäuse analysiert werden. Um die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der GRHL2-induzierten Veränderungen im Zellverhalten aufzuspüren, würde es sich anbieten, wiederum Mikro-Array-Experimente und bioinformatische Analysen durchzuführen – ähnlich denen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Interessant ist zudem die Frage, wie die Expression des GRHL2-Proteins, die in kultivierten Mammakarzinomzellen und auch in Tumorgeweben differentiell ist, reguliert wird. Auch erscheinen weiterführende immunhistochemische Studien zur Expression von GRHL2 in Tumorgeweben eines deutlich größeren Patientenkollektivs und eine anschließende statistische Auswertung der erhaltenen Resultate vielversprechend zu sein. Weitere Untersuchungen zur Phosphorylierung von GRHL2 und ggf. die Erzeugung Phosphospezifischer Antikörper für immunhistochemische Studien, die den Aktivierungszustand von GRHL2 in unterschiedlichen Tumoren darstellen, sind ebenfalls sinnvoll. Um Interaktionspartner des GRHL2-Proteins und somit mögliche Ko-Aktivatoren bzw. Repressoren des GRHL2-Proteins zu identifizieren, bietet sich die Durchführung eines "Yeast-Two-Hybrid-Screenings" an. Ein langfristiges Ziel könnte darin bestehen, ein geeignetes Mausmodell zu generieren. Da die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse eher auf eine mögliche Tumorsuppressor- bzw. Metastasierungssuppressor-Funktion des GRHL2-Proteins in Epithelzellen hindeuten, bietet sich die Erzeugung einer GRHL2-"Knock-out"-Maus an. Allerdings erscheint die Erzeugung eines Mausmodells zum gegenwärtigen Zeitpunkt verfrüht, weil die Suppressorfunktionen des Transkriptionsfaktors GRHL2 noch nicht ausreichend belegt sind und noch weitere Experimente durchgeführt werden sollten. Es ist zu hoffen, dass die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten und erzeugten Modellsysteme eine gute Grundlage für die weitere Erforschung des Transkriptionsfaktors GRHL2 bei der Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms bilden.

## 5. Zusammenfassung:

Ziel dieses Promotionsvorhabens war die Identifizierung von Genen, die an der Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurde ein experimenteller Ansatz, den man als "Retrovirus-vermittelte cDNA-Expressionklonierung von Proto-Onkogenen" bezeichnen kann, durchgeführt. Mit Hilfe dieses sehr aufwendigen "genetischen Screenings", das im Rahmen dieses Promotionsvorhabens auch konzeptionell weiterentwickelt werden konnte, wurden insgesamt 17 Gene mit transformierenden Eigenschaften identifiziert. Sieben dieser Gene konnten bisher noch keine eindeutigen Funktionen in der Zelle zugeordnet werden und sind deshalb als neue Proto-Onkogene einzustufen.

Für weiterführende Studien wurde eines dieser sieben Gene, nämlich der Transkriptionsfaktor GRHL2, ausgewählt. Die onkogenen Eigenschaften von GRHL2 konnten eindrucksvoll dadurch bestätigt werden, dass die Überexpression von GRHL2 in NIH3T3-Fibroblasten deutliche morphologische Veränderungen, einen Anstieg in der Zellproliferation, ein verankerungsunabhängiges Wachstum im Weich-Agar-Assay und auch Tumorbildung in Nacktmäusen induziert.

Um die Mechanismen der GRHL2-induzierten malignen Transformation besser zu verstehen, wurden mit Hilfe der Mikro-Array-Analyse 1543 Gene identifiziert, die entweder direkt oder indirekt durch den Transkriptionsfaktor GRHL2 reguliert werden. Durch einen sehr komplexen Ansatz, der sowohl experimentelle als auch bioinformatische Analysen beinhaltete, konnten 17 Gene herausgefiltert werden, für die die Regulation der Expression durch den GRHL2-Transkriptionsfaktor über Speziesgrenzen hinweg besonders wichtig zu sein scheint. Zu diesen direkt durch GRHL2 regulierten Genen gehören u.a. die Rezeptor-Tyrosinkinasen ERBB3 und ALK, die eine herausragende Rolle bei der Entstehung maligner Erkrankungen spielen.

