

Untersuchungen zur Rolle von EMMPRIN bei der Progression des humanen Mammakarzinoms

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Natalie Reimers
aus Hamburg

Hamburg 2006

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. K. PANTEL
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Priv.-Doz. Dr. J. OLCESE
Tag der Disputation: 28. April 2006

Hamburg, den 01. April 2006



Professor Dr. R. Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Die vorliegende Dissertation wurde im Institut für Tumorbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in Hamburg in der Zeit von April 2002 bis März 2006 angefertigt.

Hamburg, den 2 März 2006

Hiermit versichere ich, Natalie Reimers, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe, wörtliche oder inhaltlich aus anderen Quellen übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe und die Inanspruchnahme fremder Hilfen namentlich aufgeführt habe.

Natalie Reimers

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Das humane Mammakarzinom.....	1
1.1.1 Histopathologische Einteilung.....	1
1.1.1.1 Nicht-invasives und invasives Karzinom.....	1
1.1.1.2 TNM-Klassifikation.....	2
1.1.1.3 Histopathologisches Tumorgrading und Steroid-Rezeptorstatus	3
1.1.2 Prognostische und prädikative Faktoren	3
1.1.3 Progression des Mammakarzinoms	4
1.1.3.1 Schritte der malignen Progression.....	4
1.1.3.2 Bedeutung von MMPs für die maligne Progression	6
1.1.4 Metastasierung des Mammakarzinoms	7
1.1.4.1 Mechanismus der organspezifischen Metastasierung	7
1.1.4.2 Minimale residuelle Krebserkrankung.....	9
1.2 EMMPRIN ein multifunktionales Glykoprotein	11
1.2.1 Entdeckung von EMMPRIN als „Extracellular Matrix Metalloprotease Inducer“	11
1.2.2 Struktur und funktionelle Interaktionen	12
1.2.3 Das EMMPRIN-Gen.....	14
1.2.4 Weitere Funktionen von EMMPRIN.....	14
1.2.5 Bedeutung von EMMPRIN in der malignen Progression.....	15
1.2.5.1 Interaktionen zwischen Wirt- und Tumorzellen.....	15
1.2.5.2 EMMPRIN und Signaltransduktion.....	16
1.3 Fragestellung	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Chemikalien.....	19
2.1.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen.....	19
2.1.3 Verwendete Antikörper	20
2.1.4 Plasmide	21
2.1.5 Geräte	21
2.2 Zellkulturmethoden	23
2.2.1 Herkunft der Zellen	23
2.2.2 Kulturmedien.....	24
2.2.3 Kulturbedingungen.....	24
2.2.4 Auftauen und Einfrieren eukaryontischer Zellen.....	25
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	25
2.3.1 Kultur von <i>E. coli</i>	25
2.3.1.1 Bakterienstämme	25
2.3.1.2 Vermehrung von <i>E. coli</i>	26
2.3.2 Herstellung kompetenter Bakterien.....	26
2.3.3 Vermehrung von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	27
2.3.3.1 Transformation von <i>E. coli</i>	27
2.3.3.2 Plasmid-Präparation im Mini-Maßstab	27
2.3.3.3 Plasmid-Präparation im Maxi-Maßstab.....	27
2.3.4 Restriktionsverdau.....	28
2.3.5 Gelelektrophoretische Analyse von DNA	28

2.3.6	Klonierung von cDNA-Fragmenten.....	29
2.3.6.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	29
2.3.6.2	Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	29
2.3.6.3	Ligation von DNA-Fragmenten.....	29
2.3.7	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen.....	30
2.3.8	Erststrang-cDNA-Synthese.....	30
2.3.9	Isolierung von genomischer DNA aus Zellkulturen.....	31
2.3.10	DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR).....	31
2.3.11	Zielgerichtete Mutagenese.....	34
2.3.12	Automatische DNA-Sequenzierung.....	33
2.4	Zellbiologische Methoden.....	34
2.4.1	Transfektion von Zellen.....	34
2.4.2	Herstellung stabiler Zelllinien.....	35
2.4.3	MTT-Proliferationsassay.....	36
2.4.4	Stimmulierungs-Assays mit dermalen humanen Fibroblasten.....	37
2.4.5	Migrationsassay.....	38
2.4.5.1	Herstellung einer Sphäroid-Zellsuspension.....	38
2.4.5.2	Herstellung einer 3D Kollagen Matrix.....	38
2.4.5.3	Zeitraffer Videomikroskopie.....	39
2.5	RNAi-Technologie.....	39
2.5.1	Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen mit siRNA.....	39
2.5.2	Quantifizierung der zellulären Aufnahme Fluorescein-markierter siRNA.....	41
2.5.3	Herstellung von siRNA-Expressionsvektoren.....	42
2.5.3.1	Herstellung der doppelsträngigen Oligonukleotide zur Klonierung in den Vektor pSilencer 3.1-H1 puro.....	43
2.5.3.2	Klonierung des siRNA Inserts in den pSilencer 3.1-H1 puro Vektor.....	43
2.6	Proteinchemische Methoden.....	44
2.6.1	Herstellung von Ganzzellextrakten.....	44
2.6.2	Proteinbestimmung (nach Bradford, [155]).....	44
2.6.3	Proteinfällung nach Wessel und Flügge.....	45
2.6.4	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....	45
2.6.5	Silberfärbung der Gele.....	47
2.6.6	Westernblot.....	48
2.6.7	Immunoblot.....	48
2.6.8	Entfernung von Antikörpern von Membranen.....	49
2.6.9	Zymogramme.....	49
2.6.10	Immunpräzipitation.....	50
2.7	Glykoprotein-Analysen.....	51
2.7.1	Tunikamycin-induzierte Inhibition der N-Glykosylierung.....	51
2.7.2	Glykosidasebehandlung von Protein.....	52
2.7.2.1	Behandlung mit N-Glykosidase F.....	52
2.7.2.2	Behandlung mit Fucosidase.....	52
2.7.3	Proteinpräzipitation mit Agarose-gekoppeltem Lektin.....	53
2.8	Immunzytochemische und –histochemische Färbungen.....	53
2.8.1	Immunzytochemische Färbung für die Auswertung mittels Durchflusszytometer.....	53
2.8.2	Immunzytochemische Färbung für die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskop.....	54
2.8.3	Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten.....	54
2.8.3.1	Tumorgewebe der Mammakarzinomprognosearrays.....	54
2.8.3.2	Färbung am DAKO-Färbeautomaten.....	55
2.8.3.3	Hämalaun/Eosin-Färbung von Paraffinschnitten.....	56

2.9	Statistische Auswertungen.....	56
2.9.1	Chi-square -Test	56
2.9.2	Univariate Analyse	56
2.9.3	Multivariate Analyse	57
3.	Ergebnisse.....	58
3.1	EMMPRIN-Expression in primären Mammakarzinomen.....	58
3.1.1	EMMPRIN-Expression in primären Mammakarzinom in Korrelation zu klinischen und pathologischen Faktoren.....	58
3.1.2	Prognostische Signifikanz der EMMPRIN-Expression im humanen Mammakarzinom.....	61
3.2	Analyse der Expression von EMMPRIN in humanen Mamma- karzinomzelllinien und primären Tumorzellen.....	63
3.2.1	Expression von EMMPRIN in humanen Mammakarzinomzelllinien.....	63
3.2.3	Expression der EMMPRIN-Varianten in primären Tumorzellen	65
3.3	Untersuchung der molekularen Grundlagen der unterschiedlichen EMMPRIN-Varianten	65
3.3.1	Untersuchungen zu EMMPRIN-Gentranskripten in humanen Mammakarzinomzelllinien.....	66
3.3.2	Untersuchungen zur Glykosylierung von EMMPRIN	67
3.3.2.1	Tunikamycinbehandlung von humanen Mammakarzinomzelllinien.....	67
3.3.2.2	N-Glykosidase F Behandlung von EMMPRIN in humanen Mammakarzinomzelllinien.....	69
3.3.2.3	Nachweis von β 1,6 verzweigten Polylaktosaminen im EMMPRIN-Molekül	69
3.3.2.4	Nachweis von Lewis ^X -Strukturen an der H65 EMMPRIN-Variante.....	70
3.3.3	Vergleich der Expression von EMMPRIN mit der Caveolin-Expression.....	71
3.4	Untersuchungen zur Sezernierung von EMMPRIN	72
3.4.1	Einfluss der Glykosylierung auf die Entstehung des sezernierten EMMPRINs.....	72
3.4.2	Einfluß der transmembranen Region auf die Entstehung der löslichen EMMPRIN Formen.....	72
3.4.2.1	Herstellung der EMMPRIN-Mutante (E218V)EMMPRIN-FLAG.....	73
3.4.2.2	Einfluss des Aminosäureaustausches E218V auf das lösliche EMMPRIN.....	73
3.5	Etablierung von EMMPRIN-FLAG exprimierenden Mammakarzinomzelllinien.....	74
3.5.1	Herstellung des EMMPRIN-FLAG-Expressionsplasmids.....	75
3.5.2	Nachweis der Expression von EMMPRIN-FLAG.....	75
3.5.3	Stabile Transfektion von Mammakarzinomzelllinien mit dem pIRES-N-EMMPRIN-FLAG Expressionsplasmids.....	76
3.5.3.1	Analyse der EMMPRIN-FLAG Expression in den transfizierten Zelllinien.....	76
3.5.3.2	Nachweis der Transkription des EMMPRIN-FLAG Transgens in den transfizierten Zelllinien	77
3.6	RNAi-vermittelte Herunterregulierung von EMMPRIN in humanen Mammakarzinomzelllinien.....	78
3.6.1	Optimierung der Transfektionsbedingungen für siRNA	78
3.6.1.1	Austesten der Transfektionsbedingungen mit Fluorescein-markierter siRNA	78
3.6.1.2	Optimierung der Versuchsbedingungen mit einer validierten siRNA gegen MAPK1.....	80
3.6.2	Validierung einer geeigneten EMMPRIN-spezifischen siRNA.....	80
3.6.3	Stabile Expression von anti-EMMPRIN shRNAs in MDA-MB-231 Zellen....	81
3.6.4	Einfluss der EMMPRIN-Expression auf die Proliferation.....	82
3.6.5	Einfluss der EMMPRIN-Expression auf die Produktion von MMPs	82

3.6.5.1	Effekte der EMMPRIN-Reduktion auf die MMP-Produktion in den MDA-MB-231 Zellen.....	83
3.6.5.2	Effekte der EMMPRIN-Reduktion auf die MMP-Produktion in Fibroblasten.....	83
3.6.6	Einfluss der reduzierten EMMPRIN-Expression auf Zell-Migration.....	84
4.	Diskussion.....	100
4.1	Prognostische Bedeutung der EMMPRIN-Expression in humanen Mammakarzinomen.....	100
4.2.	Expression von EMMPRIN in Mammakarzinomzelllinien.....	101
4.2.1	EMMPRIN wird als H- und als L-Form exprimiert.....	101
4.2.2	Die EMMPRIN L-Form und Caveolin.....	102
4.2.3	Die Expression verschiedener H-Formen.....	103
4.2.4	Identifizierung der H65-Form als Träger von Lewis ^X -Strukturen.....	104
4.4	Das lösliche EMMPRIN.....	105
4.4.1	Sezernierung der unterschiedlichen EMMPRIN-Varianten.....	105
4.4.2.	Bedeutung der transmembranen Region für die Sezernierung.....	106
4.5.	Funktionelle Untersuchungen von EMMPRIN.....	108
4.5.1	Stabile Transfektion von Mammakarzinomzelllinien zur Überexpression von EMMPRIN.....	108
4.5.2	siRNA-vermittelter Knock-Down von EMMPRIN in der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231.....	109
4.5.2.1	Etablierung der RNAi.....	109
4.5.2.2	Optimierung der Transfektionseffizienz.....	109
4.5.2.3	Stabiler Knock-Down von EMMPRIN mittels RNAi.....	110
4.5.3	Korrelation zwischen EMMPRIN-Expression und Proliferation.....	110
4.5.4	Effekte der EMMPRIN-RNAi auf die MMP-Produktion.....	111
4.5.5	Bedeutung von EMMPRIN für die Migration.....	112
4.6	Ausblick.....	113
5.	Zusammenfassung.....	116
6.	Literatur.....	118

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
7-AAD	7-Amino-Aktinomycin
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
BSA	Rinderserumalbumin
CK	Zytokeratin
CMV	Zytomegalievirus
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DCIS	duktales Karzinom in situ
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor
EMMPRIN	extracellular matrix metalloproteases inducer
EMT	epitheliale-mesenchymale Transformation
Erk	extracellular signal-regulated kinase
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting)
FAK	Fokalen-Adhäsions-Kinase
FCS	Fötales Rinderserum
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
FLAG	Peptid bestehend aus den Aminosäuren: DYDDDDK
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter)
G	Differenzierungsstufen (Grading)
G418	Geneticin 418
GF	Gesichtsfeld
h	Stunde
HA	Hyaluronsäure
HAS	Hyaluronsäure-Synthetase
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
H-Form	High-Form
IRES	internal ribosomal entry site
IP3	Phosphatidylinositol 3

kB	Kilobasenpaar
LCIS	lobuläres Karzinom in situ
L-Form	Low-Form
MAPK1	mitogen activated protein kinase 1
MCS	multiple cloning site
MCT	Monocarboxylat-Transporter
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
N	Status der regionalen Lymphknoten (node)
Neo ^R	Neomycin-Resistenzgen
NHDF	normale humane dermale Fibroblasten
M	Status der Fernmetastasen
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i> Leucoagglutinin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
pTNM	postoperative Stadieneinteilung
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
sec	Sekunde
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
T	Tumorgrößen-Stadium
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-gepufferte Essigsäure-EDTA-Lösung
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMA	tissue microarray
U	Unit
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
ÜN	Übernacht
w/v	weight per volume
v/v	volume per volume

1. Einleitung

1.1 Das humane Mammakarzinom

Brustkrebs ist in Deutschland die häufigste Krebserkrankung der Frau; jeder vierte Krebs bei der Frau betrifft die Brust. Jährlich erkranken etwa 48.000 Frauen in Deutschland, wobei nur etwa 15.000 zum Diagnosezeitpunkt jünger als 60 Jahre sind. Das Erkrankungsrisiko steigt ab dem vierten Lebensjahrzehnt mit zunehmendem Alter allmählich an. Insgesamt hat die Häufigkeit dieser Krebsform in Europa in den letzten 20 Jahren zugenommen. Brustkrebs kann in sehr seltenen Fällen auch bei Männern (1 Mann pro 100 Frauen) entstehen (Robert-Koch-Institut, <http://www.rki.de>).

1.1.1 Histopathologische Einteilung

1.1.1.1 Nicht-invasives und invasives Karzinom

Die gesunde weibliche Brustdrüse (Mamma) besteht aus Drüsengewebe, Fett und Bindegewebe. Das Drüsengewebe ist aus Drüsenläppchen (Lobuli) aufgebaut, die die Muttermilch produzieren und in kleine Kanäle (Ducti) münden. Die Kanäle verbinden sich zu großen Ausgängen und führen zur Brustwarze. Als terminale duktulo-lobuläre Einheit bezeichnet man das terminale Gangsegment und das dazugehörige Läppchen. In der

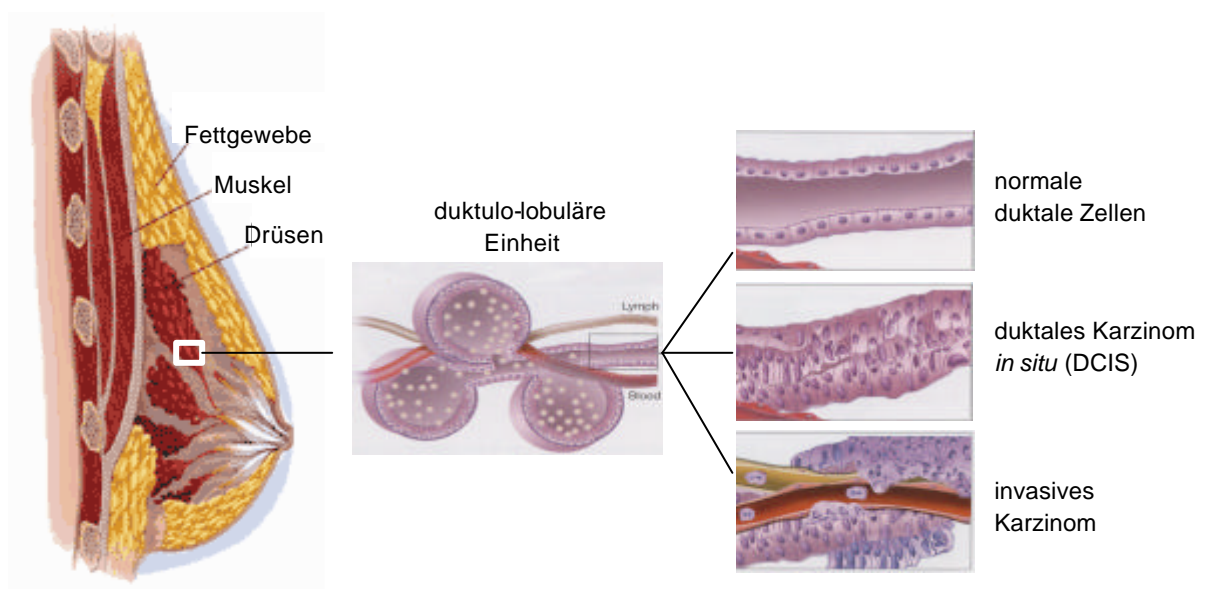


Abb. 1.1: Anatomie der Brust und histologische Veränderungen. Die duktulo-lobuläre Einheit und die versorgenden Lymph- und Blutgefäßen sind vergleichend dargestellt als gesundes Gewebe, als duktales Karzinom in situ (DCIS) und als invasives Karzinom (modifiziert nach [1])

Regel entstehen Karzinome in diesen Prädilektionsstellen. Das Mammakarzinom kann in verschiedene Typen eingeteilt werden: Duktale Karzinome gehen von der Zellschicht an der Innenseite der Milchgänge aus. Lobuläre Karzinome gehen von den Drüsenläppchen aus. Bei 85 % der Fälle handelt es sich um duktale Karzinome. Die Tumorzellen breiten sich dabei zunächst nur innerhalb der Milchgänge und Läppchen aus und wachsen nicht in das Nachbargewebe ein. Wenn dieses in-situ Karzinom die Basalmembran der Milchgänge zerstört und in das angrenzende Stroma, später auch in die Blutgefäße und das Lymphsystem, einwandert, spricht man von einem invasiven Karzinom. Das lobuläre Karzinom *in situ* (LCIS) geht seltener in ein invasives Karzinom über als das duktale Karzinom *in situ* (DCIS) und ist deshalb mit einem besseren Krankheitsverlauf assoziiert. Das invasive lobuläre Karzinom ist mit 10 % das zweithäufigste Karzinom. Seltenerer Formen des invasiven Mammakarzinoms sind z.B. das muzinöse, das medulläre, das papilläre und das tubuläre Karzinom, die eine vergleichsweise günstige Prognose haben [2, 3].