Durch die Generierung GRHL2-spezifischer, polyklonaler Antikörper konnten erstmals Untersuchungen zur Expression dieses Proteins in kultivierten Tumorzellen sowie in nichtneoplastischen und neoplastischen Geweben durchgeführt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass GRHL2 vorwiegend im Kern der meisten epithelialen Zellen vorkommt. Interessanterweise konnten beim humanen Mammakarzinom Hinweise dafür gefunden werden, dass es zu einem Verlust der GRHL2-Expression in der Karzinogenese kommen kann. Entsprechend konnten zahlreiche Mammakarzinom-Zelllinien identifiziert werden, die wenig oder gar kein GRHL2-Protein exprimieren. Um die Funktion des Transkriptionsfaktors GRHL2 in Tumorzellen zu untersuchen, wurde ein Modellsystem generiert, das auf der stabilen Überexpression von GRHL2 in MCF-7-Zellen beruht. Interessanterweise wurden in MCF-7-Zellen mit GRHL2-Überexpression eine Inhibition der Zellproliferation und ein nahezu vollständiger Verlust der ERBB3-Expression beobachtet. Diese Befunde deuten in Einklang mit den Resultaten der immunhistochemischen Untersuchungen darauf hin, dass GRHL2 in humanen Mammakarzinon-Zellen eher die Funktion eines Tumorsuppressor- bzw. eines Metastasierungs-Suppressorgens ausübt. Jedoch sind noch weitere Experimente notwendig, um die möglichen Suppressorfunktionen des Transkriptionsfaktors GRHL2 beim humanen Mammakarzinom zu bestätigen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es in dieser Arbeit erstmals gelungen ist, für den Transkriptionsfaktor GRHL2 eine mögliche Bedeutung für die Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms darzulegen. Das GRHL2-Gen nimmt wahrscheinlich eine Sonderstellung in der Krebsforschung ein, weil die erhaltenen Daten darauf hindeuten, dass GRHL2 sowohl als Onkogen als auch als Tumorsuppressorgen wirken kann. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten und erzeugten Modellsysteme könnten eine gute Grundlage für die weitere Erforschung des Transkriptionsfaktors GRHL2 bei der Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms bilden.

## 6. Literaturverzeichnis

Aguirre-Ghiso, J. A. (2007). "Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy." Nat Rev Cancer 7(11): 834-46.

Albertsson, P. A., P. H. Basse, et al. (2003). "NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity." Trends Immunol 24(11): 603-9.

Ast, G. (2004). "How did alternative splicing evolve?" Nat Rev Genet 5(10): 773-82.

Auden, A., J. Caddy, et al. (2006). "Spatial and temporal expression of the Grainyhead-like transcription factor family during murine development." Gene Expr Patterns 6(8): 964-70.

Aylon, Y. and M. Oren (2007). "Living with p53, dying of p53." Cell 130(4): 597-600.

Balkwill, F. and A. Mantovani (2001). "Inflammation and cancer: back to Virchow?" Lancet 357(9255): 539-45.

Bergers, G. and L. E. Benjamin (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." Nat Rev Cancer 3(6): 401-10.

Bissell, M. J. and D. Radisky (2001). "Putting tumours in context." Nat Rev Cancer 1(1): 46-54.

Blastyak, A., R. K. Mishra, et al. (2006). "Efficient and specific targeting of Polycomb group proteins requires cooperative interaction between Grainyhead and Pleiohomeotic." Mol Cell Biol 26(4): 1434-44.

Blobe, G. C., W. P. Schiemann, et al. (2000). "Role of transforming growth factor beta in human disease." N Engl J Med 342(18): 1350-8.

Braun, S., F. D. Vogl, et al. (2005). "A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer." N Engl J Med 353(8): 793-802.

Bray, S. J. and F. C. Kafatos (1991). "Developmental function of Elf-1: an essential transcription factor during embryogenesis in Drosophila." Genes Dev 5(9): 1672-83.

Bryan, T. M. and T. R. Cech (1999). "Telomerase and the maintenance of chromosome ends." Curr Opin Cell Biol 11(3): 318-24.

Cao, Y. (2005). "Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis." Nat Rev Cancer 5(9): 735-43.

Cavallaro, U., B. Schaffhauser, et al. (2002). "Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch?" Cancer Lett 176(2): 123-8.

Cech, T. R. (2004). "Beginning to understand the end of the chromosome." Cell 116(2): 273-9.

Chambers, A. F., A. C. Groom, et al. (2002). "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites." Nat Rev Cancer 2(8): 563-72.

Chiarle, R., C. Voena, et al. (2008). "The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer." Nat Rev Cancer 8(1): 11-23.

Chikumi, H., A. Barac, et al. (2004). "Homo- and hetero-oligomerization of PDZ-RhoGEF, LARG and p115RhoGEF by their C-terminal region regulates their in vivo Rho GEF activity and transforming potential." Oncogene 23(1): 233-40.

Classon, M. and E. Harlow (2002). "The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer." Nat Rev Cancer 2(12): 910-7.

Connert, S., S. Wienand, et al. (2006). "SH3P7/mAbp1 deficiency leads to tissue and behavioral abnormalities and impaired vesicle transport." Embo J 25(8): 1611-22.

Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." Cell 116(2): 205-19.

Der, C. J., T. G. Krontiris, et al. (1982). "Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses." Proc Natl Acad Sci U S A 79(11): 3637-40.

Dvorak, H. F. (1986). "Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing." N Engl J Med 315(26): 1650-9.