1.1.1.2 TNM-Klassifikation

Die Stadieneinteilung des Mammakarzinoms erfolgt nach der pathologischen TNM-Klassifikation (Staging) und der Bestimmung des Differenzierungsgrades (Grading) [4]. Die TNM-Klassifikation gibt gemäß der Internationalen Union gegen Krebs (UICC) die Tumorgöße (T), den Status der regionalen Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) zum Zeitpunkt der Diagnose an.

Tab. 1.1: pTNM-Klassifikation des Mammakarzinoms

pT	Primärtumor
pT1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT2	Tumor > 2 cm, aber nicht > 5 cm in der größten Ausdehnung
pT3	Tumor > 5 cm in der größten Ausdehnung
pT4	Tumor jeglicher Größe mit Infiltration der Haut oder der Brustwarze
pN	Regionale Lymphknoten
pN0	Kein Hinweis auf Befall der regionalen Lymphknoten
pN+	Metastasen in axilären Lymphknoten
pM	Fernmetastasen
pM0	Kein Hinweis auf Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen vorhanden

Die postoperative (p) pTNM-Klassifikation orientiert sich als histopathologische Einteilung am Operationspräparat (Tab. 1.1).

1.1.1.3 Histopathologisches Tumorgrading und Steroid-Rezeptorstatus

Das histologische Grading der invasiven Mammakarzinome zur Beurteilung des Malignitäts- und des Differenzierungsgrades berücksichtigt das Ausmaß der Tubulusbildung, der Kernpleomorphologie und der Mitoserate und wird in drei Differenzierungsstufen angegeben. G1 stellt dabei ein gut differenziertes, G2 ein mäßig differenziertes und G3 ein schlecht differenziertes Karzinom dar [5, 6]. Wichtig ist auch die Bestimmung von Hormonrezeptoren für Östrogen und Progesteron im Tumorgewebe. Gesundes Brustgewebe wird durch diese Hormone in seinem Wachstum beeinflusst, und auch bei Tumoren ist dies der Fall, sofern die Zellen Hormonrezeptoren aufweisen. Der Nachweis der Expression von Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren im Tumorgewebe erfolgt immunhistochemisch [7].

1.1.2 Prognostische und prädikative Faktoren

Die Bestimmung von prädikativen und prognostischen Faktoren dient dazu, die Therapie auf jeden Patienten individuell abzustimmen. Prognosefaktoren ermöglichen eine Einschätzung des weiteren Krankheitsverlaufs ohne systemische Therapie. Prädikative Faktoren sagen das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie vorher, wobei Faktoren prognostisch und prädikativ zugleich sein können. Der stärkste gesicherte Prognosefaktor beim Mammakarzinom ist der axilläre Lymphknotenbefall. Dabei besteht eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der involvierten Lymphknoten und einer ungünstigen Prognose. Weiterhin sind der Differenzierungsgrad, der histologische Typ, Angioinvasion sowie das Alter wichtige Prognosefaktoren [8-12]. Der Steroidhormon-Rezeptorstatus ist ein schwacher positiver Prognosefaktor, hat aber einen starken prädikativen Wert für das Ansprechen auf eine endokrine Therapie [8]. Neben diesen klassischen Faktoren lassen sich noch weitere, so genannte neue prognostische und prädikative Faktoren bestimmen. Dazu gehören Invasions- und Metastasierungsmarker wie z.B. die Bestimmung der Tumor-assoziierten Protease uPA und zugehörigen Inhibitor PAI 1 [13] oder der Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark (s. 1.1.6), aber auch Proliferationsmarker wie ERBB2 [14], Ki67 [15] und epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR) [16].

Das Protoonkogen *ERBB2* (*HER2/NEU*) kodiert ein transmembranäres Protein, welches zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren-Rezeptoren gehört. 25 – 30% der invasiven Mammakarzinome zeigen eine Überexpression von ERBB2, die ein positiver prädikativer Faktor für die Wirksamkeit einer Therapie mit dem humanisierten Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) ist [17, 18].

Ein interessanter neuerer Ansatz ist die Erstellung individueller Genexpressionsprofile des Tumorgewebes, die möglicherweise von prognostischer und prädikativer Relevanz sind [19, 20].

1.1.3 Progression des Mammakarzinoms

1.1.3.1 Schritte der malignen Progression

Die Entstehung eines Karzinoms bedeutet die Entwicklung eines soliden Tumors aus Epithelzellen. Sie umfasst spezifische Schritte, die mit der Organisation des Epithels zusammenhängen. Obwohl es kontroverse Meinungen gab, ist es inzwischen aufgrund von histopathologischen und genetischen Daten anerkannt, dass die meisten invasiven Mammakarzinome graduell aus Vorstufen entstehen [21]. Es ist aber auch deutlich geworden, dass nicht aus jeder malignen Vorstufe ein Mammakarzinom mit aggressivem Phänotyp entstehen muss [22].

Transformation

Einer der ersten Schritte, der Übergang vom normalen Epithel zum nicht-invasiven Carcinoma *in situ* (s. 1.1.1), ist durch eine erhöhte Mitoserate und der Entdifferenzierung der Zellen gekennzeichnet, die sich u.a. in einer veränderten Zellform, einer gestörten Position der Zellen untereinander und einem Verlust der Gewebestruktur äußert. Diese Zellen sind, wie der Name sagt, noch nicht invasiv, besitzen aber schon zahlreiche Veränderungen auf genomischer und transkriptioneller Ebene [23, 24]. Ab einer Tumorgöße von 2 mm können die Zellen nicht mehr durch Diffusion ernährt werden, für ein weiteres Überleben ist die Entstehung von in den Tumor einwachsenden Blutgefäßen unabdingbar (Angiogenese) [25].

Invasion

Im weiteren Verlauf durchdringen Tumorzellen die Basalmembran. Die Entwicklung der Fähigkeit in das subepitheliale Bindegewebe einzuwandern, die sogenannte Invasion, ist

möglicher Weise das kritischste Ereignis der Tumor-Progression. Für eine Reihe von Genen aus den Bereichen Zelladhäsionsmoleküle, Proteasen und Zytoskelettproteinen ist ein Einfluss auf die Invasion beschrieben [26]. Während der Invasion entstehen Tumorzellnester und einzelne Tumorzellen, die sich aus dem Verband gelöst haben. Voraussetzung hierfür ist der Verlust der Zell-Zell-Adhäsion, die für den Zusammenhalt des normalen Epithels verantwortlich ist. Eines der prominentesten Zelladhäsions-Moleküle, dessen Verlust mit der Progression des Mammakarzinoms korreliert ist, ist E-Cadherin [27, 28]. Invasion bedeutet auch ein aktiver Abbau des tumorzell-umgebenden Bindegewebes der extrazellulären Matrix (EZM). Eine Reihe von EZM-abbauenden Enzymen sind während der Tumorprogression hochreguliert, dazu gehören u.a. Matrix-metalloproteinasen (MMPs), Serinproteasen und Cathepsin [29].

Metastasierung

Der Einbruch von Tumorzellen in die Lymph- und/oder Blutgefäße ist der erste Schritt zur Metastasierung. Dringen Tumorzellen in die Lymphabflusswege ein, bilden sich zunächst Absiedelungen in den regionalen Lymphknoten. Tumorzellen die frei im Blut- oder Lymphsystem zirkulieren, sind starken Scherkräften ausgesetzt und müssen das Potenzial haben, sich vor Angriffen des Immunsystems zu schützen und das Apoptoseprogramm zu umgehen. Bei normalen adhären wachsenden Zellen wird das Apoptoseprogramm aktiv nach Ablösung aus dem Zellverband und der EZM (*Anoikis*) [30]. Tumorzellen, die die Bedingungen in dem Gefäßsystem überleben, können an das Kapillarbett anderer Organe adhären. Die Adhäsion der Zellen an das Endothel bedingt ein Zusammenspiel verschiedener Signalmoleküle und Oberflächenmoleküle, wie Selektine und Integrine, wobei Selektine für die initiale Kontaktaufnahme zuständig sind und Integrine spätere Adhäsions- und Invasionsvorgänge vermitteln [31]. Dieser Vorgang ähnelt dem "Homing" von zirkulierenden Lymphozyten und wird genauso wie das "Homing" durch verschiedene Chemokine beeinflusst [32-35]. In der Abb. 1.2 sind einige Moleküle dargestellt, für die ein Einfluss auf die Adhärenz von Tumorzellen an das Endothel bekannt ist. Erst nach Durchdringen des Endothels und der endothelialen Basalmembran (Extravasation), Invasion des subendothelialen bindegewebigen Stromas des betreffenden Organs und Aktivierung der Proliferation, kann sich eine solide Metastase bilden.

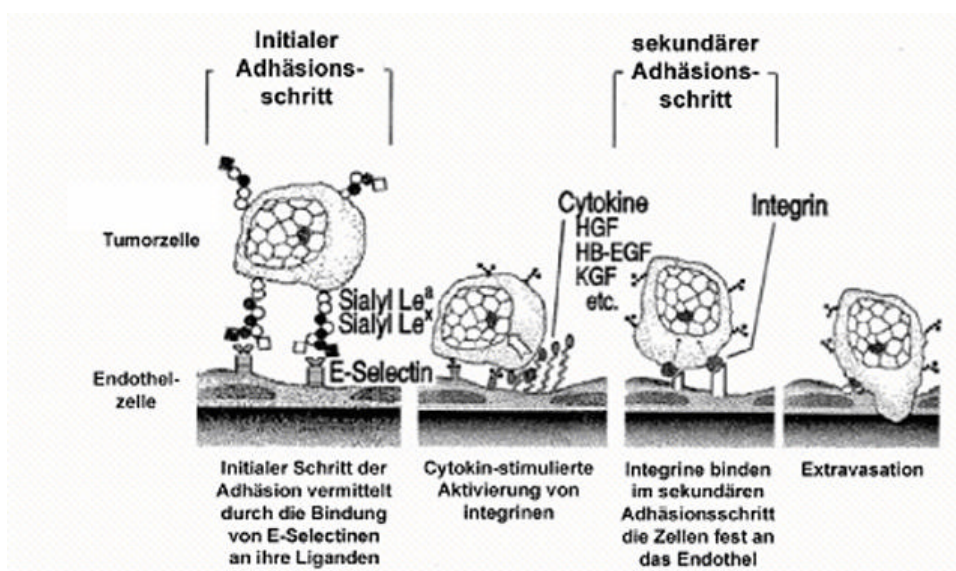


Abb.1.2: Adhäsion einer Tumorzelle an das Endothel einer Gefäßkapillare und Extravasation ins umliegende Gewebe (modifiziert nach [36]). Sialyl Le^A: sialysiertes Lewis^A; Sialyl Le^X: sialysiertes Lewis^X; HGF: Hepatocyte Growth Factor; HB-EGF: Heparin-Binding Epidermal Growth Factor Like Growth Factor; KGF: Keratinocyte Growth Factor

1.1.3.2 Bedeutung von MMPs für die maligne Progression

MMPs sind eine Gruppe degradierender Zinkenzyme, die die Komponenten der EZM abbauen können [37]. Sie spielen eine wichtige Rolle bei allen Prozessen, die Gewebeumbauvorgänge nötig machen, wie z.B. Fertilisation, Embryonalentwicklung oder Wundheilung. Für die Tumordinvasion sowie Proliferation und Metastasierung ist Matrix-"Remodeling" über MMPs ein wichtiger Faktor, da der Abbau umgebener Barrieren (Gefäßwände, Basalmembran, Matrix) die Migration der malignen Zellen erst ermöglicht [38]. Zudem setzen MMPs angiogene und mitogene Faktoren aus der Matrix frei, die Tumorzellen und assoziierte Zellen wie Fibroblasten und Endothelzellen stimulieren [39]. Eine Übersicht über die für diese Arbeit wichtigen MMPs und ihren wichtigsten Substraten gibt die Tab. 1.2. Durch die Vielzahl an Substraten, die von jeder MMP gespalten werden, entsteht ein hochkomplexes Wirkungs- und Regulationssystem, das Aussagen über den Einfluss einzelner MMPs auf die Progression eines Tumors schwierig macht. Diese Komplexität ist wahrscheinlich auch die Ursache für das Scheitern vieler Anti-Krebs-Therapien mit MMP-Inhibitoren [40]. So können zum Beispiel MMP-2 und -9 sowohl Angiogenese fördern wie auch hemmen. MMP-2 legt durch die Spaltung von Kollagen IV eine Bindungsdomäne für $\alpha_5\beta_3$ Integrin frei und stimuliert dadurch die Migration von Endothelzellen und die Entstehung von neuen Gefäßen [41]. MMP-9 aktiviert die Expression des pro-angiogenen Faktors VEGF durch einen noch nicht aufgeklärten Mechanismus [42]. Andererseits spalten sowohl MMP-2 wie auch MMP-9 Plasminogen und

generieren so den Angiogenese-Hemmstoff Angiostatin (s. Tab. 1.2). Die Blockierung von MMP-2 oder MMP-9 kann somit je nach Tumor eine andere Wirkung zeigen.

Tab. 1.2: MMPs und ihre wichtigsten Substrate

Enzym	Substrate
Kollagenase-1 (MMP-1)	Kollagen I, II, III, VII, VIII, X, IGFBP, Aggrekan, MBP, Serpins, Fibronectin, Fibrin, Cascin, a2M, Perlecan, TNF-Precursor, a1P1, proMMP-1,-2, IL1a, IL1β
Gelatinase A (MMP-2)	Kollagen I, IV, V, VII, X; Gelatine, Fibronectin, Tenascin, Fibrillin, Osteonektin, MBP, Decorin, Plasminogen
Stromelysin-1 (MMP-3)	Kollagen IV, V, VII, IX, X, XIV, Elastin, Fibronectin, Fibrillin, Gelatin, Aggrecan, LN-1, Nitogen, Osteonektin, Decorin, MBP, E-Catherin, β –Catin, TNF-Precursor, IGFBP, a1P1
Gelatinase B (MMP-9)	Kollagen IV, V, VII, XI, XIV, XVII, Gelatin, Elastin, Fibrillin, Osteonectin, Fibronectin, MBP, a2M, TNF-Precursor, IGFBP, Plasminogen, TGF-β, a1P1
MT1-MMP (MMP-14)	Kollagen I, II, III, Gelatin, Fibronectin, LN-1, Vitronectin, Aggrecan, Tenascin, Nidogen, Perlecan, Fibrinogen/Fibrin, Fibrillin, a1P1, a2M, LN-5, CD44
MT2-MMP (MMP-15)	Fibronectin, LN-1, Aggrecan, Tenascin, Nidogen, Perlecan

(Modifiziert nach [43] [44] [45]) IGFBP: Insulin-like Growth Factor Binding Protein; MBP: Myelin Basic Protein; LN: Laminin; a2M: a 2-Makroglobulin; a1P1: a 1-Proteinase Inhibitor.

1.1.4 Metastasierung des Mammakarzinoms

1.1.4.1 Mechanismus der organspezifischen Metastasierung

Tierexperimente haben gezeigt, dass von den in die Blutbahn gelangenden Tumorzellen nur < 1% eine Metastase entwickeln [46, 47]. In etwa 90 % aller Karzinome bilden sich Fernmetastasen in denjenigen Kapillarbettungen, in die die Tumorzellen entsprechend der anatomischen Lokalisation des Tumors zuerst gelangen. Schon 1928 beobachtete Ewing beim Mammakarzinom den Befall der nahe gelegenen Lymphknoten und erklärte dieses mit der vaskulären Verbindung zum Primärtumor [48]. Des Weiteren bleiben die Tumorzellen einzeln oder möglicherweise auch als Emboli zusammen mit Lymphozyten und Blutplättchen häufig im Kapillarsystem von Leber und Lunge haften, den ersten „Filterorganen“, die vom großen bzw. kleinen Blutkreislauf versorgt werden.

Primäre Mammakarzinomzellen metastasieren über die Blutbahn bevorzugt zur Lunge, ins Knochenmark und in die Leber, vielfach entwickeln die Patientinnen auch

Metastasen an multiplen Organen [3]. Abb. 1.4 gibt eine Übersicht über die am häufigsten von Brustkebsmetastasen betroffenen Organe.

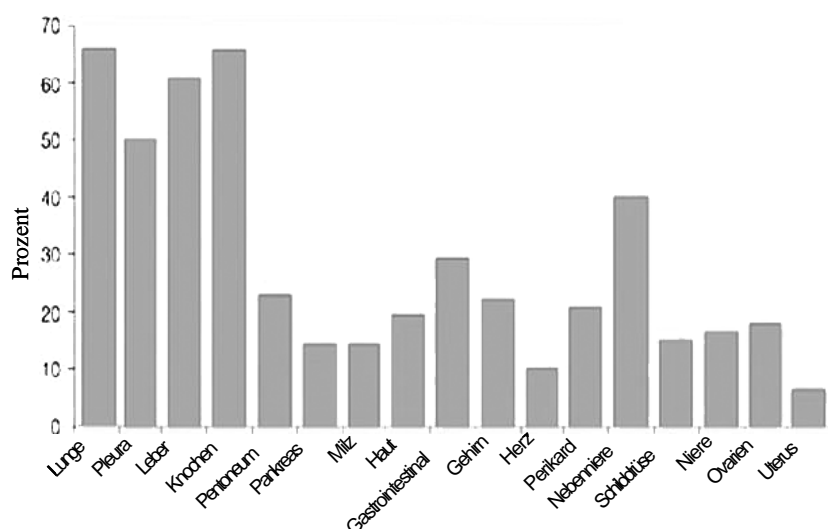


Abb. 1.4: Die am häufigsten von Metastasen betroffenen Organe von Mammakarzinom-Patientinnen zum Zeitpunkt der Autopsie. (modifiziert nach [3])

Mit der hämodynamischen Theorie von Ewing kann die Metastasierung des Mammakarzinoms in Lunge und Leber erklärt werden. Die Spezifität der Tumorzellen, in den eher gering durchbluteten Knochenraum [49] einzuwandern, erklärt diese Theorie nicht und lässt vermuten, dass Tumorzellen noch weitere spezielle Eigenschaften besitzen müssen, um sich erfolgreich in den Knochen einnisten zu können. Die schon 1889 von Paget entwickelte „seed and soil“-Theorie scheint zur Interpretation dieser Vorgänge besser geeignet. Nach dieser Hypothese hängt das Wachstum von Metastasen hauptsächlich von den Wechselwirkungen der Tumorzellen („seed“) mit den jeweiligen Organmilieu („soil“, z.B. Anwesenheit von Wachstums- oder Hemmfaktoren) ab [50]. Nur wenn sich Tumorzellen in einer für ihr Wachstum geeigneten Umgebung befinden, kann es zur Proliferation und damit zur Ausbildung klinisch relevanter Metastasen kommen. Die Knochenmatrix enthält eine Reihe von Wachstumsfaktoren (TGF- β , FGF-1, FGF-2, IGF-1, IGF-2, BMPs, PDGF), die einwandernde Tumorzellen stimulieren können [51]. Dieses Mikroenvironment begünstigt das Festsetzen von dissimilierten Tumorzellen, besonders solcher der Mamma und der Prostata. Die Wachstumsfaktoren sind unter physiologischen Verhältnissen in der Knochenmatrix gebunden und erst nach Tumor-medierten Knochenabbau verfügbar. Tumorzellen anderer epithelialer Primärtumore (z.B. Kolonkarzinome), die über das Blut in das Knochenmark gelangen, dort aber nur selten

Metastasen bilden, werden möglicherweise im Knochenmark nicht stimuliert und bleiben daher klinisch unauffällig. Die Tumorzellen können vom Knochenmark jedoch in andere Organe wie Leber und Lunge wandern, wo bessere Wachstumsbedingungen für sie vorliegen. Das Knochenmark scheint daher ein ideales Indikatororgan für die Anwesenheit von disseminierten Tumorzellen im ganzen Körper zu sein [52].

1.1.4.2 Minimale residuelle Krebserkrankung

Das Mammakarzinom disseminiert nach Schätzungen schon ab einer Größe von weniger als $0,125 \text{ cm}^3$ [53]. Zum Zeitpunkt der Diagnose können somit schon einzelne oder kleine Aggregate von Tumorzellen in Sekundärorganen (z.B. das Knochenmark) eingewandert sein, ohne dass eine solide Metastase durch klinisch radiologische Untersuchungen detektierbar ist. Man spricht in diesen Fällen von minimalen residuellen Krebserkrankungen [54, 55]. Dearnaley gelang 1981 erstmals bei Patientinnen mit nicht-metastasiertem Brustkrebs der Nachweis von einzelnen Zellen mit epithelialen Markern in Knochenmarkbiopsin [56]. Da sich in dem mesenchymalen Organ Knochenmark keine epithelialen Zellen befinden sollten, klassifizierte Dearnaley diese Zellen als Tumorzellen. In einer weiteren Studie konnte eine Korrelation zwischen dem Nachweis von epithelialen Zellen im Knochenmark und dem Auftreten von Metastasen nachgewiesen werden [57]. Viele verschiedene Assays wurden daraufhin zur Detektion von einzelnen disseminierten Tumorzellen in peritumoralen Lymphknoten, Blut und entfernten Organen (z.B. Knochenmark) entwickelt. Für das Mammakarzinom und andere epitheliale Tumore konnte der Nachweis von Zytokeratin-positiven Zellen (CK^+ -Zellen) im Knochenmark als der beste Marker für eine minimale residuelle Krebserkrankung etabliert werden [58-60]. Zytokeratine sind ein integraler Bestandteil des Zytoskelettes epithelialer Zellen. Sie werden bei gesunden Menschen nur äußerst selten von Zellen des Knochenmarks exprimiert. In einer immunhistochemischen Analyse mit fast 200 Knochenmark-Aspiraten von Personen ohne nachweisbare maligne Erkrankung, konnten in nur 1 % der Fälle CK^+ -Zellen nachgewiesen werden [61]. Bei Patientinnen mit Brustkrebs ohne nachweisbare Metastasen liegt der Prozentsatz an Fällen mit CK^+ -Zellen im Knochenmark zwischen 13 % und 42 % [61-63]. Anhand einer Vielzahl von Einzelstudien und einer Meta-Analyse mit 4700 Patientinnen konnte gezeigt werden, dass die Detektion von CK^+ -Zellen beim Mammakarzinom ein unabhängiger Prognosefaktor für ein kürzeres rezidivfreies Intervall und eine kürzere Gesamtüberlebenszeit ist [61, 62, 64-69].

Die Detektion und Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen ist nicht nur als prognostischer Faktor interessant, sie ermöglicht auch ein besseres Verständnis der metastatischen Kaskade und liefert neue Angriffspunkte für die Therapie. Durch die geringe Anzahl der detektierten Zellen (10^{-5} bis 10^{-6}) ist eine genaue Phänotypisierung aufwendig. Pantel und Mitarbeiter reicherten deshalb durch eine spezielle Kultivierung von Knochmark-Aspiraten disseminierte Tumorzellen von Patienten mit unterschiedlichen Tumorentitäten an und generierte mittels SV-40 Transformation stabile Mikrometastasen-Zelllinien [70]. Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass diese Zelllinien sowohl epitheliale Marker wie Zytokeratine und E-Cadherin, aber auch Vimentin, einen bekannten mesenchymalen Marker, exprimieren [71, 72]. Diese Ergebnisse deuten auf ein charakteristisches Phänomen von Karzinomzellen hin, der morphologischen Umwandlung von einer epithelialen Zelle zu einer mesenchymalen Zelle. Der Mechanismus wird auch als epitheliale-mesenchymale Transformation (EMT) beschrieben und ist allgemein mit einem aggressiveren malignen Verhalten von Tumorzellen assoziiert [73]. Die Untersuchung des Tumorsuppressorgens *p53* in den Mikrometastasen-Zelllinien und den jeweiligen Primärtumoren zeigte, dass alle Zelllinien das Wildtyp *p53*-Gen besitzen, auch wenn das Gen in den Tumoren mutierten war. Dieses weist auf eine sehr frühe Disseminierung ins Knochenmark hin. Diese Ergebnisse wurden auch an primären disseminierten Tumorzellen bestätigt [74, 75].

Die häufigste Methode zur Phänotypisierung von primären disseminierten Tumorzellen ist die doppelt-immunocytochemische Färbung. Anti-Zytokeratin Antikörper, die dem Nachweis von disseminierten Tumorzellen dienen, werden für diese Untersuchungen mit Antikörpern gegen verschiedene Tumorantigene kombiniert [76, 77].

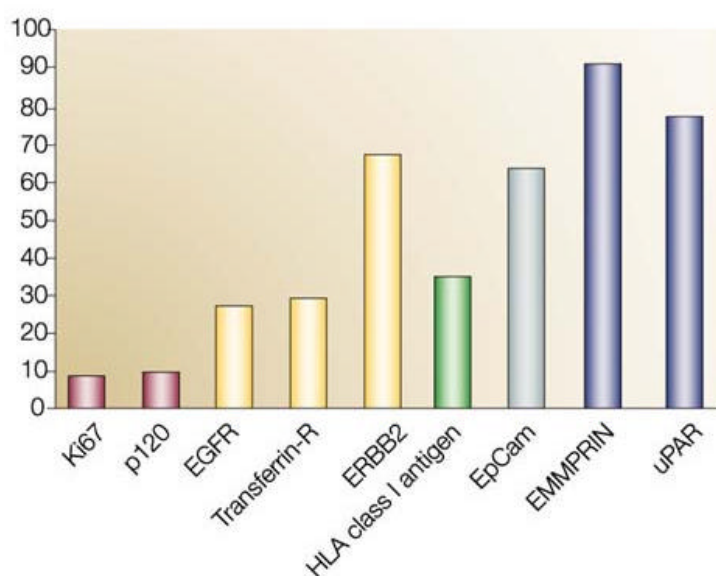


Abb.1.5: Phänotypisierung von disseminierten Tumorzellen. Knochenmarkszellen wurden von Patienten mit Mammakarzinom isoliert. Auf der y-Achse ist der Prozentsatz an CK⁺-Zellen, die das entsprechende Antigen exprimieren, angegeben. Auf der x-Achse sind die untersuchten Tumorantigene aufgelistet. EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor, Transferrin R: Transferrin Receptor, HLA: Human Leukocyte Antigen, EpCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule, uPAR: Urokinase-typ Plasminogen Activator Receptor.

Anhand der Doppelfärbungen konnte die Expression von verschiedenen tumorassoziierten Oberflächenproteinen auf disseminierten Tumorzellen im Knochenmark gezeigt werden (s. Abb. 1.5) [78-84].

Interessant ist die verminderte Expression der Proliferationsmarker Ki67 und p120 in disseminierten Tumorzellen, was auf eine reduzierte Proliferationsrate hinweist [77]. Es ist daher anzunehmen, dass diese Zellen noch nicht autonom proliferieren, sondern sich in einer Art Latenzzustand befinden, der auch als "Dormancy" bezeichnet wird [54]. Des Weiteren zeigen die Zellen eine verminderte MHC-Klasse-I-Molekül (HLA class I antigen) Expression, wodurch sie der Eliminierung von T-Lymphozyten entgehen können [79]. Die hohen Expressionsraten des Proteasen-aktivierenden Proteins EMMPRIN (Extrazellulär Matrix Metalloproteinases Inducer) und des Protease-Rezeptors uPAR (Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor), sind Indikatoren für ein hohes invasives und metastatisches Potenzial der Zellen [83, 84]. Der Nachweis solcher biologisch aussagekräftiger Antigene ließ somit eine erste Interpretation zum funktionellen Status der disseminierten Tumorzellen bezüglich "Dormancy", Proliferation und metastatischem Potential zu.

1.2 EMMPRIN ein multifunktionales Glykoprotein

EMMPRIN wurde parallel in einer Vielzahl von Systemen unabhängig voneinander entdeckt [85]. Als Konsequenz entstanden zahlreiche Namen (Basigin, Neurothelin, OX-47, gp42, CE9, 5A11, M6, HT7) für das gleiche Protein in verschiedenen Spezies und Ursprungsgeweben. Auf der „6. Internationalen Konferenz über menschliche Leukozyten differenzierende Antigene“ wurde EMMPRIN als CD147 klassifiziert [86]. Mehrere Studien konnten zeigen, dass EMMPRIN zur Immunglobulin-Superfamilie gehört, Homologien wurden sowohl zu der variablen Region der Immunglobuline wie auch zu der β -Kette des MHC II-Komplexes beschrieben [87-90].

1.2.1 Entdeckung von EMMPRIN als „Extracellular Matrix Metalloprotease Inducer“

In den 80iger Jahren machte das Labor von Chitra Biswas sich auf die Suche nach einem Faktor, der von Tumorzellen sezerniert wird und verantwortlich ist für die Stimulation der Kollagenase-1-Expression (MMP-1) durch Fibroblasten [91-93]. Durch die Entdeckung,

dass peritumorale Fibroblasten die Hauptquelle der MMP-Expression in Tumoren sind und im Vergleich dazu Tumorzellen selbst nur geringen Mengen MMPs sezernieren, wurden die Studien von Biswas für die tumorbiologische Forschungsgemeinschaft sehr wichtig [94, 95]. Spätere Experimente zeigten, dass der Ursprung des MMP1-stimulierenden Faktors aus B16 Zellen (murine Melanomzellen) und LX-1 Zellen (humane Lungenkarzinomzellen) sowohl als Membranprotein via Zell-Zell-Kontakt als auch als lösliches Protein Fibroblasten zur Produktion von MMP-1 stimuliert. In den Originalarbeiten wurde dieser Faktor als 'tumour collagenase stimulating factor' oder TCSF deklariert. In zahlreichen weiteren Studien konnte nachgewiesen werden, dass TCSF die Expression auch von anderen MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-14, MMP-15) in Fibroblasten und Endothelzellen stimuliert. Zudem wurde entdeckt, dass TCSF nicht nur von malignen Zellen, sondern in einer geringen Konzentration auch von nicht-malignen Zellen exprimiert wird [96].

Nach der vollständigen Charakterisierung von TCSF als 58 kDa transmembranäres Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie durch Biswas und seine Mitarbeiter wurde TCSF unbenannt in EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteases Inducer) [97].

1.2.2 Struktur und funktionelle Interaktionen

EMMPRIN ist ein Glykoprotein mit zwei extrazellulären Immunglobulindomänen, einer Transmembranregion und einer zytoplasmatischen Domäne. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen zwischen Maus- und Ratten-EMMPRIN beträgt 94%, zwischen humanem und murinem EMMPRIN 58 % und zwischen Maus und Huhn liegt sie bei 45 % [89, 98]. Die meisten Unterschiede zwischen den Spezies finden sich in der extrazellulären Domäne, dagegen ist die Transmembranregion hochkonserviert. So ist zum Beispiel die transmembrane Domäne zwischen Mensch, Maus und Huhn 100% konserviert und ~ 80% zwischen diesen Vertebraten und Drosophila [99].

Neuere Ergebnisse zeigen, dass die N-terminale Ig-Domäne notwendig für die Stimulation der Fibroblasten-vermittelten MMP-Expression ist [100, 101]. Auch für das murine EMMPRIN (Basigin) wurde die Stimulation der MMP-Expression beschrieben [102]. Es bleibt aber zu klären, ob EMMPRIN-Homologe aus entfernteren Spezies, mit weit unterschiedlicheren Ektodomänen-Sequenzen auch die MMP-Expression stimulieren können.

Analog zu anderen Mitgliedern der Ig-Superfamilie bildet EMMPRIN in der Plasmamembran Homo-Oligomere. Die Bindungen entstehen wahrscheinlich durch hydrophobe Wechselwirkung der N-terminalen Ig-Domänen, die notwendig und hinreichend für die Oligomerisation ist [103]. Für MMP-Stimulation durch EMMPRIN konnte gezeigt werden, dass EMMPRIN als Selbst-Rezeptor fungiert. Diese homophile Ligand-Rezeptor-Bindung wird ebenfalls durch die N-terminale Ig-Domäne vermittelt [100]. Wird die homophile Interaktion blockiert, zeigt sich eine Inhibierung

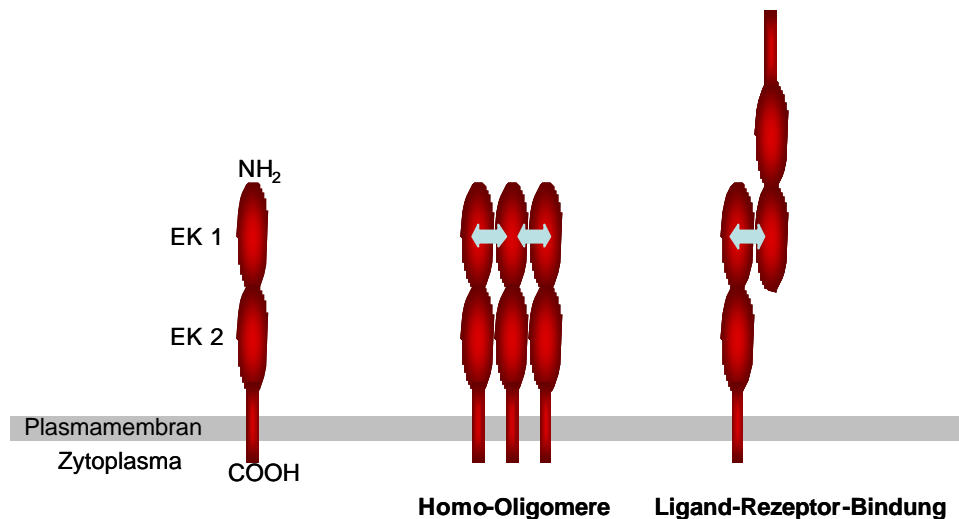


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des EMMPRIN-Proteins. Durch homophile Interaktionen über die N-terminale Ektodomäne können EMMPRIN-Proteine Homo-Oligomere bilden und/oder Ligand-Rezeptor-Bindungen eingehen. EK: Ektodomäne.

der MMP-Stimulierung und der MMP-abhängigen Invasion von Tumorzellen [100]. EMMPRIN interagiert außerdem mit den Integrinen $\alpha_3\beta_1$ und $\alpha_6\beta_1$ [104]. Eine schwach glykosylierte EMMPRIN-Variante ist mit Caveolin in Lipid-Rafts assoziiert [105]. Caveolin ist ein essentielles Strukturprotein in den Caveolea (Omega-förmige Einstülpungen der Zytoplasmamembran) [106]. In verschiedenen Studien wurde ein Einfluss von Caveolin auf die Tumorprogression beschrieben [107]. Für die Interaktion von EMMPRIN und Caveolin ist die zweite Ig-Domäne von EMMPRIN notwendig. Wird Caveolin überexprimiert, kommt es zu einer geringeren Oligomerisation von EMMPRIN in der Zellmembran und einer verminderten Induktion der MMP-1-Expression. Dieser Mechanismus könnte die mögliche Tumorsuppressor-Eigenschaft von Caveolin erklären. Die Assoziation von Caveolin mit EMMPRIN verhindert die Entstehung des hochglykosylierten EMMPRIN-Moleküls und blockiert somit die Aggregation und Aktivität [108]. EMMPRIN stimuliert nicht nur die Produktion von MMPs, sondern bindet diese (z.B. MMP-1) auch aktiv an die Oberfläche von Tumorzellen. Dieser Mechanismus

könnte der schnelleren und gezielten Degradation des zellumgebenen Kollagens dienen [109].