Fiedler, S. E., M. Bajpai, et al. (2008). "Identification and characterization of RHOAinteracting proteins in bovine spermatozoa." Biol Reprod 78(1): 184-92.

Finkel, T., M. Serrano, et al. (2007). "The common biology of cancer and ageing." Nature 448(7155): 767-74.

Folkman, J. and D. Hanahan (1991). "Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis." Princess Takamatsu Symp 22: 339-47.

Frittoli, E., A. Palamidessi, et al. (2008). "The primate-specific protein TBC1D3 is required for optimal macropinocytosis in a novel ARF6-dependent pathway." Mol Biol Cell 19(4): 1304-16.

Garces, J. A., I. B. Clark, et al. (1999). "Interaction of the p62 subunit of dynactin with Arp1 and the cortical actin cytoskeleton." Curr Biol 9(24): 1497-500.

Garcia, J. A., F. K. Wu, et al. (1987). "Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus." Embo J 6(12): 3761-70.

Green, D. R. (2005). "Apoptotic pathways: ten minutes to dead." Cell 121(5): 671-4.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell 100(1): 57-70.

Harris, C. C. (1996). "Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies." J Natl Cancer Inst 88(20): 1442-55.

Hatakeyama, M. and R. A. Weinberg (1995). "The role of RB in cell cycle control." Prog Cell Cycle Res 1: 9-19.

Heiser, D., V. Labi, et al. (2004). "The Bcl-2 protein family and its role in the development of neoplastic disease." Exp Gerontol 39(8): 1125-35.

Heldin, C. H. and B. Westermark (1999). "Mechanism of action and in vivo role of plateletderived growth factor." Physiol Rev 79(4): 1283-316.

Holbro, T., R. R. Beerli, et al. (2003). "The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A 100(15): 8933-8.

Huang, N. and W. L. Miller (2000). "Cloning of factors related to HIV-inducible LBP proteins that regulate steroidogenic factor-1-independent human placental transcription of the cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc." J Biol Chem 275(4): 2852-8.

Huang, S., N. P. Wang, et al. (1990). "Two distinct and frequently mutated regions of retinoblastoma protein are required for binding to SV40 T antigen." Embo J 9(6): 1815-22.

Hunter, T. and M. Karin (1992). "The regulation of transcription by phosphorylation." Cell 70(3): 375-87.

Inada, R., M. Matsuki, et al. (2000). "Facilitated wound healing by activation of the Transglutaminase 1 gene." Am J Pathol 157(6): 1875-82.

Jainchill, J. L., S. A. Aaronson, et al. (1969). "Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells." J Virol 4(5): 549-53.

Jane, S. M., P. Amrolia, et al. (1995). "Developmental regulation of the human beta-globin cluster." Aust N Z J Med 25(6): 865-9.

Janni, W., B. Rack, et al. (2005). "The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence." Cancer 103(5): 884-91.

Kalluri, R. and M. Zeisberg (2006). "Fibroblasts in cancer." Nat Rev Cancer 6(5): 392-401.

Kang, X., W. Chen, et al. (2008). "Regulation of the hTERT promoter activity by MSH2, the hnRNPs K and D, and GRHL2 in human oral squamous cell carcinoma cells." Oncogene.

Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell 87(2): 159-70.

Kozak, M. (2007). "Some thoughts about translational regulation: forward and backward glances." J Cell Biochem 102(2): 280-90.

Kudryavtseva, E. I., T. M. Sugihara, et al. (2003). "Identification and characterization of Grainyhead-like epithelial transactivator (GET-1), a novel mammalian Grainyhead-like factor." Dev Dyn 226(4): 604-17.

Land, H., L. F. Parada, et al. (1983). "Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes." Nature 304(5927): 596-602.

Lee, H. O. and T. A. Ferguson (2003). "Biology of FasL." Cytokine Growth Factor Rev 14(3-4): 325-35.

Lee, M. R., J. N. Shin, et al. (2008). "A novel protein, MUDENG, induces cell death in cytotoxic T cells." Biochem Biophys Res Commun 370(3): 504-8.

Liaw, G. J., K. M. Rudolph, et al. (1995). "The torso response element binds GAGA and NTF-1/Elf-1, and regulates tailless by relief of repression." Genes Dev 9(24): 3163-76.

Liotta, L. A. and E. C. Kohn (2001). "The microenvironment of the tumour-host interface." Nature 411(6835): 375-9.

Lukashev, M. E. and Z. Werb (1998). "ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour." Trends Cell Biol 8(11): 437-41.

Mace, K. A., J. C. Pearson, et al. (2005). "An epidermal barrier wound repair pathway in Drosophila is mediated by grainy head." Science 308(5720): 381-5.

Martin, P. (1997). "Wound healing--aiming for perfect skin regeneration." Science 276(5309): 75-81.