1.2.3 Das EMMPRIN-Gen

Das 7,5 kb EMMPRIN-Gen liegt auf dem Chromosom-Abschnitt 19p13.3 und enthält sieben Exons und sechs Introns [110, 111]. Die 5' untranslatierte Region (UTR) des EMMPRIN Gens enthält keine TATA oder CAAT-Box aber eine CpG-reiche Region, was auf eine Regulation der Transkription durch Methylierung hinweist. Ein 470 bp Fragment 5' gelegen zur kodierenden Sequenz, das drei theoretische Sp1 und zwei theoretische Ap2 Bindungssequenzen beinhaltet, wurde als Promotor-Region identifiziert. Für die Sp1 Bindungsstelle in der Region -142 bis -112 bp konnte ein Einfluss auf die EMMPRIN-Expression nachgewiesen werden [112]. Möglicher Weise wird die EMMPRIN-Expression negativ reguliert durch das im Kern lokalisierte Protein Pinin [113]. Diese Beobachtung ist interessant, da Pinin in vielen Tumorzellen herunterreguliert ist [114].

1.2.4 Weitere Funktionen von EMMPRIN

Aufschluss über eine Reihe von Funktionen lieferten Versuche mit Knockout-Mäusen, die kein EMMPRIN exprimierten. Die experimentellen Möglichkeiten mit der Knockout-Maus sind sehr limitiert, da die Null-Mutanten in den meisten Fällen während der Embryonalentwicklung nicht in die Gebärmutter implantierten und die wenigen lebenden Null-Mutanten steril sind. Des Weiteren zeigen die Mäuse Defizite in der Spermatogenese, Fertilisation, ihren sensorischen Fähigkeiten und der Immunantwort [115, 116].

In einer großen Anzahl von Studien an verschiedenen Geweben und Organsystemen konnte gezeigt werden, dass EMMPRIN ein multifunktionales Molekül ist, das nicht nur die MMP-Expression stimuliert. Zum Beispiel weisen die Null-Mutanten eine gestörte Entwicklung der Retina auf, die auf abnormale Integration von MCT-1 (monocarboxylate transporter-1) in die Plasmamembran basiert. Neuere Studien haben gezeigt, dass EMMPRIN ein essentielles Chaperon für den Transport von MCT-1 und MCT-4 in die Zellmembran ist [117, 118]. EMMPRIN ist außerdem involviert in die Interaktion und Aktivierung von Immunzellen, den Eintritt von Viren in Wirtszellen, die Entwicklung des Nervensystems und die Entwicklung und Erhaltung der Blut-Hirnschranke. Ein einheitlicher Mechanismus für die Rolle von EMMPRIN in diesen

Prozessen wurde nicht aufgeklärt [96]. Obwohl viele dieser Funktionen nicht durch die Induktion von MMPs zu erklären sind, ist die Stimulierung der MMP-Expression wahrscheinlich die Basis für den Einfluss von EMMPRIN auf diverse Krankheitsbilder wie Herzinfarkt [119, 120], Artherosklerose [112, 121], Arthritis [122, 123] und Lungenentzündung [124, 125]. In jedem dieser Fälle wurde eine starke Korrelation zwischen EMMPRIN und der MMP-Expression nachgewiesen.

1.2.5 Bedeutung von EMMPRIN in der malignen Progression

1.2.5.1 Interaktionen zwischen Wirt- und Tumorzellen

Untersuchungen zur Expression der MMPs an primären Tumorproben haben gezeigt, dass MMP-1, MMP-3, MMP-11 und MMP-2 hauptsächlich von Fibroblasten in Brust-, Kolon-, Lungen-, Haut- und Hals-Kopf-Tumoren exprimiert werden [126-129]. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass in den meisten Fällen EMMPRIN primär von den Tumorzellen (z.B. bei Lungen- [129], Brust- [129], Blasen-[130], Ovarial- [131], Hirntumoren [132] und bei Lymphomen [101]) exprimiert wird. Es gibt aber auch Studien, die die EMMPRIN-Expression in Fibroblasten und Endothelzellen nachweisen konnten [131, 133].

Der Rezeptor für EMMPRIN auf Fibroblasten, der verantwortlich für die Stimulation der MMP Expression ist, ist bis jetzt nicht eindeutig identifiziert [134, 135]. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass EMMPRIN sein eigener Rezeptor bei Interaktionen zwischen Tumorzellen ist. Die Bindung von EMMPRIN an EMMPRIN führt zu einer Stimulation der MMP-Expression in Tumorzellen [100]. Man könnte spekulieren, dass dieser Mechanismus auch für die Stimulation der MMP-Sekretion in Fibroblasten durch Tumorzellen anwendbar ist. Diese Hypothese scheint problematisch, da in den meisten Fibroblasten nur eine geringe bis gar keine EMMPRIN-Expression nachweisbar ist [85]. Eine genauere Analyse der Dynamik der EMMPRIN-Expression hat eine positive Feedback-Regulation gezeigt, die eine Erklärung für die Fibroblasten-Tumorzell-Interaktion durch EMMPRIN-EMMPRIN-Bindung sein könnte [136]. Wenn Fibroblasten durch EMMPRIN stimuliert werden, steigt in diesen Zellen die EMMPRIN-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene an. Das neusynthetisierte EMMPRIN wird auf der Zelloberfläche präsentiert und kann als Rezeptor für EMMPRIN-abhängige Signalgebung dienen [136].

1.2.5.2 EMMPRIN und Signaltransduktion

Die hohe EMMPRIN-Expression in Tumorzellen konnte auf eine Dysregulation der EGFR-Signaltransduktion zurückgeführt werden. Amphiregulin, das auf den EGFR-Signalweg wirkt, fördert Tumorprogression durch die Induktion der EMMPRIN-Expression und eine damit verbundene Stimulation der MMP-Expression in den Fibroblasten und Endothelzellen [137]. Die EMMPRIN-vermittelte Signaltransduktion, die zur vermehrten Produktion von MMPs führt, ist noch weitgehend unerforscht. Wahrscheinlich ist MAPK p38 an der Aktivierung der MMP-1-Expression beteiligt [138]. Für den Signalweg zur Stimulation der MMP-2-Expression konnte eine Aktivierung von 5-Lipoxygenase und Phospholipase A2 gezeigt werden [139].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass EMMPRIN das Wachstum von Tumorzellen außerhalb des Gewebeverbands und der EZM fördert [140]. Diese Resistenz gegen Anoikis ist ein typisches Phänomen von Tumorzellen (s. 1.1.3). Untersuchungen zur Stimulation von Überlebens-Signalwegen durch EMMPRIN zeigen, dass EMMPRIN in der Lage ist, die Hyaluronsynthetase HAS 2 zu aktivieren. Eine erhöhte EMMPRIN-Expression führt zur Hyaluronsäure-abhängige Phosphorylierung von Akt, Erk, BAD, FAK und ERBB2 (Abb. 1.7) [140-142]. Das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure ist der

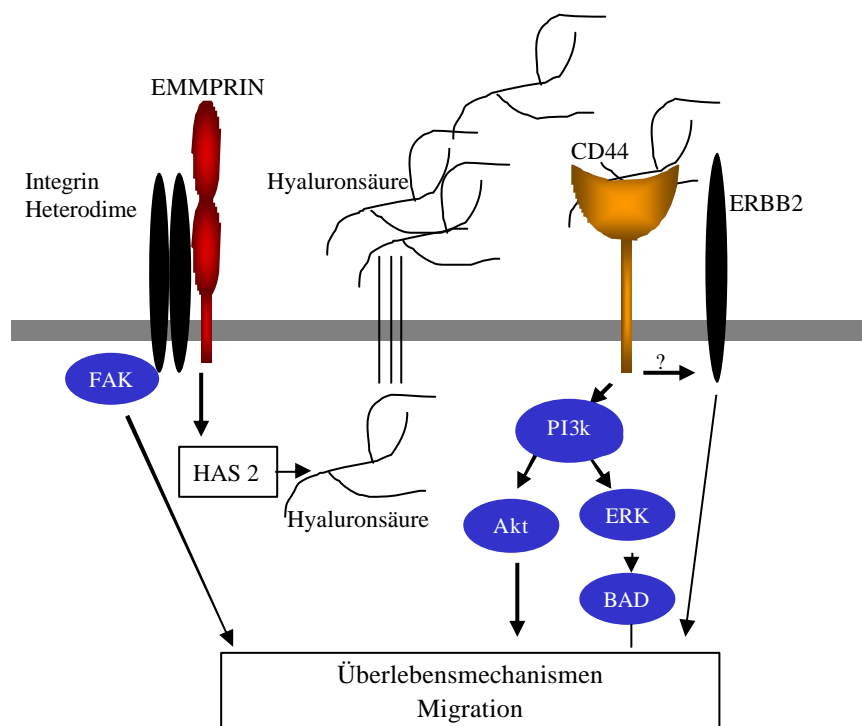


Abb. 1.7: Modell der EMMPRIN-vermittelten Überlebens-Signalwege. Eine gesteigerte EMMPRIN-Expression führt zur Aktivierung der Hyaluron-Synthetase 2 (HAS 2), wodurch es zu einer stärkeren Synthese und Sekretion von Hyaluronsäure (HA) kommt. Die Bindung von HA an CD44 aktiviert den PI3k-Signalweg, es werden Akt, Erk und BAD phosphoryliert. Der HA-CD44-Komplex bewirkt außerdem die Phosphorylierung von ERBB2. Die Phosphorylierung der an aktivierte Integrine gebundene Fokale-Adhäsions-Kinase (FAK) wird vermutlich durch die Bindung von heterodimeren Integriren an EMMPRIN vermittelt.

Hauptbestandteil des Bindegewebes, der den Gewebeturgor reguliert.

Die Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika ("Multidrug Resistenz") stellt ein großes Problem bei der Behandlung von malignen Erkrankungen dar. Deshalb ist die Charakterisierung von resistenten Tumorzellen für die Entwicklung neuer Therapien wichtig. Interessanter Weise zeigen "multidrug"-resistente Tumorzellen eine sehr hohe EMMPRIN-Expression und hohe Level an MMP-1, MMP-2 und MMP-9 Proteinen [143].

Aufgrund der verschiedenen Erkenntnisse über den Einfluss von EMMPRIN auf die Tumorprogression, wurde ein EMMPRIN-bindendes HAb18 F(ab)₂-Antikörper (Metuximab, LICARTIN) entwickelt, das mit Jod¹³¹ markiert ist [144]. Das Peptid wird zurzeit hinsichtlich Sicherheit und Effizienz bei der Behandlung von hepatozellulären Karzinomen (Tumore der Leber) untersucht.

1.3 Fragestellung

Die Tumorprogression stellt einen hochkomplexen Prozess dar, der aus einer Vielzahl von Einzelschritten besteht. Die maligne Zelle benötigt besondere Eigenschaften, die es ihr ermöglichen, alle Schritte der Tumorentwicklung bis hin zur „erfolgreichen“ Metastasierung zu bewältigen. Eine steigende Zahl an Ergebnissen weist darauf hin, dass EMMPRIN, ein multifunktionales Protein auf der Oberfläche von Tumorzellen, Schlüsselereignisse der Metastasierungs-Kaskade beeinflusst und dadurch eine wichtige Rolle bei der Progression von Karzinomen spielen könnte. Ziel dieser Arbeit sollte es sein, die mögliche Funktion von EMMPRIN im humanen Mammakarzinom zu untersuchen.

Erstmals sollte hierfür mit Hilfe der Tissue-Microarray-Technologie die Expression und prognostische Bedeutung von EMMPRIN an über 2000 primären Mammakarzinom-Proben untersucht werden.

Des Weiteren sollten an dem Modellsystem von 14 humanen Mammakarzinomzelllinien mit unterschiedlichem metastatischen Potenzial Untersuchungen zur Expression, Sezernierung und posttranslationaler Modifizierung von EMMPRIN durchgeführt werden.

Für ein besseres Verständnis der Funktion von EMMPRIN im Mammakarzinom war es ferner von Interesse, durch Überexpressions und Knock-down Experimente an Mammakarzinomzelllinien den Einfluss von EMMPRIN hinsichtlich tumorbiologisch-

relevanter Aspekte wie Proliferation, Stimulierung von MMPs und Migration zu untersuchen.

Die Resultate der geplanten Versuchsvorhaben sollten nicht nur zu einem besseren Verständnis der möglichen Rolle von EMMPRIN bei der Tumorprogression beitragen, sondern könnten auch die Grundlage für einen neuen therapeutischen Ansatz bei der Behandlung von Krebspatienten bilden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

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 Puffer und Lösungen

PBS

137	mM	NaCl	
2,7	mM	KCl	
4,3	mM	Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	
1,4	mM	KH ₂ PO ₄	pH 7,3

SDS-Probenpuffer (2×) nicht reduzierend

4 %	(w/v)	SDS	
20 %	(v/v)	Glycerol	
0,01%	(w/v)	Bromphenolblau	
120	mM	Tris-HCl	pH 6,8

SDS-Probenpuffer (2×) reduzierend

4%	(w/v)	SDS	
20%	(v/v)	Glycerol	
0,01%	(w/v)	Bromphenolblau	
200	mM	DTT	
120	mM	Tris-HCl	pH 6,8

TBS

50	mM	Tris-HCl	
2,7	mM	KCl	
138	mM	NaCl	pH 8,0

TE

10	mM	Tris-HCl	
1	mM	EDTA	pH 8,0

Sofern nicht anders angegeben, bedeutet „H₂O“ deionisiertes, sterilfiltriertes Wasser, das über eine Wasseraufbereitungsanlage Model Ultra Clear der Firma SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH (Barsbüttel) gereinigt wurde.

2.1.3 Verwendete Antikörper**Tab. 2.1:** Monoklonale Primärantikörper

Spezies	Antigen	Klonname	Referenz/Hersteller
Maus	EMMPRIN (human)	HIM6	RDI; Flanders, USA
Maus	EMMPRIN (human)	MEM-M6/1	Biogenesis, Kingston, USA
Maus	FLAG	M2	Sigma, München
Maus	HSC70 (human/murin)	B6	Santa Cruz Bio., Heidelberg
Kaninchen	Caveolin (human/murin)	pAb	BD Biosciences, Heidelberg
Maus	MAPK (human/murin)	Taq 100	Oiagen, Hilden
Maus	MMP-1 (human)	Ab-6	Oncogene, San Diego, USA
Maus	MMP-2 (human)	1A10	R&D Systems, Wiesbaden
Maus	MMP-3 (human)	10D6	R&D Systems, Wiesbaden
Maus	MMP-9 (human)	36020.111	R&D Systems, Wiesbaden
Maus	-----	MOPC-21	Sigma, München
Ratte	Lewis X	L5	[145] ¹⁾
Ratte	HNK-1	HNK-1	[146] ¹⁾
Ratte	Oligomannose Strukturen	L3	[147] ¹⁾

¹⁾zur Verfügung gestellt von Dr. R. Kleene, ZMNH, Hamburg

Tab. 2.2: Sekundärantikörper

Spezies	Antigen	Konjugat	Herkunft
Kaninchen	Maus: IgG, IgA, IgM	Peroxidase	DAKO, Glostrup, Dänemark
Ziege	Kaninchen: IgG	Peroxidase	DAKO, Glostrup, Dänemark
Ziege	Ratte: IgM, μ -Kette	Peroxidase	Dianova, Hamburg
n.n. ¹⁾	Maus: nicht reduziertes IgG	Peroxidase	eBioscience, Frankfurt
Kaninchen	Maus: IgG, IgA, IgM	FITC	DAKO, Glostrup, Dänemark

¹⁾ vom Hersteller nicht angegeben

2.1.4 Plasmide

pcDNA3.1(+)(6221 bp)	Invitrogen, Karlsruhe
pBluescript II SK (2961 bp)	Stratagene, La Jolla, USA
pEGFP-C2 (4653 bp)	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pIRES-N1 (5284 bp)	zur Verfügung gestellt von Dr. Hobbs, ICR, London, UK, [148]
pSilencer 3.1-H1 puro (4125 bp)	Ambion, Huntingdon, UK

2.1.5 Geräte

Analysenwaage Satorius BP6100	MS Laborgeräte, Heidelberg
Analysenwaage Satorius CP2245	MS Laborgeräte, Heidelberg
Biofuge pico Heraeus	Kendro, Langselbold
DAKO Färbeautomat	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Dampfsterilisator	H+P, Oberschleißheim
Digitale Bildverarbeitung KAPPA	KAPPA opto-electronics GmbH, Gleichen
Durchlichtmikroskop Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Durchlichtmikroskop mit Fluoreszenzkanal und Kamera	Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar
ELISA-Reader	Dynal Biotech GmbH, Hamburg
FACScan Flow Cytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Filmentwickler Model Hyperprocessor	Amersham Biosciences, Freiburg
Geldokumentations-System GeneGenius 2	Syngene, Cambridge, UK
Gelkammer ComPor L Mini	Bioplastics RV, Landgraaf, Niederlande

Geltrockner 583	Bio-Rad, München
Gießstand Hoefler	Amersham Biosciences, Freiburg
Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg
Hera150-Brutschrank Heraeus	Kendro, Langselbold
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrowelle	Promicro, München
Minigelkammern Hoefler 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
Rollmischer Stuart SRT1	Bibby Sterilin, Staffordshire, UK
Scanner Epson 1680	LaserSoft Imaging AG, Kiel
Schüttler	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Semidry-Blotapparatur	Bio-Rad, München
Thermocycler Flexigene	Techne, Staffordshire, UK
Trockenschrank Heraeus B12	Kendro, Langselbold
Wasserbad GFL-1003	GmbH für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge Heraeus 3S-R	Kendro, Langselbold
Zentrifuge Rotofix 32	Hettich, Villingen-Schwenningen
Zytozentrifuge	Hettich, Villingen-Schwenningen

2.2 Zellkulturmethoden

2.2.1 Herkunft der Zellen

Normale humane dermale Fibroblasten (NHDF-p) wurden von der Firma PromoCell (Heidelberg) bezogen. CHO-K1 Zellen (Ovarialzellen aus *Cricetulus griseus*) stammen aus der Zellkulturbank der Kinderklinik, UKE, Hamburg und COS-7 Zellen (Nierenzelllinie der Grünen Meerkatze) aus der Zellkulturbank des ICRF Laboratory, St Thomas' Hospital, London, UK. Über die Herkunft der verwendeten humanen Zelllinien gibt Tab. 2.1 eine Übersicht.

Tab. 2.3.: Herkunft der verwendeten humanen Zelllinien

Zelllinie	Tumorart	Ursprungsgewebe
BT-20 ⁵⁾	duktales Mammakarzinom	Primärtumor
BT-474 ⁵⁾	duktales Mammakarzinom	Primärtumor
DU4475 ⁵⁾	duktales Mammakarzinom	Haut-Metastase
GI-101 ³⁾	duktales Mammakarzinom	lokales Rezidiv
MCF-7 ²⁾	duktales Mammakarzinom	Pleuraeffusion
MDA-MB-231 ¹⁾	duktales Mammakarzinom	Pleuraeffusion
MDA-MB-435S ²⁾	duktales Mammakarzinom	Pleuraeffusion
MDA-MB-468 ²⁾	Adenokarzinom der Brust	Pleuraeffusion
SK-BR-3 ²⁾	duktales Mammakarzinom	Pleuraeffusion
T-47D ⁵⁾	duktales Mammakarzinom	Pleuraeffusion
ZR-75-1 ²⁾	duktales Mammakarzinom	Aszites
BC-S1 ⁴⁾	duktales Mammakarzinom	mit SV-40 large T Antigen immortalisierte mikrometastatische Zellen aus dem Knochenmark
BC-K1 ⁴⁾	duktales Mammakarzinom	mit SV-40 large T Antigen immortalisierte mikrometastatische Zellen aus dem Knochenmark
MTSV-1.7 ²⁾	-----	mit SV-40 large T Antigen immortalisierte normale Brustepithelzellen
HeLa ²⁾	Cervixkarzinom	Primärtumor

¹⁾erhalten von American Type Culture Collection (ATCC), Manassas

²⁾erhalten aus der Zellkulturbank des ICRF Laboratory, St Thomas' Hospital, London, UK

³⁾erhalten von Dr. J. Hurst, Goodwin Institut for Cancer Research, Plantation, Florida, USA

⁴⁾etabliert von Prof. K. Pantel [70, 71]

⁵⁾erhalten aus der Zellkulturbank des Instituts für Anatomie, UKE, Hamburg

2.2.2 Kulturmedien

Verwendete Vollmedien:

RPMI-Medium:

- 90 % (v/v) RPMI 1640 Medium (Gibco, Eggenstein)
- 10 % (v/v) Fötales Rinderserum (FCS) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- 2 mM Glutamin (Gibco, Eggenstein)

Im RPMI-Medium wurden die Zelllinien DU4475, SK-BR-3, BC-S1 und BC-P1 kultiviert. Für die T-47D und die BT-474 Zellen wurde das Medium zusätzlich mit 10 µg/ml Insulin supplementiert.

DMEM-Medium:

- 90 % (v/v) DMEM (Gibco, Eggenstein)
- 10 % (v/v) FCS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- 2 mM Glutamin (Gibco, Eggenstein)

Im DMEM-Medium wurden die Zelllinien CHO-K1, MTSV-1.7, BT-20, GI-101, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-435S, ZR-75-1 und HeLa kultiviert und die primären Fibroblasten NHDF-p.

Trypsin/EDTA-Lösung

- 0,1 % (w/v) Trypsin (Gibco, Eggenstein)
- 1 mM EDTA (Gibco, Eggenstein)
- in PBS ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} (Gibco, Eggenstein)

2.2.3 Kulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden in sterilen Kulturflaschen oder –schalen der Firmen Falcon (Heidelberg) und Nunc (Wiesbaden) kultiviert. Tab. 2.4 gibt eine Übersicht über die verwendeten Kulturgefäße. Die Kultivierung erfolgte in Hera150-Brutschränken (Kendro) bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ für Zellen in RPMI-Medium bzw. 10 % CO₂ für Zellen in DMEM. Die Zelllinien wurden zweimal wöchentlich unter sterilen Bedingungen passagiert. Hierzu wurden die adhärent wachsenden Zellen mit PBS (ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} , Gibco, Eggenstein) bei 37°C gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturschale abgelöst. Der Vorgang wurde durch Zugabe

von frischem vorgewärmtem Vollmedium abgestoppt und die resuspendierten Zellen dann in einer Dichte von 10-20 % ausgesät.

Tab 2.4: verwendete Zellkulturgefäße

Kulturschalen	Oberfläche pro Well ¹⁾	Mediumvolumen	Hersteller
96-Well-Platte	0,2 cm ²	0,15 ml	Falcon
24-Well-Platte	1,9 cm ²	1 ml	Falcon
6-Well-Platte	9,4 cm ²	2,5 ml	Falcon
10cm-Schale	78 cm ²	15 ml	Falcon
T25-Zellkulturflasche	25 cm ²	5 ml	Nunc
T75-Zellkulturflasche	75 cm ²	15 ml	Nunc

¹⁾ statt des deutschen Begriffes „Vertiefung“ wird in dieser Arbeit das im Zusammenhang mit Laborarbeiten gebräuchlichere englische Wort „Well“ benutzt

2.2.4 Auftauen und Einfrieren eukaryontischer Zellen

Eukaryontische Zellen können durch Einfrieren in flüssigen Stickstoff (-196°C) für lange 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 2×10^6 Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium (10 % (v/v) DMSO, 90 % (v/v) Vollmedium) resuspendiert, in Kryotubes (Nunc, Wiesbaden) überführt und auf -80°C gekühlt. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert. 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 T75-Zellkulturflasche ausgesät.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Kultur von *E. coli*

2.3.1.1 Bakterienstämme

Für die Transformationsexperimente und zur Vermehrung von Plasmiden wurden die *E. coli* Bakterienstämme DH5a und TOP10F' (Invitrogen) verwendet. Eine ausführliche

Beschreibung der relevanten Geno- und Phänotypen dieser Organismen findet sich in Winnacker et al. [149].

2.3.1.2 Vermehrung von *E. coli*

Verwendete Lösungen:

LB-Medium:

1 % (w/v) Bacto-Trypton (BD Biosciences)

0,5 % (w/v) Hefeextrakt (BD Biosciences)

1 % (w/v) NaCl pH 7,5

Ampicillin (Sigma): Stammlösung: 50 mg/ml in H₂O

Endkonzentration: 100 µg/ml

Kanamycin (Roth): Stammlösung: 10 mg/ml

Endkonzentration: 25 µg/ml

Für feste Nährböden wurde dem LB-Medium 1,5 % (w/v) Bacto-Agar zugefügt. Das LB-Medium wurde autoklaviert und die Antibiotika (steril-filtriert) wurden je nach Erfordernissen des Plasmids den Medien nach Abkühlen auf 40-50°C zugesetzt. Antibiotikahaltige Platten wurden bis zu 4 Wochen bei 4°C gelagert.

Zur Vermehrung von *E. coli* wurde eine 5 ml Vorkultur (LB-Medium) mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte beimpft. Die Anzucht der Bakterien erfolgt in einem Inkubationsschüttler bei 37°C und 220 min⁻¹.

2.3.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden 5 ml LB-Medium mit *E. coli* DH5a inokuliert und über Nacht im Inkubationsschüttler bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden mit diesem Ansatz 100 ml LB-Medium für eine erneute Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien wurden bis zu einer OD₅₅₀ 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 MnCl₂; 100 mM KCl; 10 mM CaCl₂; 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 CaCl₂; 10 mM KCl; 15 % (w/v) Glycerol; pH 7) resuspendiert. Die kompetenten Bakterien wurden aliquotiert (à 50 µl) und bei -80°C gelagert.

2.3.3 Vermehrung von Plasmid-DNA in *E. coli*

2.3.3.1 Transformation von *E. coli*

50 µl transformationskompetente Bakterien (s. 2.3.2) wurden auf Eis aufgetaut und sofort 5 min auf Eis gestellt. Die Plasmid-DNA in TE-Puffer wurde zugegeben (< 0,1 µg/50 µl Bakterien) und die Zellsuspension weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 30 sec auf 42°C erwärmt und, nach weiteren 2 min auf Eis, 450 µl LB-Medium (s. 2.3.1.2) zugesetzt. Nach einer Inkubation von 60 min bei 37°C und 220 min⁻¹ im Inkubationsschüttler wurden die transformierten Bakterien in unterschiedlichen Verdünnungen auf Antibiotika enthaltene LB-Agarplatten (je nach Resistenz des Plasmids) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.3.3.2 Plasmid-Präparation im Mini-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 wurden 2 ml der Übernachtsbakterienkultur mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen entsprechend den Herstellerangaben aufgearbeitet. Die in 50 µl TE (pH 8,0) eluierte DNA wurde durch Restriktionsverdau charakterisiert oder bei -20°C gelagert.

2.3.3.3 Plasmid-Präparation im Maxi-Maßstab

100 ml LB-Medium plus Antibiotikum wurden mit 10 µl einer Übernachtskultur beimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde dann mit dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen) durchgeführt. Die gewonnene DNA wurde in 200 µl TE (pH 8,0) aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die Ausbeute betrug im Allgemeinen 300 – 800 µg. Der DNA-Gehalt und die DNA-Reinheit wurden durch Messung der OD₂₆₀ bzw. OD₂₆₀/OD₂₈₀ bestimmt. Hierbei gilt, dass eine OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht. Der Reinheitsgrad der untersuchten Proben lässt sich über die Ermittlung des Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ beurteilen. Es wurden nur solche Plasmidpräparationen verwendet, deren Quotient mindestens 1,8 betrug.

2.3.4 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Reaktionspuffer wurden von der Firma New England BioLabs (Frankfurt am Main) bezogen. Restriktionsspaltungen wurden bei 37°C für 2-6 h durchgeführt. Die DNA-Konzentration im Ansatz sollte 0,5 µg/µl nicht übersteigen. Das Enzym wurde in leichtem Überschuss (3-5 U/µg DNA) eingesetzt, wobei eine Glycerolkonzentration von 5% nicht überschritten werden sollte.

2.3.5 Gelelektrophoretische Analyse von DNA

Verwendete Puffer:

TAE-Puffer:

40 mM	Tris-Acetat
1 mM	EDTA
1 % (v/v)	Essigsäure; pH 8,3

TBE-Puffer:

89 mM	Borsäure
89 mM	Tris-HCl
2 mM	Na ₂ EDTA × 2H ₂ O; pH 8,0

DNA-Probenpuffer:

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 präperative Zwecke erfolgte in horizontalen Elektrophoreseapparaturen. Für analytische Gele wurden TAE-Gele und für präperative Zwecke TBE-Gele verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer bzw. TBE-Puffer (0,8 - 2 % (w/v) Agarose) in der Mikrowelle geschmolzen. Nach Abkühlen auf 40-50°C wurden 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und das Gel in die Gelapparatur gegossen. Nach Entfernen des Kamms und Überschichten des Gels mit dem Laufpuffer (TAE-Puffer oder TBE-Puffer) wurden die Proben mit 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen geladen. Zur Abschätzung der Molekulargröße wurde ein

Molekulargewichts-Marker (Biolone, London) verwendet. Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wurde mit Hilfe eines Transilluminators (Anregungswellenlänge 234 nm) in die DNA eingelagertes Ethidiumbromid zur Fluoreszenz angeregt und die Gele wurden zur Dokumentation fotografiert (Geldokumentations System Gene Genius 2 der Firma Syngene, Cambridge, UK).

2.3.6 Klonierung von cDNA-Fragmenten

2.3.6.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

DNA-Fragmente wurden nach Restriktionsverdau (s.2.3.4) zur Klonierung in Agarosegelen aufgetrennt und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) aus dem Agarosegel 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. Die so gewonnene DNA wurde in 30 µl EB-Puffer (10 mM Tris, pH 8,5) aufgenommen und entweder direkt für die Ligation eingesetzt oder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.3.6.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Eine Behandlung der DNA mit alkalischer Phosphatase verhindert die Eigenligation der Vektor-DNA durch Entfernung der terminalen 5'-Phosphatgruppe. Nach Restriktionsverdau von 2-5 µg Vektor-DNA wurden zu dem 60 µl Reaktionsansatz 1,5 µl Antarctic Phosphatase (5 U/µl; New England BioLabs; Frankfurt am Main) und 6,8 µl 10 x Antarctic Phosphatase-Reaktionspuffer zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert, weitere 1,5 µl Phosphatase zugegeben und die Inkubation weitere 30 min fortgesetzt. Nach Zusatz 1/10 Volumens DNA-Probenpuffer wurde die Vektor-DNA elektrophoretisch in Agarosegelen aufgetrennt (s. 2.3.5) und anschließend aus dem Gel eluiert (s. 2.3.6.1).

2.3.6.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligation von Vektor- und Insert-DNA erfolgte in 10 µl Reaktionsansätzen mit Hilfe der T4-DNA Ligase (New England BioLabs; Frankfurt am Main). Das Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA betrug ungefähr 1:3. Zur Begünstigung der intermolekularen Ligationen wurden hohe DNA-Konzentrationen (100 ng/µl) eingesetzt. Insert- und dephosphorylierte Vektor-DNA in H₂O (maximal 8 µl) wurden mit 1 µl T4-DNA Ligase (400 U/µl) und 1 µl

des entsprechenden 10x konzentrierten Reaktionspuffers (50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM ATP; 10 mM Dithiothreitol; 25 µg/ml BSA; pH 7.5) versetzt. Zur Ligation wurde der Ansatz 16 h bei 16°C inkubiert. Die Vermehrung des Konstruktes erfolgte durch Transformation von Bakterien mit dem Ligationsansatz (s. 2.3.3).

2.3.7 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurde das TRIzol[®] Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Zellen wurden in einer T75-Zellkulturflasche ausgesät und bei einer Konfluenz von 80 % - 90 % geerntet. Das so gewonnene Zell-Pellet wurde durch Zugabe von 2 ml TRIzol[®] Reagenz lysiert. Nach mehrmaligen Auf- und Abpipettieren der Suspension wurde diese auf zwei 1,5-ml-Reaktionsgefäße verteilt, und jeweils gut durchmischt. Nach Inkubation für 2-3 min bei Raumtemperatur erfolgte durch 15-minütige Zentrifugation bei 12000 x g eine Phasentrennung. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die darin enthaltene RNA durch Zugabe von 1 ml Isopropanol gefällt. Die bei 12000 x g (15 min, 4°C) sedimentierte RNA wurde zwei Mal mit je 1 ml 75 % Ethanol gewaschen und dann für 5 min getrocknet. Die RNA wurde in einem geeigneten Volumen H₂O aufgenommen und bis zur Erststrang-cDNA-Synthese bei -80°C gelagert.

2.3.8 Erststrang-cDNA-Synthese

Die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgte mit dem "SuperScript First-Strand Synthesis" System der Firma Invitrogen. Als Primer wurden Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer verwendet, welche mit den poly(A)-Schwänzen der mRNA-Moleküle hybridisieren können. 3-5 µg Gesamt-RNA wurden mit 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µl) in 8 µl H₂O 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 MgCl₂-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.

2.3.9 Isolierung von genomischer DNA aus Zellkulturen

Zur Isolierung von genomischer DNA aus Zellkulturen wurde das "DNeasy Tissue Kit" der Firma Qiagen verwendet. Die Zellen wurden in 6-Well-Kulturplatten ausgesät und bei einer Konfluenz von 80 % - 90 % geerntet. Die so gewonnenen Zell-Pellets wurden entsprechend der Herstellerangaben aufgearbeitet. Die Ausbeuten lagen etwa bei 40 µg Plasmid-DNA.

2.3.10 DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Je nach Fragestellung wurden zwei unterschiedliche Taq-DNA-Polymerasen und damit auch unterschiedliche Reaktionsbedingungen zur Amplifikation von DNA gewählt. Sollten beispielsweise synthetisierte cDNA-Fragmente in Vektoren inkloniert werden, wurde die Amplifikation mit PfuTurbo[®] Hotstart DNA Polymerase (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt, die aufgrund ihrer so genannten „proofreading“-Aktivität eine deutlich verringerte Fehlerrate aufweist. Da dieses Enzym im Allgemeinen recht empfindlich auf Verunreinigungen reagiert, wurde für analytische Zwecke vorzugsweise die Taq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden) verwendet.

Amplifikation mit PfuTurbo[®] Hotstart DNA Polymerase (Stratagene)

Die 50 µl-Reaktionsansätze wurden auf Eis zusammen pipettiert und enthielten neben 5 µl cDNA (s. 2.3.2), 5 µl 10 x PfuTurbo-Reaktionspuffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,8); 20 mM MgSO₄; 100 mM KCl; 100 mM (NH₄)₂SO₄; 10 % (v/v) Triton X-100; 1 mg/ml BSA), 5 µl dNTPs (2 mM, Roche Diagnostics), je 2 µl Primer (100 ng/µl), 2,5 µl DMSO und 1 µl PfuTurbo[®] Hotstart DNA-Polymerase (2,5 U/µl). Die Reaktion wurde in einem Thermocycler (Flexigene; Techne, Staffordshire, UK) 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:	3 min	72°C

Die Temperatur für das Primer-Annealing wurde in Abhängigkeit vom Primerpaar zwischen 58°C-65°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.

Amplifikation mit Taq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden)

Die 50 µl-Reaktionsansätze enthielten neben 3 µl cDNA (s. 2.3.2), 3-6 ng Plasmid-DNA oder 100 ng genomischer DNA, 5 µl 10 x Qiagen PCR Reaktionspuffer (Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht angegeben), 2,5 µl dNTPs (2 mM, Roche Diagnostics), je 1 µl Primer (100 ng/µl) und 0,5 µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl). Die Extensionszeit des Amplifikationsprogramms orientierte sich an der Größe des Amplifikationsproduktes (1 min / 1 kb). Üblicherweise enthielt das Amplifikationsprogramm 30 Wiederholungen, nur bei der Verwendung von genomischer DNA wurden 35 PCR-Zyklen durchgeführt.

Verwendete Oligonukleotide

Die in Tab. 2.5 aufgeführten Oligonukleotide wurden für PCR-Reaktionen eingesetzt. Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG im 0,01mmol-Maßstab synthetisiert und hatten den Reinheitsgrad HPSF (High Purity Salt Free). In den Sequenzen enthaltene Restriktionsschnittstellen sind grau dargestellt.