Massague, J. (2004). "G1 cell-cycle control and cancer." Nature 432(7015): 298-306.

Maurange, C., L. Cheng, et al. (2008). "Temporal transcription factors and their targets schedule the end of neural proliferation in Drosophila." Cell 133(5): 891-902.

Moodie, S. A., B. M. Willumsen, et al. (1993). "Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase." Science 260(5114): 1658-61.

Mueller, M. M. and N. E. Fusenig (2004). "Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer." Nat Rev Cancer 4(11): 839-49.

Mukhopadhyay, N. K., B. Cinar, et al. (2007). "The zinc finger protein ras-responsive element binding protein-1 is a coregulator of the androgen receptor: implications for the role of the Ras pathway in enhancing androgenic signaling in prostate cancer." Mol Endocrinol 21(9): 2056-70.

Naidu, R., M. Yadav, et al. (1998). "Expression of c-erbB3 protein in primary breast carcinomas." Br J Cancer 78(10): 1385-90.

Neumann, A. A. and R. R. Reddel (2002). "Telomere maintenance and cancer -- look, no telomerase." Nat Rev Cancer 2(11): 879-84.

Nüsslein-Volhard, C., E. Wieschaus, et al. (1984). "Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in Drosophila melanogaster. I. Zygotic loci on the second chromosome." Roux's Arch Dev Biol 195(5): 267-282.

Okuda, T., J. L. Cleveland, et al. (1992). "PCTAIRE-1 and PCTAIRE-3, two members of a novel cdc2/CDC28-related protein kinase gene family." Oncogene 7(11): 2249-58.

Overall, C. M. and O. Kleifeld (2006). "Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy." Nat Rev Cancer 6(3): 227-39.

Pantel, K. and R. H. Brakenhoff (2004). "Dissecting the metastatic cascade." Nat Rev Cancer 4(6): 448-56.

Pantel, K., R. H. Brakenhoff, et al. (2008). "Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells." Nat Rev Cancer 8(5): 329-40.

Parada, L. F., C. J. Tabin, et al. (1982). "Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene." Nature 297(5866): 474-8.

Pei, L., Y. Peng, et al. (2002). "PRC17, a novel oncogene encoding a Rab GTPase-activating protein, is amplified in prostate cancer." Cancer Res 62(19): 5420-4.

Peters, L. M., D. W. Anderson, et al. (2002). "Mutation of a transcription factor, TFCP2L3, causes progressive autosomal dominant hearing loss, DFNA28." Hum Mol Genet 11(23): 2877-85.

Price, J. E., A. Polyzos, et al. (1990). "Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice." Cancer Res 50(3): 717-21.

Riese, D. J., 2nd, R. M. Gallo, et al. (2007). "Mutational activation of ErbB family receptor tyrosine kinases: insights into mechanisms of signal transduction and tumorigenesis." Bioessays 29(6): 558-65.

Rodda, S., S. Sharma, et al. (2001). "CRTR-1, a developmentally regulated transcriptional repressor related to the CP2 family of transcription factors." J Biol Chem 276(5): 3324-32.

Rossman, K. L., C. J. Der, et al. (2005). "GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors." Nat Rev Mol Cell Biol 6(2): 167-80.

Sahu, S. C., K. A. Swanson, et al. (2008). "Conserved themes in target recognition by the PAH1 and PAH2 domains of the Sin3 transcriptional corepressor." J Mol Biol 375(5): 1444-56.

Schiller, M. R. (2006). "Coupling receptor tyrosine kinases to Rho GTPases--GEFs what's the link." Cell Signal 18(11): 1834-43.

Shay, J. W. and S. Bacchetti (1997). "A survey of telomerase activity in human cancer." Eur J Cancer 33(5): 787-91.

Shiio, Y., D. W. Rose, et al. (2006). "Identification and characterization of SAP25, a novel component of the mSin3 corepressor complex." Mol Cell Biol 26(4): 1386-97.

Siegel, P. M. and J. Massague (2003). "Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer." Nat Rev Cancer 3(11): 807-21.

Sieweke, M. H. and M. J. Bissell (1994). "The tumor-promoting effect of wounding: a possible role for TGF-beta-induced stromal alterations." Crit Rev Oncog 5(2-3): 297-311.

Solakoglu, O., C. Maierhofer, et al. (2002). "Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors." Proc Natl Acad Sci U S A 99(4): 2246-51.

Stramer, B. and P. Martin (2005). "Cell biology: master regulators of sealing and healing." Curr Biol 15(11): R425-7.

Sueyoshi, T., R. Kobayashi, et al. (1995). "A nuclear factor (NF2d9) that binds to the malespecific P450 (Cyp 2d-9) gene in mouse liver." Mol Cell Biol 15(8): 4158-66.

Swendeman, S. L., C. Spielholz, et al. (1994). "Characterization of the genomic structure, chromosomal location, promoter, and development expression of the alpha-globin transcription factor CP2." J Biol Chem 269(15): 11663-71.