Tab. 2.5: Zur PCR verwendete Primer

Name	Ziel-Sequenz	Art ¹⁾	Sequenz
E1	EMMPRIN	s	gcgcccgggaattc gaggaataggaatcatggcggctgc
E2		a	gcgcccgggaattcagggagcgtcctcgggccacctgc
E3		a	cctcagagtcagtgatcttaccagg
E4		s	cctcatgaacggctccgagagc
E5		a	gcgccggaattcttacttgcgtcatcgtctttagtcggaagagttc ctctggcggacgttcttgc
E6		s	gcatcgtggctgtggtgctggtgctgg
E7		a	ccagcaccagcaccacagccacgatgc
E8		a	cgtagatgaagatgatggtgaccagcaccaccca
E9		a	ggaatcttgcaagcactgggagtgg
E10		s	gtccgtgccacctgtcactgactgg
E13		s	gcgcccgggaattcacaatgaagcagtcggacgcgtctcc
E17		a	caatgtgtagctctgacc
pIRES-1	pIRES-N1	s	gtccactcccagttcaattacagc

Fortsetzung Tab. 2.5: Zur PCR verwendete Primer

Name	Ziel-Sequenz	Art ¹⁾	Sequenz
pIRES-2	pIRES-N1	a	cttcagaggaactgcttccttcacg
pIRES-3		s	gcgaagtgccggggcaggatctcc
pSilencer1	pSilencer	s	gtttcccagtcacgacg
pSilencer2		a	gagttagctcactcattagc
pSilencer3		a	ggtgtctcttgaacacc

¹⁾s: *sense* Primer; a:*antisense* Primer

2.3.12 Automatische DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde nach der Didesoxy-Methode [150] mit dem BigDye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystem (Darmstadt) durchgeführt. Der vom Hersteller gelieferte BigDye-Mix enthält: „FF“-Taq-Polymerase, Taq-Reaktionspuffer, dNTPs und die vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxy-NTPs.

Für den 20 µl-Sequenzieransatz wurden 1 µg DNA in maximal 11 µl H₂O, 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 µl H₂O versetzt und die DNA durch Zugabe von 64 µl 100 %igem Ethanol 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert (13000 rpm, 30 min, 4°C) und das Pellet mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Danach wurde die DNA für 5-10 min bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Auftrennung der DNA auf einem Polyacrylamid-Gel und die weitere Detektion und Analyse der Sequenzierung erfolgte am Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie (UKE, Hamburg) mit dem Applied Biosystem DNA-Sequencer ABI PRISM (Modell 3100).

2.3.11 Zielgerichtete Mutagenese

Die Methode der zielgerichteten Mutagenese ermöglicht es, Mutationen in ungeschnittene Vektoren einzufügen. Hierbei wird das gesamte Plasmid mittels PCR mit zwei komplementären Primern amplifiziert. Die Primer tragen die gewünschte Mutation, so dass jedes Amplifikat der PCR auch mutiert ist. Die Abtrennung der unmutierten Template-DNA erfolgt durch Inkubation mit dem Restriktionsenzym Dpn I. Dieses Enzym spaltet ausschließlich die in den Bakterien methylierte Template-DNA. Die so gewonnenen Plasmide sind ungeschlossen, sie werden nach der Transformation durch bakterielle Ligase ligiert.

Für die Mutagenese enthielten die 50 µl-Reaktionsansätze neben 20 ng Template-DNA, 5 µl 10 x Reaktionspuffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,8); 20 mM MgSO₄; 100 mM KCl; 100 mM (NH₄)₂SO₄; 10 % (v/v) Triton X-100; 1 mg/ml BSA), 5 µl dNTPs (2 mM, Roche Diagnostics), je 1,25 µl Primer (100 ng/µl) und 1 µl PfuTurbo[®] Hotstart DNA Polymerase (Stratagene; 2,5 U/µl).

Nach einer initialen Denaturierung für 30 sec bei 95°C schloss sich das folgende Amplifikationsprogramm an:

Denaturierung:	30 sec	95°C
Primer-Annealing:	1 min	55°C
Primer-Extension:	1 min/kb	68°C

Nach 12 Wiederholungen des Amplifikationsprogramms, wurde der Reaktionsansatz für 2 min auf Eis inkubiert. Der Verdau der Template-DNA erfolgte durch Zugabe von 1 µl DpnI und Inkubation für 1 h bei 37°C. Zur Vermehrung der so gewonnenen Plasmid-DNA wurde 1 µl des Reaktionsansatzes zur Transformation des Bakterienstammes TOP10F eingesetzt.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Transfektion von Zellen

Für die Transfektionen wurden je nach Zelllinie unterschiedliche Transfektions-Reagenzien verwendet. Für die Transfektionen mit Plasmid-DNA wurden die Reagenzien Lipofectamine[™] 2000 (Invitrogen) und FuGENE 6 (Roche Diagnostics) verwendet. Die

Transfektions-Reagenzien gehören zur Gruppe der kationischen Liposom-Reagenzien, die im Komplex mit DNA an die negativ geladenen Oberflächenstruktur der Zellen binden. Anschließend erfolgt die endosomale Aufnahme der DNA in die Zelle.

Transfektion mittels LipofectamineTM2000

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einer Dichte von 50-60 % in T25-Zellkulturflaschen ausplattiert. Zur Durchführung der Transfektion wurden 8 µg Plasmid-DNA mit 500 µl serumfreiem Medium gemischt. In einem zweiten Ansatz wurden 20 µl LipofectaminTM2000-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 Medium gewechselt. Nach 48 bis 72 h wurden die Zellen schließlich geerntet und die Expression des Ziel-Proteins untersucht.

Transfektion mittels FuGENE 6

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einer Dichte von 30 % in T25-Zellkulturflaschen ausplattiert. Zur Durchführung der Transfektion wurden 7,5 µl FuGENE-Transfektionsreagenz mit 250 µl serumfreiem Medium gemischt. Zu der Lösung wurden 2,5 µg Plasmid-DNA zugesetzt, und die so erhaltene Lösung wurde 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektionskomplexe wurden zu den Zellen gegeben. Nach 48 bis 72 h wurden die Zellen geerntet und die Expression des Ziel-Proteins untersucht.

2.4.2 Herstellung stabiler Zelllinien

Die Zellen wurden wie unter 2.4.1 beschrieben mit Plasmid-DNA transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen abtrypsiniert und in 3-4 10 cm-Kulturschalen ausplattiert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit G418 (Calbiochem, Schwalbach/Ts) oder Puromycin (Sigma-Aldrich) selektioniert (MDA-MB-435S und MDA-MB-468: 500 µg/ml G418; MDA-MB-231: 500 ng/ml Puromycin).

Für die Gewinnung von klonalen stabilen Zelllinien wurden etwa zwei Wochen nach Beginn der Selektion die Zellklone gepickt und weiter expandiert. Die Expression des Zielproteins in den Zelllinien wurde mittels Westernblot untersucht.

Bestimmung der minimalen letalen Antibiotikakonzentration

Vor der Transfektion der Zellen musste die Überlebensfähigkeit der jeweiligen Zellen bei verschiedenen Konzentrationen des Selektionsantibiotikums getestet werden. Bei einer zu niedrigen Konzentration des Antibiotikums nach der Transfektion findet keine Selektion der transfizierten Zellen statt, eine zu hohe Konzentration kann zum kompletten Absterben der transfizierten Zellen führen.

Die Zellen wurden in 6-Well-Kulturschalen im entsprechenden Vollmedium kultiviert, bis der Zellrasen eine Konfluenz von 80 % - 90 % erreicht hatte. In jedes Well wurden 5 ml Medium mit unterschiedlichen Antibiotikakonzentrationen gegeben (G418: 300 µg/ml bis 1000 µg/ml; Puromycin: 300 ng/ml bis 800 ng/ml). Die Zellen wurden weitere 14 Tage kultiviert. Alle drei Tage wurde das Medium gegen frisches Medium mit der entsprechenden Konzentration an Antibiotika ausgetauscht. Für die Herstellung stabiler Zelllinien wurde die niedrigste Antibiotikakonzentration gewählt, bei der nach Ablauf von 14 Tagen alle Zellen im Well gestorben waren.

2.4.3 MTT-Proliferationsassay

Der MTT-Proliferationsassay ist ein quantitativer kolorimetrischer Test, der den Anteil lebender Zellen anhand mitochondrialer Stoffwechselaktivität nachweist. Das den Zellen angebotene MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltriazoliumbromid) (Sigma-Aldrich) wird von Mitochondrien vitaler Zellen in einer NADH-abhängigen Reaktion zu blauem Formazan reduziert. Die blauen Formazankristalle werden in HCl-saurem Isopropanol gelöst und die Farbintensität am ELISA-Reader gemessen. Farbintensität und Vitalität sind einander dabei direkt proportional.

In 96-Well-Platten wurden $6,5 \times 10^3$ Zellen pro Vertiefung in 150 µl Medium ausplattiert. Nach ein bis zehn Tagen Inkubation im Brutschrank wurden je 10 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) in 150 µl Medium pro Well zugegeben und die Zellkulturplatten für weitere 4 h im Brutschrank inkubiert. Durch anschließendes austauschen des Mediums gegen 125 µl HCl-sauren Isopropanol wurden die gebildeten blauen Formazankristalle gelöst. Abschließend erfolgte eine kolorimetrische Messung bei 540 nm im ELISA-Reader.

2.4.4 Stimulierungs-Assays mit dermalen humanen Fibroblasten

Stimulierung von Fibroblasten mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)

2×10^5 NHDF-p (Fibroblasten) wurden pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät und 24 h in DMEM-Vollmedium kultiviert. Das serumhaltige Medium wurde abgenommen und der Zellrasen mit PBS drei Mal gewaschen. Die Zellen wurden daraufhin 24 h mit 100 ng/ml - 200 ng/ml PMA (Sigma) in 1 ml serumfreiem Medium kultiviert, als Kontrolle wurden auch NHDF-p in serumfreiem Medium ohne PMA kultiviert. Nach der Inkubationszeit wurde das gesamte Medium in jedem Well abgenommen und bei $13.000 \times g$, 5 min zentrifugiert, um Zellen und Zellfragmente abzutrennen. Die Pellets wurden verworfen und die Zellkulturüberstände mit 1/3 Volumen 4 x SDS-Probenpuffer (nicht reduzierend) gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Analyse der Expression von MMP-2 und MMP-9 wurden die Proben im Zymogramm untersucht (s.2.6.9).

Co-Kultur von MDA-MB-231 Zellen und NHDF-p

4×10^4 MDA-MB-231 Zellen wurden pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät und in 500 μ l DMEM-Vollmedium kultiviert. Nach 24 h wurden zu jedem Well 4×10^4 NHDF-p in 100 μ l DMEM-Vollmedium gegeben und für zirka 6 h bis zum vollständigen Absetzen der Fibroblasten kultiviert. Als Kontrollen wurden auch NHDF-p ohne MDA-MB-231 Zellen und MDA-MB-231 Zellen ohne NHDF-p kultiviert. Das serumhaltige Medium wurde abgenommen und der Zellrasen mit PBS drei Mal gewaschen. Die Zellen wurden daraufhin in 1 ml serumfreiem Medium kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium gegen 250 μ l frisches Medium ohne FCS ausgetauscht und für weitere 72 h kultiviert. Nach der Inkubationszeit wurde das gesamte Medium in jedem Well abgenommen und wie oben beschrieben für die Analyse im Zymogramm aufgearbeitet.

Kultivierung von NHDF-p mit konditioniertem Medium

8×10^4 MDA-MB-231 Zellen wurden pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät und in 500 μ l DMEM-Vollmedium kultiviert, parallel dazu wurden 4×10^4 NHDF-p pro Well einer 24-Well-Platte in 500 μ l DMEM kultiviert. Nach 24 h wurde das serumhaltige Medium von den Zellen abgenommen, der Zellrasen mit PBS drei Mal gewaschen und die Zellen in 1 ml serumfreiem Medium kultiviert. Nach weiteren 24 h wurde das Medium gegen 250 μ l frisches Medium ohne FCS ausgetauscht und für weitere 48 h kultiviert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium der NHDF-p abgenommen, der Zellrasen mit PBS drei Mal gewaschen und die Zellen in dem konditionierten Medium der MDA-MB-231 Zellen

für 72 h kultiviert. Als Kontrolle wurden auch NHDF-p mit nicht konditioniertem, serumfreiem Medium für 72 h kultiviert. Das gesamte Medium wurde anschließend abgenommen und für die Analyse im Zymogramm aufgearbeitet.

2.4.5 Migrationsassay

Die Migrationsassays wurden in Kooperation mit Dr. Katarina Wolf und Prof. Peter Friedl in der Abteilung für Dermatologie (Universität Würzburg) durchgeführt.

2.4.5.1 Herstellung einer Sphäroid-Zellsuspension

Für die Herstellung von Zellaggregaten, so genannten Sphäroiden, wurden Zellkulturflaschen mit PolyHEMA beschichtet. Durch PolyHEMA wird die Anheftung von adhären-wachsenden Zellen an die Kunststoffoberfläche der Kulturgefäße verhindert und es entstehen Zellaggregate.

0,33% (w/v) PolyHEMA (Sigma) wurden in 70%igem Ethanol gelöst (37°C, ÜN). Pro 10cm-Schale wurden 8 ml der PolyHEMA-Lösung aufgebracht und über drei Tage bei Raumtemperatur getrocknet. Vor dem Gebrauch wurden die beschichteten Schalen mit 10ml PBS gewaschen. 0,8 bis 3×10^6 Zellen wurden pro Schale ausgesät und unter Standardbedingungen für 2 bis 3 Tage kultiviert. Die Sphäroide wurden durch Schräg-Halten der Flasche sedimentiert, der Überstand abgenommen, die Sphäroide in 50 µl physiologischer Kollagen-Lösung aufgenommen, und wie unter 2.4.5.2 beschrieben in die Matrix eingegossen.

2.4.5.2 Herstellung einer 3D Kollagen Matrix

Die Anfertigung einer 3D Kollagen Matrix erfolgte nach etablierter Methode (Friedl et al.). Dazu wurden 100 µl einer pH 7,4 gepufferten Kollagenlösung (1,67 mg/ml Kollagen Typ I in DMEM-Medium) mit 50 µl Sphäroid-Zellsuspension (s. 2.4.5.1) vermischt und in selbst konstruierte Glaskammern gefüllt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C war die 3D Kollagen Matrix auspolymerisiert. Die Kammern wurden mit Medium aufgefüllt und mit Wachs versiegelt.

2.4.5.3 Zeitraffer Videomikroskopie

Um die Migration von Tumorzellen in einer 3D Kollagen Matrix zu untersuchen, wurden die wandernden Zellen bei einer 100fachen Vergrößerung im 4-Minuten-Intervall über 24h bis 48h aufgenommen (Leica-SP2 System).

2.5 RNAi-Technologie

Der Begriff RNAi, d.h. RNA-Interferenz, wurde durch die Entdeckung geprägt, dass Injektionen von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in *C. elegans* zu einer hochspezifischen Ausschaltung von Genen („Gen-Silencing“) führten, deren Sequenz homolog zu der injizierten RNA war [151]. RNA-Interferenz wurde nicht nur in Nematoden, sondern auch in anderen Tieren, darunter Mäusen, entdeckt. Vermutlich existiert dieser Mechanismus auch im Menschen. Das zur Zeit existierende Modell erklärt den Vorgang der RNA-Interferenz mit der Prozessierung von dsRNA zu kleinen 21-23 nt umfassenden RNA-Fragmenten, den sogenannten siRNAs (small interfering RNAs) [152, 153]. Diese siRNAs zerstören durch Anlagerung an die komplementären RNA-Sequenzen mRNA-Transkripte, die sonst translatiert würden. Die Proteinexpression wird damit unterdrückt.

2.5.1 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen mit siRNA

Die Methode der spezifischen Expressionsreduktion mittels siRNAs in Säugerzellen wurde von T. Tuschel und Mitarbeitern entwickelt [152, 153]. Alle in dieser Arbeit verwendeten doppelsträngigen siRNAs (Übersicht s. Tab. 2.6) wurden von der Firma Qiagen synthetisiert. Die Zielsequenzen für die EMMPRIN-spezifischen siRNA wurden mit einem von Qiagen entwickelten Algorithmus ermittelt. Bei der MAPK1 spezifischen siRNA handelt es sich um eine von Qiagen validierte siRNA, die als Kontrolle zur Optimierung der Transfektionsbedingungen eingesetzt wurde. Mit Hilfe der non-Silencing fluoreszenzmarkierten siRNA (s. Tab. 2.6) konnte 1 bis 4 h nach der Transfektion die Transfektionseffizienz am Durchflusszytometer oder am Fluoreszenz-Mikroskop bestimmt werden. Entsprechend der Herstellerangaben wurden alle siRNAs mit dem mitgelieferten Puffer (100 mM Kaliumacetat, 30 mM HEPES-KOH, 2 mM Magnesiumacetat, pH 7,4) als 20 μ M Lösung angesetzt.

Tab. 2.6: Verwendete doppelsträngige siRNAs

Name	Gen	Ziel-Sequenz	sense-Strang antisense-Strang
EMMPRIN-1	humanes	ccg gtc aga gct aca	r(ggucagagc uacacauuga)dttd
	EMMPRIN	cat tga	r(ucaauguguagcucugacc)dgdg
EMMPRIN-2	humanes	ccc acc cac cgc cac	r(caccaccgccacaauaaa)dttd
	EMMPRIN	aat aaa	r(uuuauuguggcggugggug)dgdg
MAPK1	humanes/murines	aat gct gac tcc aaa	r(ugcugacuccaaagcucug)dttd
	MAPK1	gct ctg	r(cagagcuuuggagucagca)dttd
non-Silencing ¹⁾	-----	aat tct ccg aac gtg	r(uucuccgaacgugucacgu)dttd
		tca cgt	r(acgugacacguucggagaa)dttd

¹⁾Fluoreszenzmarkierte siRNA. Fluorescein wurde an das 3'-Ende des sense-Strangs gekoppelt.

Für die Transfektionen wurden verschiedene Reagenzien verwendet (s.u.), es wurde unabhängig vom Transfektionsreagenz 15 h nach der Transfektion das Medium gewechselt. Nach drei bis fünf Tagen wurden die transfizierten Zellen geerntet. Die Expression des Ziel-Proteins wurde mittels Westernblot-Analyse untersucht.

Transfektion mittels LipofectamineTM2000 (Invitrogen)

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einer Dichte von 20-30 % in 6-Well-Zellkulturschalen ausplattiert. Zur Durchführung der Transfektion wurden 200-360 pmol siRNA mit 250 µl serumfreiem Medium gemischt. In einem zweiten Ansatz wurden 5 µl - 10 µl LipofectamineTM2000-Transfektionsreagenz mit 60 µl serumfreiem Medium gemischt. Die Ansätze wurden 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann vereinigt. Die so erhaltene Lösung wurde 25 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann den Zellen zugesetzt.

Transfektion mittels OligofectamineTM (Invitrogen)

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einer Dichte von 20-30 % in 6-Well-Zellkulturschalen ausplattiert. Zur Durchführung der Transfektion wurden 300 pmol siRNA mit 160 µl serumfreiem Medium gemischt. In einem zweiten Ansatz wurden 15 µl OligofectamineTM-Transfektionsreagenz mit 60 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 dann den Zellen zugesetzt.

Transfektion mittels RNAiFectTM (Qiagen)

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einer Dichte von 20-30 % in 6-Well-Zellkulturschalen ausplattiert. Zur Durchführung der Transfektion wurden 200-400 pmol

siRNA mit 80 µl serumfreiem Medium und 15-30 µl RNAiFectTM-Reagenz gemischt. Der Ansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann den Zellen zugesetzt.

2.5.2 Quantifizierung der zellulären Aufnahme Fluorescein-markierter siRNA

Auswertung mittels durchflusszytometrischer Analysen

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz bei siRNA transfizierten Zellen wurde die Aufnahme der Fluorescein-markierten siRNA in die Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Die Zellen wurden, wie unter 2.5.1. beschrieben mit Fluorescein-markierter siRNA transfiziert, als Negativ-Kontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen 4 h nach der Transfektion trypsiniert, in Medium aufgenommen und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zirka $1-5 \times 10^5$ Zellen wurden durch Zentrifugation (200 x g, 5 min) sedimentiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 5 ml FACS-Puffer (PBS mit 5 % (v/v) FCS, 0,1 % (w/v) NaN₃) auf Eis resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 500 µl PBS aufgenommen und in FACS-Röhrchen durch Sefar Nitex Nylongewebe (Sefar AG; Rüschnikon; CH) filtriert. Anschließend wurden 2,5 µl 7-Amino-Aktinomycin-Lösung (1 mg/ml 7-AAD in H₂O; Sigma) zugegeben. Nur die Membran nicht vitaler Zellen ist für diesen DNA-Farbstoff durchlässig, so dass eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen möglich ist. Nach 20-minütiger Inkubation erfolgte die Messung am Durchflusszytometer (BD FACScan) mit Hilfe der Software CellQuest Pro.

Auswertung am Fluoreszenzmikroskop

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz am Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen für die Transfektionen auf Chamber Slides (Typ: Sonic Seal Slide Wells, Nunc) ausgesät. Die Größe der Wells entspricht dem 24-Well-Format, entsprechend wurden die Transfektionsprotokolle angepasst und 1/5 der unter 2.4.1 angegebenen Volumina und Mengen verwendet.

Die transfizierten Zellen wurden 1 bis 4 h nach der Transfektion in den Kulturschalen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend wurde der obere Teil des Kulturgefäßes abgebrochen und die Präparate mit Mowiol Mounting Medium (s. 2.8.2) eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte am Durchlichtmikroskop mit Fluoreszenzkanal

(Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar) mit dem Bilddokumentationsprogramm Applied Imaging (Newcastle).

2.5.3 Herstellung von siRNA-Expressionsvektoren

Zur Herstellung der siRNA-Expressionsvektoren nach Brummelkamp [154] wurde der Vektor pSilencer 3.1-H1 puro (Ambion, Huntingon, UK) verwendet. Die im pSilencer-Vektor enthaltene siRNA-Expressionskassette (s. Abb. 2.1) besteht aus einem H1-Polymerase III Promotor, gefolgt von der genspezifischen siRNA-Sequenz, diese kann über die Restriktionsschnittstellen BamH I und Hind III in den Vektor eingesetzt werden. Die genspezifische siRNA-Sequenz besteht aus einer 19 Nukleotide-langen Sequenz (*sense* Strang), die homolog zur Zielsequenz ist und von einem 9 Nukleotide-langen Zwischenstück (Linker) vom reversen Komplementen derselben Sequenz (*antisense* Strang) getrennt wird. Das Terminationssignal besteht aus fünf aufeinander folgenden Thymidin-Nukleotiden. Das entstehende Transkript faltet sich auf sich selbst zurück, dadurch bildet sich eine kurze Haarnadelstruktur-RNA (short hairpin RNA = shRNA), die durch das DICER-Enzym zur funktionstüchtigen siRNA prozessiert wird.

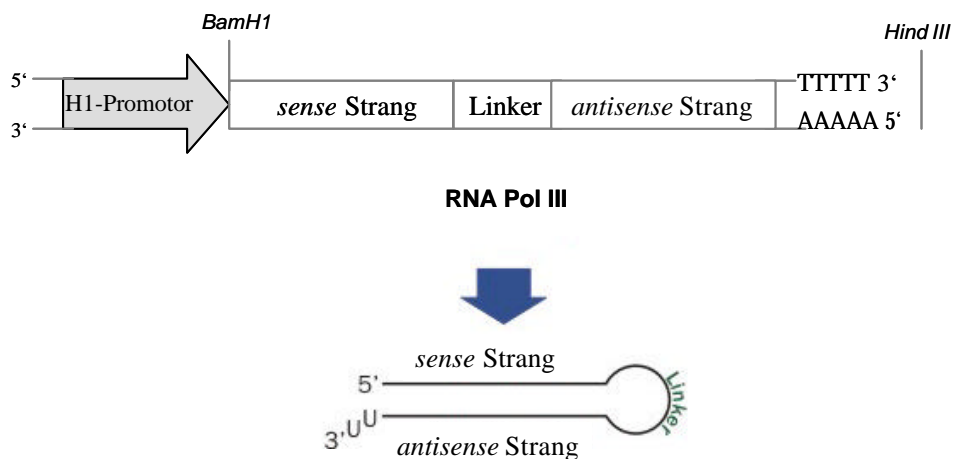


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau der siRNA-Expressionskassette im Vektor pSilencer 3.1-H1 und die Entstehung der Haarnadelstruktur-RNA.

Als Selektionsmarker für eukaryontische Zellen enthält der Vektor das Gen für die Puromycinresistenz.

2.5.3.1 Herstellung der doppelsträngigen Oligonukleotide zur Klonierung in den Vektor pSilencer 3.1-H1 puro

Die Herstellung der EMMPRIN-spezifischen Sequenzabschnitte erfolgte durch die Hybridisierung zweier 64 Bp langer Oligonukleotide. Die Auswahl der hierfür geeigneten EMMPRIN spezifischen siRNA-Sequenz ergab sich aus den Ergebnissen der transienten Transfektionen mit den beiden siRNAs EMMPRIN-1 und EMMPRIN-2. Da sich die siRNA EMMPRIN-1 effizienter in der Expressionsreduktion erwies als EMMPRIN-2, wurde die Ziel-Sequenz der siRNA EMMPRIN-1 als genspezifische siRNA-Sequenz für die Herstellung des Vektors verwendet.

Verwendete Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen im 200 nmol Synthesemaßstab synthetisiert und mittels Polyacrylamid Gel Elektrophorese (PAGE) aufgereinigt. Die EMMPRIN-spezifische Sequenz ist in den Oligonukleotiden unterstrichen, die Linker-Sequenz ist grau dargestellt.

sense-Primer (Name: E15): gat ccg gtc aga gct aca cat tga ttc aag aga tca atg tgt
agc tct gac cgg ttt ttt gga aa

antisense-Primer (Name: E16): agc ttt tcc aaa aaa ccg gtc aga gct aca cat tga tct ctt
gaa tca atg tgt agc tct gac cg

Zur Hybridisierung der siRNA Oligonukleotide wurden jeweils 2 µl des *sense*- und des *antisense*-Primers (1 µg/µl) zu 46 µl 1 x DNA Annealing Solution (Ambion, Huntingon, UK) gegeben. Der Ansatz wurde 3 min bei 90°C inkubiert, auf 37°C gekühlt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die bei der Hybridisierung entstehenden Überhänge dienen der Ligation in den mit BamH I und Hind III linearisierten Vektor pSilencer 3.1-H1 puro (Ambion, Huntingon, UK).

2.5.3.2 Klonierung des siRNA Inserts in den pSilencer 3.1-H1 puro Vektor

Für die Ligation wurden 1 µl des mit den Restriktionsenzymen BamH I und Hind III linearisierten Plasmids pSilencer 3.1-H1 puro (Ambion, Huntingon, UK) und 8 ng siRNA Insert (s. 2.5.3.1) eingesetzt. Die Ligation und die Vermehrung des Plasmids wurden wie unter 2.3.6 beschrieben durchgeführt. Das so hergestellte Plasmid wurde zur stabilen Transfektion von Zelllinien verwendet.

2.6 Proteinchemische Methoden

2.6.1 Herstellung von Ganzzellextrakten

Verwendete Lysispuffer:

NP-40 Lysispuffer:

1 % (w/v) Nonidet P-40 (Roche Diagnostics)
150 mM NaCl
50 mM Tris-HCl pH 7,4

Triton X-100 Lysispuffer:

1 % (w/v) Triton X-100 (Sigma)
300 mM NaCl
5 mM EDTA
50 mM Tris-HCl pH 7,4

Nach zweimaligem Waschen des Zellrasens mit PBS wurden die Zellen mittels eines Zellschabers vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst, in 1 ml PBS aufgenommen und abzentrifugiert (3000 rpm, 3 min). Das Zellpellet wurde in einem angemessenen Volumen Lysispuffer (1 ml pro konfluent-gewachsener T75-Zellkulturflasche) resuspendiert und in Anwesenheit von 1 x Proteinaseinhibitor (100 x Protease Inhibitor Cocktail Set I, Calbiochem) für 30 min bei 4°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 12000 x g für 10 min bei 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde abgehoben und der Proteingehalt bestimmt (s. 2.6.2). Ein gleiches Volumen 2 x SDS-Probenpuffer (s. 2.1.2) wurde zugegeben und die Proben für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Lysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.6.2 Proteinbestimmung (nach Bradford, [155])

Zur Proteinbestimmung wurde ein kommerziell erhältliches Farbreagenz (Bradford-Reagenz, BioRad, München) benutzt. Die zu messende Probe wurde mit 0,1 N NaOH zu einem Endvolumen von 800 µl aufgefüllt, mit 200 µl Farbreagenz versetzt, gut durchmischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Leerwert diente ein Ansatz, der nur 800 µl 0,1 N NaOH enthielt. Für die Eichkurve wurde eine BSA-Stammlösung (1 mg/ml in 0,1 N NaOH) verwendet. Entsprechende Volumina der Stammlösung wurden mit 0,1 N NaOH auf 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Farbreagenz

versetzt. Die Proben der Eichkurve enthielten zwischen 1 und 32 µg Protein. Die Auswertung erfolgte durch Messung der Extinktion bei 595 nm gegen den Leerwert im Photometer. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.6.3 Proteinfällung nach Wessel und Flügge

Um verdünnte Proteinlösungen zu konzentrieren und dadurch das Auftragsprobenvolumen für die Gelelektrophorese zu verringern, wurde eine Proteinfällung nach Wessel und Flügge durchgeführt [156]. Dazu wurden 100 µl einer wässrigen Proteinlösung mit dem vierfachen Volumen Methanol gemischt. Nach Zentrifugation für 10 sec bei 12000 x g wurden 100 µl Chloroform zugegeben und gut gemischt. Nach nochmaligem Zentrifugieren (10 sec, 12000 x g, Raumtemperatur) wurden 300 µl H₂O hinzugefügt. Ein weiterer 1-minütiger Zentrifugationsschritt (12000 x g) bei Raumtemperatur präzipitierte die Proteine, die sich in der Interphase zwischen der unteren organischen und der oberen wässrigen Phase sammelten. DNA und RNA wurden nicht mitgefällt. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, ohne die proteinhaltige Interphase zu berühren. Der Rest der organischen Phase wurde mit 300 µl Methanol ausgeschüttelt und nochmals für 2 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Proteinphase sammelte sich als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes und konnte nach Absaugen der organischen Phase unter dem Abzug getrocknet werden. Getrocknete Proteinpellets wurden in 10 - 30 µl 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bis zur Analyse im Westernblot bei -20°C aufbewahrt.

2.6.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Verwendete Puffer und Lösungen:

Sammelgelpuffer:

1 M Tris-HCl pH 6,8

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

Ammoniumpersulfat-Lösung:

10 % (w/v) Ammoniumpersulfat

Elektrodenpuffer (Laemmli buffer):

192 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS
25 mM	Tris-HCl

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte mittels der denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) [157]. Hierzu wurden die zu untersuchenden Proteinproben in 1 x SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C erhitzt, um die Proteine vollständig zu denaturieren und sie mit SDS auf eine der Größe proportionale Ladung zu bringen. Für die Gelelektrophorese wurden Minigelkammern Model SE250 der Firma Hoefer (Vertrieb: Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Die Laufstrecke im Sammelgel betrug 0,5 cm, im Trenngel 6 cm. In die Probenaschen konnten maximal 20 µl Probe gefüllt werden. Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine wurden als Trenngel 7,5%ige bis 12%ige Polyacrylamidgele verwendet. Das Trenngel wurde wie beschrieben, je nach Prozentigkeit mit den entsprechenden Mengen H₂O, Acrylamidmix (National Diagnostic, USA), Trenngelpuffer, 10 % SDS-Lösung, 10 % Ammoniumpersulfat-Lösung, und TEMED (Sigma), angesetzt, zwischen die in den Gießstand (Hoefer Dual Gel Caster, Amersham Biosciences, Freiburg) eingespannten Glasplatten gegossen und mit H₂O überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser entfernt, ein Probenaschenkamm in die Gelkammer eingesetzt und das Sammelgel (1,4 ml H₂O; 0,33ml Acrylamidmix; 0,5 ml Sammelgelpuffer; 20 µl 10% SDS-Lösung, 20 µl Ammoniumpersulfat-Lösung, 2 µl TEMED) gegossen. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, die Gelapparatur zusammengesetzt und die Pufferreservoirs mit Elektrodenpuffer gefüllt. Anschließend wurden maximal 50 µg Protein pro Spur geladen. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde der Molekulargewichtsstandard "Full Range Rainbow RPN800" (Amersham Biosciences, Freiburg) parallel aufgetragen. Die Proteine wurden bei 25 mA/Gel für ca. 1-2 h aufgetrennt, bis die blaue Lauffront das Gelende erreicht hatte. Der Nachweis der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte entweder mittels Silberfärbung (s. 2.6.5) oder durch eine Westernblot-Analyse (s. 2.6.6-2.6.7).

2.6.5 Silberfärbung der Gele

Verwendete Lösungen:

Fixierlösung:

40 % (v/v) Ethanol

10 % (v/v) Eisessig

Sensibilisierungslösung:

30 % (v/v) Ethanol

0,01 % (w/v) Natriumthiosulfat

0,8 M Natriumacetat

Silbernitratlösung:

0,25 % (w/v) Silbernitrat

0,015 % (w/v) Formaldehyd

Entwicklungslösung:

0,24 M Natriumcarbonat

0,007 % (w/v) Formaldehyd

Stopplösung:

40 mM EDTA in H₂O

Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele in eine mit 125 ml Fixierlösung befüllte Färbewanne gelegt. Das Gel wurde für 30 min in der Fixierlösung inkubiert. Danach wurde diese abgossen und durch 125 ml Sensibilisierungslösung ersetzt. Das Gel wurde für 30 min darin inkubiert. Danach wurde die Sensibilisierungslösung abgossen und das Gel dreimal 5 min mit H₂O gewaschen. Es folgte die Zugabe der Silbernitratlösung, in der das Gel 20 min lang inkubiert wurde. Das Gel wurde zweimal für 1 min mit H₂O gewaschen und anschließend solange in der Entwicklerlösung entwickelt bis das Gel eine optimale Färbung aufwies. Zum Stoppen der Entwicklungsreaktion wurde die Entwicklerlösung abgossen und durch 125 ml Stopplösung ersetzt. Nach 10 min wurde die Stopplösung durch H₂O ersetzt. Die Gele wurden durch Scannen oder Trocknen (2 h, 80°C im Geltrockner) konserviert.

2.6.6 Westernblot

Mit Hilfe der Westernblot-Analyse können gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels einer Semidry-Blotapparatur (Model: Trans-Blot SD semi-dry transfer cell) der Firma Bio-Rad auf Hybond ECl Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen (Amersham Biosciences; Millipore, Schwalbach) transferiert [158] [159]. Die PVDF-Membranen haben im Vergleich zu Nitrocellulose-Membranen eine größere Bindungskapazität für Proteine, müssen allerdings vor dem Transfer aktiviert werden. PVDF-Membranen wurden nur verwendet, wenn das zu untersuchende Protein in sehr geringer Konzentration im Gesamt-Lysat vorlag. Für den Transfer wurden eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran und vier 3MM-Whatmann-Filter (VWR, Darmstadt) auf Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer (48 mM Tris-HCl; 39 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; 0,038 % (v/v) SDS) eingeweicht. Die PVDF-Membranen wurden zuvor durch Inkubation für 20 s in Methanol aktiviert. Auf der Anodenseite der Blotapparatur wurde folgender Aufbau vorgenommen: auf zwei 3MM-Whatmann-Filter folgte die Nitrocellulose- oder PVDF-Membran, das Gel wurde luftblasenfrei aufgelegt und mit zwei 3MM-Whatmann-Filter bedeckt. Nach Aufsetzen der Kathode erfolgte der Transfer mit $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 2 h. Nach Beendigung wurde die Membran zur Sichtbarmachung der Proteine 1 min in Ponceau-S-Lösung (Sigma) inkubiert und durch Waschen mit H_2O teilweise entfärbt. Die Membran wurde anschließend für den Immunoblot (s. 2.4.7) verwendet.

2.6.7 Immunoblot

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran (s. 2.6.6) wurden diese zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min bei Raumtemperatur in PBS mit 4 % (w/v) fettfreiem Trockenmilchpulver (PBS-Blotto) abgesättigt. Der Primärantikörper wurde in einer für jeden Antikörper spezifischen Verdünnung in PBS-Blotto für 1,5 bis 15 h bei 4°C auf die Filter gegeben. Überschüssiger Primärantikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS-Tween (0,05 % (v/v) Tween-20 in PBS) entfernt. Der entsprechende Meerrettichperoxidase-gekoppelte Zweitantikörper wurde wenn nicht anders angegeben in einer 1:2000 Verdünnung in PBS-Blotto verdünnt und der Filter darin 1,5 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Filter achtmal 5 min mit PBS-Tween gewaschen. Die Filter wurden mit "Enhanced Chemiluminescence"-System (ECL, Amersham Biosciences) entwickelt. Hierzu wurden die Filter 1 min mit 0,2 ml Substratlösung pro cm^2 inkubiert

und anschließend für 10 sec bis 15 min mit Kodak-X-Omat Filmen bei Raumtemperatur exponiert. Die Entwicklung der Filme erfolgte im automatischen Filmentwickler (Hyperprocessor, Amersham Biosciences).