Tamas, P., Z. Solti, et al. (2003). "Mechanism of epidermal growth factor regulation of Vav2, a guanine nucleotide exchange factor for Rac." J Biol Chem 278(7): 5163-71.

Tanaka, Y., F. Kanai, et al. (2008). "Gain of GRHL2 is associated with early recurrence of hepatocellular carcinoma." J Hepatol 49(5): 746-57.

Tao, J., E. Kuliyev, et al. (2005). "BMP4-dependent expression of Xenopus Grainyhead-like 1 is essential for epidermal differentiation." Development 132(5): 1021-34.

Thiagalingam, A., C. Lengauer, et al. (1997). "RREB1, a ras responsive element binding protein, maps to human chromosome 6p25." Genomics 45(3): 630-2.

Ting, S. B., J. Caddy, et al. (2005). "A homolog of Drosophila grainy head is essential for epidermal integrity in mice." Science 308(5720): 411-3.

Ting, S. B., T. Wilanowski, et al. (2003). "Inositol- and folate-resistant neural tube defects in mice lacking the epithelial-specific factor Grhl-3." Nat Med 9(12): 1513-9.

Ting, S. B., T. Wilanowski, et al. (2003). "The identification and characterization of human Sister-of-Mammalian Grainyhead (SOM) expands the grainyhead-like family of developmental transcription factors." Biochem J 370(Pt 3): 953-62.

Tlsty, T. D. and P. W. Hein (2001). "Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals." Curr Opin Genet Dev 11(1): 54-9.

Uren, A. G., J. Kool, et al. (2008). "Large-scale mutagenesis in p19(ARF)- and p53-deficient mice identifies cancer genes and their collaborative networks." Cell 133(4): 727-41.

Uv, A. E., E. J. Harrison, et al. (1997). "Tissue-specific splicing and functions of the Drosophila transcription factor Grainyhead." Mol Cell Biol 17(11): 6727-35.

van 't Veer, L. J., H. Dai, et al. (2002). "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer." Nature 415(6871): 530-6.

Veikkola, T. and K. Alitalo (1999). "VEGFs, receptors and angiogenesis." Semin Cancer Biol 9(3): 211-20.

Venkatesan, K., H. R. McManus, et al. (2003). "Functional conservation between members of an ancient duplicated transcription factor family, LSF/Grainyhead." Nucleic Acids Res 31(15): 4304-16.

Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (1993). "The multistep nature of cancer." Trends Genet 9(4): 138-41.

Wainszelbaum, M. J., A. J. Charron, et al. (2008). "The hominoid-specific oncogene TBC1D3 activates Ras and modulates epidermal growth factor receptor signaling and trafficking." J Biol Chem 283(19): 13233-42.

Wang, Y., H. Suzuki, et al. (2004). "WGEF is a novel RhoGEF expressed in intestine, liver, heart, and kidney." Biochem Biophys Res Commun 324(3): 1053-8.

Weiss, S. R., H. E. Varmus, et al. (1977). "The size and genetic composition of virus-specific RNAs in the cytoplasm of cells producing avian sarcoma-leukosis viruses." Cell 12(4): 983-92.

Werner, S. and R. Grose (2003). "Regulation of wound healing by growth factors and cytokines." Physiol Rev 83(3): 835-70.

Wilanowski, T., J. Caddy, et al. (2008). "Perturbed desmosomal cadherin expression in grainy head-like 1-null mice." Embo J 27(6): 886-97.

Wilanowski, T., A. Tuckfield, et al. (2002). "A highly conserved novel family of mammalian developmental transcription factors related to Drosophila grainyhead." Mech Dev 114(1-2): 37-50.

Woelfle, U., J. Cloos, et al. (2003). "Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer." Cancer Res 63(18): 5679-84.

Wolf, K. and P. Friedl (2006). "Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity." Br J Dermatol 154 Suppl 1: 11-5.

Wright, T. R. (1987). "The genetics of biogenic amine metabolism, sclerotization, and melanization in Drosophila melanogaster." Adv Genet 24: 127-222.

Wright, W. E., M. Binder, et al. (1991). "Cyclic amplification and selection of targets (CASTing) for the myogenin consensus binding site." Mol Cell Biol 11(8): 4104-10.

Wu, L. and J. G. Belasco (2008). "Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs." Mol Cell 29(1): 1-7.

Zaczek, A., B. Brandt, et al. (2005). "The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors and the consequences for therapeutic approaches." Histol Histopathol 20(3): 1005-15.

Zhang, Z. and M. Gerstein (2003). "Of mice and men: phylogenetic footprinting aids the discovery of regulatory elements." J Biol 2(2): 11.

## 7. Anhang

## Tab. 14: Verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage Satorius BP6100	MS Laborgeräte, Heidelberg
Analysenwaage Satorius CP2245	MS Laborgeräte, Heidelberg
Biofuge pico Heraeus	Kendro, Langselbold
Dampfsterilisator	H+P, Oberschleißheim
Digitale Bildverarbeitung KAPPA	KAPPA opto-electronics GmbH, Gleichen
Durchlichtmikroskop Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Durchlichtmikroskop mit Fluoreszenz-	Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar
kanal und Kamera	
Elektroporator Gene Pulser® II	Bio-Rad, München
Ettan <sup>TM</sup> IPGphor <sup>TM</sup>	Amersham Biosciences, Freiburg
Filmentwickler Model Hyperprocessor	Amersham Biosciences, Freiburg
Geldokumentations-System GeneGenius 2	Syngene, Cambridge, UK
Gelkammer ComPor L Mini	Bioplastics RV, Landgraaf, Niederlande
Gießstand Hoefer	Amersham Biosciences, Freiburg
Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg
Hera150-Brutschrank Heraeus	Kendro, Langselbold
Hybridisierungsofen	Techne, Staffordshire, UK
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrowelle	Promicro, München
Minigelkammern Hoefer SE 250	Amersham Biosciences
Netzteil E143	Consort, Turnhout, Belgien
Netzteil E835	Consort, Turnhout, Belgien
pH-Meter inoLab	WTW, Heidelberg
Photometer 6131	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Reagenzglas-Mischer	neoLab, Heidelberg
Rotator 2-1175 neoLab	neoLab, Heidelberg
Mastercycler <sup>TM</sup> ep <i>realplex</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Rollmischer Stuart SRT1	Bibby Sterilin, Staffordshire, UK
Scanner Epson 1680	LaserSoft Imaging AG, Kiel
Schüttler	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Semidry-Blotapparatur	Bio-Rad, München
Sterile Werkbank Hera safe	Kendro, Langselbold
Szintillations-Zähler	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Thermocycler Flexigene	Techne, Staffordshire, UK

Trockenschrank Heraeus B12	Kendro, Langselbold
Ultraschallprozessor UP50H	Dr. Hielscher, Bonn
UV-Stratalinker 1800	Techne, Staffordshire, UK
Wasserbad GFL-1003	GmbH für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge Heraeus 3S-R	Kendro, Langselbold
Zentrifuge Rotofix 32	Hettich, Villingen-Schweningen

### Tab. 15: Zur Klonierung von PCR-Fragmenten verwendete Oligonukleotid-Primer

Name	Art*	Experiment	Schnittstelle	Sequenz
BOMFL-f	f	3.3.1, 3.3.6., 3.10.	NotI	GCGCATCGTAGCGGCCGCTGTCTGCCCATTGC CACGATCCAGG
BOMFL-r**	r	3.3.1.,3.3.6., 3.10.	NotI	GCGCATCGTAGCGGCCGCTTACTTGTCGTCATC GTCTTTGTAGTCGATTTCCATGAGCGTGACCTT GAAGCC
FL-A-f	f	3.3.6.	BamHI	GCGCATCGTAGGATCCGGATCAAACATGTCAC AAGAGTCG
FL-B-f	f	3.3.6.	BamHI	GCGCATCGTAGGATCCGACTAGTGGCCTTAGT GCCCATGC
FL-D-f-Bam	f	3.3.6.	BamHI	GCGCATCGATGGATCCCCTACACCAGTGAGGA TGAAG
FL-AB-r	r	3.3.6.	BamHI	GCGCATCGTAGGATCCGATTTCCATGAGCGTG ACCTTGAAGCC
Prom1-f	f	3.4.4.	XhoI	GCGCATCGATCTCGAGGGAGTGTAGCTGATAG CCTTAGC
Prom2-f	f	3.4.4.	XhoI	GCGCATCGATCTCGAGCGAGCTGGGTACATGA GTTACG
Prom3-f	f	3.4.4.	XhoI	GCGCATCGATCTCGAGGATCTCCTCTTAACCAT CTCCGG
Mut0-f	f	3.4.4.	XhoI	GCGCATCGATCTCGAGCCTCAAGTGATCCAAC CGGCTAGG
Mut1-f	f	3.4.4.	XhoI	GCGCATCGATCTCGAGCCTCAAGTGATCCAAA CGGCTAGG
Mut2-f	f	3.4.4.	XhoI	GCGCATCGATCTCGAGCCTCAAGTGATCCAAC CGTCTAGG
Mut3-f	f	3.4.4.	XhoI	GCGCATCGATCTCGAGCCTCAAGTGATCCAAA CGTCTAGG
Prom-r	r	3.4.4.	HindIII	GCGCATCGATAAGCTTCTGAACAGCCAGCGAT TAGGTGGC

Alle Primer wurden von der Firma Eurofins MWG/Operon im 0,01mmol-Maßstab synthetisiert und hatten den Reinheitsgrad HPSF (High Purity Salt Free)

\* f) forward, r) reverse

\*\* Reinheitsgrad HPLC (High pressure liquid chromatography)

Name	Art*	Experiment	Ziel-Struktur	Sequenz
BOMq-f	f	3.7.	GRHL2-Gen (human)	CATGCCTGATCTCCACTCACAG
BOMq-r	r	3.7.	GRHL2-Gen (human)	CTGCCACCTTCTCGTTCATCA
BOM1q-f	f	3.7.	GRHL2-Gen (human)	CACACACCTTCACCTGCACAG
BOM1q-r	r	3.7.	GRHL2-Gen (human)	TTTGATCCAATGAACTTGCTCC
GAPDH-f	f	3.7.	GAPDH-Gen (human)	TGTTGCCATCAATGACCCCTT
GAPDH-r	r	3.7.	GAPDH-Gen (human)	CTCCACGACGTACTCAGCG
Erbb3-f	f	3.4.1.	Erbb3-Gen (murin)	TCTGCATTAAAGTCATCGAGGAC
Erbb3-r	r	3.4.1.	Erbb3-Gen (murin)	CAGCCGTACAATGTGGGCAT
Stap2-f	f	3.4.1.	Stap2-Gen (murin)	TGGACTCGGATCGGGAGAAT
Stap2-r	r	3.4.1.	Stap2-Gen (murin)	GTGTCTGGTAACTGAGGCAGG
Mertk-f	f	3.4.1.	Mertk-Gen (murin)	CTCGGGGCACATCATTCAATC
Mertk-r	r	3.4.1.	Mertk-Gen (murin)	GAAGTACGACCCATTGTCTGAG
Cflar-f	f	3.4.1.	Cflar-Gen (murin)	CAGGCTTCGCTCCCAAAATTG
Cflar-r	r	3.4.1.	Cflar-Gen (murin)	CTGGTACTCCATACACTGGCT
Trpm4-f	f	3.4.1.	Trpm4-Gen (murin)	TGGCTGTAAGGGACCACCA
Trpm4-r	r	3.4.1.	Trpm4-Gen (murin)	GTACCTTGCGGGGGAATGAGC
Fgfr2-f	f	3.4.1.	Fgfr2-Gen (murin)	AATCTCCCAACCAGAAGCGTA
Fgfr2-r	r	3.4.1.	Fgfr2-Gen (murin)	CTCCCCAATAAGCACTGTCCT
Lims2-f	f	3.4.1.	Lims2-Gen (murin)	CAGAGCGCATCGTCAACAG
Lims2-r	r	3.4.1.	Lims2-Gen (murin)	CGGCCCTCAAACTCGTAGA
Svep1-f	f	3.4.1.	Svep1-Gen (murin)	ACTAGGCTTACCTGTCAAGGAA
Svep1-r	r	3.4.1.	Svep1-Gen (murin)	GGTGGAGAAATGATGACGCC
Fas-f	f	3.4.1.	Fas-Gen (murin)	TGCAAGTGCAAACCAGACTTC
Fas-r	r	3.4.1.	Fas-Gen (murin)	GTCAACAACCATAGGCGATTTCT
Timp3-f	f	3.4.1.	Timp3-Gen (murin)	CTTCTGCAACTCCGACATCGT
Timp3-r	r	3.4.1.	Timp3-Gen (murin)	GGGGCATCTTACTGAAGCCTC
Gapdh-f	f	3.4.1.	Gapdh-Gen (murin)	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
Gapdh-r	r	3.4.1.	Gapdh-Gen (murin)	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
Rpl32-f	f	3.4.1.	Rpl32-Gen (murin)	TTAAGCGAAACTGGCGGAAAC
Rpl32-r	r	3.4.1.	Rpl32-Gen (murin)	TTGTTGCTCCCATAACCGATG

Tab. 16: Zur qRT-PCR-Analyse verwendete Oligonukleotid-Primer

Alle Primer wurden von der Firma Eurofins MWG/Operon im 0,01mmol-Maßstab synthetisiert und hatten den Reinheitsgrad HPSF (High Purity Salt Free) \* f) forward, r) reverse

Name	Art*	Experiment	Ziel-Struktur	Sequenz
PMXS-1	f	3.1.5., 3.1.6.	pMXs-Vektor	GGGTGGACCATCCTCTAGACTGC
PMXS-2	r	3.1.5., 3.1.6.	pMXs-Vektor	AACCTACAGGTGGGGGTCTTTCATTCC
BOMRT-0	f	3.6., 3.7.	GRHL2-Gen	TGTCTGCCCATTGCCACGATCCAGG
BOMRT-3	f	3.6., 3.7.	GRHL2-Gen	TACTCTGGGCTTCACTGGTGCCAAGG
MGR-1	f	3.12.2.	GRHL1-Gen	GTGTACTGTCCCAACCCGAAAGTCC
MGR-3	r	3.12.2.	GRHL1-Gen	TTAGATCTCCGTCAGGGTGAGC
SOM-1	f	3.12.2.	GRHL3-Gen	GGAGATGTGCCAAACTGTTAAGAGTGG
SOM-4	f	3.12.2.	GRHL3-Gen	ATGCTCGAGAGGCCTTACAGCTCC
Con+**	-	3.4.2.	EMSA	AACTAGATAAACCGGTTTTACTAGTT
Con-**	-	3.4.2.	EMSA	TTGATCTATTTGGCCAAAATGATCAA
Mut+**	-	3.4.2.	EMSA	AACTAGATAAAACGTTTTTACTAGTT
Mut-**	-	3.4.2.	EMSA	TTGATCTATTTTGCAAAAATGATCAA

Tab. 17: Sonstige Oligonukleotid-Primer für Sequenzierungen und PCR-Amplifikationen, sowie im EMSA verwendete Oligonukleotide

Alle Primer wurden von der Firma Eurofins MWG/Operon im 0,01mmol-Maßstab synthetisiert und hatten den Reinheitsgrad HPSF (High Purity Salt Free)

\* f) forward, r) reverse

\*\* Reinheitsgrad HPLC (High pressure liquid chromatography)

Antigen	Spezies	Klonname	Herkunft
FLAG	Kaninchen	M2	Sigma-Aldrich, München
HA	Kaninchen	HA-7	Sigma-Aldrich, München
HSC70	Maus	B6	Santa Cruz, Heidelberg
E-Cadherin	Maus	36	BD Biosciences, Heidelberg
ERBB3	Kaninchen	C-17	Santa Cruz, Heidelberg

#### Tab. 18: Verwendete primäre Antikörper

#### Tab. 19: Verwendete sekundäre Antikörper

Antigen	Spezies	Konjugat	Herkunft
Maus: IgG, IgA, IgM	Kaninchen	Peroxidase	DAKO, Glostrupp, Dänemark
Kaninchen: IgG	Ziege	Peroxidase	DAKO, Glostrupp, Dänemark
Ziege: IgG	Schwein	Peroxidase	DAKO, Glostrupp, Dänemark
Maus: IgG, IgA, IgM	Kaninchen	FITC	DAKO, Glostrupp, Dänemark

#### Danksagung

Die Fertigstellung dieser Arbeit wäre durch die Bemühungen von vielen engagierten Menschen nicht zustande gekommen, denen ich im Folgenden danken möchte:

Ausdrücklich danke ich dem Direktor des Instituts für Tumorbiologie, Herrn Prof. Dr. med. Klaus Pantel, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an seinem hervorragend ausgestatteten Institut in einem exzellenten Arbeitsumfeld durchführen zu können. Ich danke ihm für seine fachkundige Begleitung und die beständige Unterstützung meiner Arbeit.

Ganz besonders möchte ich auch Herrn Dr. Volker Assmann für die Bereitstellung eines sehr attraktiven Themas zum Anfertigen meiner Doktorarbeit und für die ausgezeichnete technische und wissenschaftliche Betreuung meines Promotionsvorhabens danken. Er brachte mir stets viel Geduld und Vertrauen entgegen und trug nicht zuletzt durch die vielen fachlichen Diskussionen sehr zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. Wilhelm Schäfer danke ich, für seine Bereitschaft als Vertreter der biologischen Fakultät meine Dissertation zu begutachten.

Mein außerordentlicher Dank gilt auch Frau Dr. Sabine und Herrn PD Dr. Lutz Riethdorf sowie Frau Malgorzata Stoupiec für das große Engagement bei der Anfertigung und Auswertung der immunhistochemischen Färbungen, die ich als Biochemiker nicht ohne weiteres hätte durchführen können.

Herrn Dr. Christian Schulze aus dem Zentrum für molekulare Neurobiologie danke ich für die Mithilfe bei der Durchführung der Phylogenetic Footprinting Analyse und für den tiefen Einblick in die Bioinformatk, den er mir gewährt hat.

Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher, Frau Kornelia Burger und Frau Susanne Feldhaus danke ich für die fachkundige Begleitung der tierexperimentellen Arbeiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch Frau Susann Schirmer für die aufmunternde Unterstützung im rauen Laboralltag, und dafür dass sie immer zur Stelle war, wenn meine zahlreiche Nachkommenschaft mein Engagement außerhalb des Instituts erforderte.

Susann Schirmer und Robert Dittmar danke ich zudem für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Tumorbiologie für den wissenschaftlichen Austausch danken. Ich bedanke mich zudem für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre sowie für die allgegenwärtige und tatkräftige Unterstützung.

Und Stephi, Feli, Marie und Charlotte danke ich für den gänzlich anderen Blick auf das Leben.