2.6.8 Entfernung von Antikörpern von Membranen

Um sekundäre sowie primäre Antikörper wieder von PVDF- und Hybond ECL Nitrocellulose-Membranen zu entfernen, wurde die Membran 15 min in PBS-Tween gewaschen. Mit 10 ml "Stripping-Puffer" (100 mM 2-Mercaptoethanol; 2 % SDS; 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7) wurde die Membran 30 min bei 50°C im Drehinkubator inkubiert und vor einem erneuten Blockierungsschritt nochmals 15 min mit PBS-Tween gewaschen.

2.6.9 Zymogramme

Verwendete Puffer:

Waschpuffer 1:

2,5 % (v/v) Triton X-100

Waschpuffer 2:

2,5 % (v/v) Triton X-100
50 mM Tris-HCl pH 7,5

Waschpuffer 3:

2,5 % (v/v) Triton X-100
5 mM CaCl₂
1 µM ZnCl₂
50 mM Tris-HCl pH 7,5

Waschpuffer 4:

5 mM CaCl₂
1 µM ZnCl₂
50 mM Tris-HCl pH 7,5

Zum Nachweis der Gelatinaseaktivität von MMP-2 und MMP-9 in Zellkulturüberständen wurden Zymogramme mit gelatinehaltigen 6%igen SDS-PAGE durchgeführt [160]. Die zu

untersuchenden Zellkulturüberstände oder Zellysate wurden mit 1/3 Volumen 4 x SDS-Probenpuffer (nicht reduzierend) gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für 7 ml gelatinehaltiges Trenngel wurden 7 mg Gelatine (#G8150, Sigma) in 4 ml H₂O und 1,9 ml Trenngelpuffer bei 57°C 20 min im Wasserbad gelöst. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 1,5 ml Acrylamidmix, 150 µl 10% SDS-Lösung, 67 µl 10 %-Amoniumpersulfat-Lösung und 13 µl TEMED zugesetzt. Das Gel wurde wie unter 2.6.4 beschrieben gegossen und mit einem gelatinefreiem Sammelgel überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation der Gele wurden der Kamm entfernt, die Gelapparatur zusammengesetzt und die Pufferreservoirs mit Elektrodenpuffer gefüllt. Anschließend wurden maximal 20 µl Probe pro Spur geladen. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde der Molekulargewichtsstandard "Full Range Rainbow RPN800" (Amersham Biosciences) mit aufgetragen. Die Proteine wurden bei 10 mA/Gel für ca. 2-3 h bei 4°C aufgetrennt bis die blaue Lauffront das Gelende erreicht hatte.

Nach Beendigung des Gellaufes wurde das Gel von den Glasplatten entfernt und jeweils für 20 min mit den Waschpuffern 1, 2, 3 und 4 bei Raumtemperatur vorsichtig gewaschen. Der Verdau der Gelatine erfolgte dann in frischem Waschpuffer 4 bei 37°C im Brutschrank. Zur Detektion von MMP2 wurde das Gel 45 min, und zur Detektion von MMP9 wurde für 12 bis 18 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung der Gele für 30 min in Coomassie Blue R-250 Färbelösung (0,5 % (w/v) Coomassie Blue R-250, 30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure). Zum Entfärben wurden die Gele mehrere Stunden in Methanol:Essigsäure:Wasser (3:1:6) bei Raumtemperatur inkubiert.

Die proteolytische Aktivität der Proteasen war nun anhand von farblosen Banden auf dem ansonsten tiefblauen Gel sichtbar. Die Gele wurden durch Scannen oder durch Trocknen (2 h, 80°C im Gelrockner) konserviert.

2.6.10 Immunpräzipitation

Für Immunpräzipitationen wurde wenn nicht anders angegeben Gesamtzellysat (s. 2.4.1) einer konfluenten T75-Zellkulturflasche verwendet. Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt.

"Preclearing" der Zellysate mit Matrix:

50 µl Protein G-Agarose-Suspension (Sigma) wurden dreimal mit 1 ml Lysispuffer gewaschen. Die gewaschene Agarose wurde mit dem Zellysat 2 h auf einem

Drehinkubator inkubiert. Die Matrix wurde anschließend bei 10000 x g für 5 min sedimentiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Immunpräzipitation mit Antikörpern

Zu dem vorgeklärte Zelllysate wurden 1-3 µg des spezifischen Antikörpers gegeben und für 2-4 h auf dem Drehinkubator inkubiert. Das Zelllysate mit dem Antikörper wurde anschließend mit 50 µl gewaschener ProteinG-Agarose-Suspension für weitere 16 h auf dem Drehinkubator inkubiert. Nach Sedimentation der Matrix (3 min, 3000 x g) wurde diese dreimal mit 1 ml Waschpuffer (0,1 % (w/v) Triton X-100; 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 300 mM NaCl; 5 mM EDTA) oder für weniger stringentes Waschen mit 1 ml PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Immunkomplexe entweder für Glykosidasebehandlungen weiterverwendet oder durch Zugabe eines gleichen Volumens 1,5 x SDS-Probenpuffer und Inkubation für 5 min bei 95°C von der Matrix gelöst. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.7 Glykoprotein-Analysen

2.7.1 Tunikamycin-induzierte Inhibition der N-Glykosylierung

Das Nucleosidantibiotika Tunikamycin blockiert die Anheftung von N-Acetylglucosamin an Dolicholphosphat, den ersten Schritt der N-Glykosylierung. Aufgrund dieser Eigenschaft wird Tunikamycin zur Analyse der N-Glykosylierung von Proteinen eingesetzt.

Die Tunikamycinstocklösung enthielt 1 mg/ml Tunikamycin (Sigma) in DMSO. Die zu untersuchenden Zellen wurden in 6-Well-Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 50 %-60 % im entsprechenden Medium kultiviert. Für die Tunikamycinbehandlung wurde das Medium ausgetauscht gegen 2 ml Medium, das 0,1-10 µg/ml Tunikamycin enthielt. Die Zellen wurden für weitere 24 h im Brutschrank kultiviert. Als Kontrolle wurden Zellen mit der entsprechenden Menge DMSO (0,1-10 µl DMSO/ml Medium) allein kultiviert. In den behandelten Zellen wurde mittels Westernblot die Veränderung der Glykosylierung des Zielproteins untersucht.

2.7.2 Glykosidasebehandlung von Protein

Jede Glykosidase erkennt und hydrolysiert spezifische glykosidische Bindungen. Auf Grund ihrer Selektivität werden Glykosidasen auch zur Aufklärung von Kohlenhydratstrukturen an Glykoprotein eingesetzt.

2.7.2.1 Behandlung mit N-Glykosidase F

Das an Matrix gebundene immunpräzipitierte Protein (s. 2.6.10) wurde in 30 µl 0,1 M 2-Mercaptoethanol/ 0,1 % SDS für 5 min bei 95°C inkubiert. Nach Abkühlen und Sedimentation der Matrix (1 min, 1000 x g, 4°C) wurden zwei 10 µl Aliquots des Überstandes in neue Reaktionsgefäße überführt. Ein Aliquot wurde für den Verdau eingesetzt, das Zweite diente als Negativ-Kontrolle. Für den N-Glykosidase-Verdau enthielten die 25 µl-Reaktionsansätze neben 10 µl Protein-Lösung, 3 µl 0,5 M Tris-HCl (pH 8,6), 5 µl H₂O, 2 µl 10 % (v/v) NP-40 und 5 µl 2500 U/ml N-Glykosidase F *Chryseobacterium meningosepticum* (New England Biolabs). Die Negativkontrolle enthielt statt N-Glykosidase F 5 µl 0,5 M Tris-HCl (pH 8,6). Die Ansätze wurden 2 h bei 37°C inkubiert und das Enzym durch Zugabe von 25 µl 2 x SDS-Probenpuffer (s.2.1.2) und Inkubation für 5 min bei 95°C gestoppt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Proben bis zur Auftrennung im SDS-PAGE bei -20°C aufbewahrt.

2.7.2.2 Behandlung mit Fucosidase

Das an Matrix gebundene immunpräzipitierte Protein (s. 2.6.10) wurde in 20 µl DMEM (pH 6,0; Gibco) in Anwesenheit von 1 x Proteinaseinhibitor (100 x Protease Inhibitor Cocktail Set I, Calbiochem) aufgenommen. Nach Zugabe von 1 µl α1-3,4-Fucosidase *Xanthomonas sp.* (500 mU/ml; Calbiochem) wurde der Ansatz unter gelegentlichem Rühren für 1 h bei 37°C inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurde der gleiche Ansatz statt mit Enzym mit 1 µl 20 mM Tris-HCl/ 25 mM NaCl (pH 7,5) für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 9 µl 4 x SDS-Probenpuffer (nicht-reduzierend) gestoppt. Nach Inkubation für 5 min bei 95°C wurde die Matrix sedimentiert (3 min, 12000 x g, 4°C) und der Überstand bis zur Auftrennung im SDS-PAGE bei -20°C aufbewahrt.

2.7.3 Proteinpräzipitation mit Agarose-gekoppeltem Lektin

Zur Proteinpräzipitation mit dem direkt an Agarose gekoppelten Lektinen PHA-L (Linaris, Wertheim) wurden die Lysate mit Brij96-Lysispuffer (1 % (w/v) Brij 96 V (Fulka); 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 25 mM HEPES; pH 7,5) wie unter 2.6.1 beschrieben hergestellt, die Zellen wurde aber statt 30 min 4 h mit dem Lysispuffer inkubiert. Nach dem "Precognaring" erfolgte die Inkubation der Lysate mit 50 µl gewaschener (1:1, v/v) PHA-L-Agarose für 16 h auf dem Drehinkubator bei 4°C. Nach Sedimentation der Matrix (3 min, 3000 x g, 4°C) wurde diese dreimal mit 1 ml PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden durch Zugabe von 30 µl 1,5 x SDS-Probenpuffer und Inkubation der Proben für 5 min bei 95°C die Proteine von der Matrix gelöst. Als Negativkontrolle wurden Lysate mit Protein G Agarose ohne Lektin inkubiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.8 Immunzytochemische und –histochemische Färbungen

2.8.1 Immunzytochemische Färbung für die Auswertung mittels Durchflusszytometer

Zum Ablösen der Zellen von der Kulturschale wurden 2 ml 5 x EDTA/Trypsin auf eine T75-Zellkulturflasche gegeben, die Schale wurde kurz geschwenkt und das Trypsin wieder abgezogen. Die Zellen wurden bis zur Vollständigen Ablösung im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Das Trypsin wurde anschließend durch Zugabe von 5 ml FACS-Puffer (PBS mit 5 % (v/v) FCS, 0,1 % (w/v) NaN₃) neutralisiert. Nach Sedimentation (200 x g, 5 min) wurde das Zellpellet in 2 ml FACS-Puffer aufgenommen. Für die flusszytometrische Analyse wurden 1 x 10⁶ Zellen in 100 µl FACS-Puffer mit 1 µg Primärantikörper für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen, sedimentiert und das Zellpellet wurde in 100 µl einer 1/10 Verdünnung des FITC-markierten Sekundärenantikörpers (s. Tab. 1.2) resuspendiert. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 20 min bei Raumtemperatur im Dunklen. Nach zwei abschließenden Waschgängen wurden die Zellen in 400 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Messung der Proben erfolgte am Durchflusszytometer (BD FACScan) mit Hilfe der Software CellQuest Pro.

2.8.2 Immunzytochemische Färbung für die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskop

Zellen wurden auf Glasplättchen (12 mm Ø; Marienfeld GmbH; Lauda-Königshofen) in 24-Well-Platten ausgesät. Die auf den Glasplättchen angewachsenen Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und 10 min mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Die Zellen wurden viermal in PBS gewaschen und anschließend zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 1 % (w/v) BSA in PBS für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Primärantikörper wurde in geeigneter Verdünnung in PBS mit 1 % (w/v) BSA für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in 1 % (w/v) BSA in PBS für 1,5 h bei Raumtemperatur. Zur Anfärbung der Zellkerne wurden die Zellen 1 min mit DAPI-Lösung (40 ng/ml DAPI (Serva, Heidelberg) in PBS) inkubiert. Abschließend wurde erneut viermal mit PBS gewaschen und die Präparate mit Mowiol Mounting Medium (s.u.) eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica GmbH (Wetzlar).

Herstellung von Mowiol Mounting Medium

Zur Herstellung von Mowiol Mounting Medium wurden 6 g Glycerin mit 2,4 g Mowiol Typ 4-88 (Calbiochem) in einem 50 ml-Röhrchen verrührt und nach Zugabe von 6 ml H₂O 2 h auf einem Drehschüttler vermischt. Nach Zugabe von 12 ml 200 mM Tris-HCl (pH 8,5) wurde die Lösung 10 min auf 50°C erwärmt und nach Abkühlung auf Raumtemperatur 15 min (5000 x g) zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand mit 1-2 g p-Phenylendiamine Dihydrochlorid (Sigma) als Anti-Fading-Reagenz versetzt. Das fertige Mounting Medium wurde aliquotiert und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

2.8.3 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten

2.8.3.1 Tumorgewebe der Mammakarzinomprognosearrays

Zur Untersuchung der EMMPRIN-Expression in primären Mammakarzinomen wurden Paraffinschnitte von Mammakarzinomprognosearrays (Tissue-Microarrays; TMAs) verwendet. Die Arrays wurden am Institut für Pathologie (Universitätsklinikum Basel) hergestellt [161], dazu wurden Gewebezylinder mit einem Durchmesser von 0,6 mm aus

ausgewählten Regionen von „Spender“-Tumorblöcken gestanzt und in einem neuen „Empfänger“-Paraffinblock angeordnet. Der so entstandene Tumorarray-Paraffinblock wurde wie ein normaler Paraffinblock an einem Schlittenmikrotom geschnitten. Die Schnitte wurden von Prof. G. Sauter (Institut für Pathologie, UKE, Hamburg) zur Verfügung gestellt und enthalten 2222 Gewebestanden von in Formalin fixierten Mammakarzinomen. Der Histologietyp der Tumorstanzen war in 1551 Fällen duktal, in 312 lobulär, und wurde in 337 Fällen anderen bekannten Histologietypen zugeordnet bzw. war in 22 Mammakarzinomgeweben nicht speziell klassifiziert. Die durchschnittliche mediane Nachbeobachtungszeit der operierten Patientinnen betrug 46 Monate (Bereich: 1-176 Monate). Im Median waren die Patientinnen 63 Jahre alt (Bereich: 26-101 Jahre).

2.8.3.2 Färbung am DAKO-Färbeautomaten

Die Paraffinschnitte (8 µm) wurden auf positiv geladene Objektträger (Superfrost Plus) aufgezogen und über Nacht bei 56°C erhitzt. Danach wurden die Schnitte zur Entparaffinisierung bei Raumtemperatur zweimal 10 min in Xylol inkubiert und anschließend mit 100 %, 95 % und 80 % Ethanol hydriert. Die Färbung wurde nach 20-minütiger Mikrowellenvorbehandlung in Citratpuffer (10 mM, pH 6,0) auf dem DAKO-Färbeautomaten mit dem DAKO ChemMate™ Detection Kit, Peroxidase/DAB (DAKO, Glostrup, Denmark) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zum Nachweis der EMMPRIN-Expression wurde eine Kombination aus zwei EMMPRIN-spezifischen Antikörpern (10 µg/ml Klon MEM-M6/1; Biogenesis, Kingston, USA und 5 µg/ml Klon HIM6; RDI; Flanders, USA) verwendet. Auf die Inkubation der Primärantikörper folgte die Inkubation mit biotinyliertem Ziege-anti-Maus-Immunglobulin (10 min) und mit Streptavidin gekoppelt an Meerrettichperoxidase (10 min). Die Substratentwicklung erfolgte mit 3,3'-Diaminobenzidine-tetrahydrochlorid (DAB) als Chromogen in gepufferter Lösung mit Hydrogenperoxid. Dann wurden die Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt. MOPC21 (15 µg/ml, Sigma), ein unspezifisches Maus-Myeloma Immunglobulin, wurde als IgG1 Isotypkontrolle eingesetzt.

Die Färbung wurde nach dem Remmele Score beurteilt. Dieser Score ist ein Produkt aus der Farbintensität (0: keine Färbung; 1: schwache Färbung; 2: mittelstarke Färbung; 3: starke Färbung) und dem Prozentsatz gefärbter Tumorzellen (0: keine gefärbten Tumorzellen; 1: < 10 %; 2: 11-50 %; 3: 51-80 %; 4: >80 % gefärbte Tumorzellen).

2.8.3.3 Hämalaun/Eosin-Färbung von Paraffinschnitten

Bei der Hämalaun/Eosin-Färbung handelt es sich um eine kombinierte Kern- und Plasmafärbung. Während das positivgeladene Hämalaun in stark saurem Milieu mit den Nukleinsäuren des Chromatins Bindungen eingeht, und nach der Erhöhung des pH-Wertes über 3,0 zu einer blauen Kernfärbung führt, entsteht mit Eosin eine rote Plasmafärbung.

Die über Nacht bei 56°C gebackenen Paraffinschnitte wurden zuerst zweimal 10 min in Xylol entparaffinisiert und dann in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 % und 80 % Ethanol) hydriert. Nach einer kurzen Inkubation in Wasser wurden die Schnitte für 7 min in Mayer's Hämalaun Lösung gestellt. Danach wurden die Schnitte mit Leitungswasser gespülen, kurz in Salzsäure/Ethanol eingetaucht und dann 10 min mit Leitungswasser inkubiert. Es folgte die Eosinfärbung für 30 Sekunden. Nach kurzem Spülen in Leitungswasser und einer aufsteigenden Ethanolreihe (80 %, 96 % und 100 % Ethanol) wurden die Schnitte zweimal 5 min in Xylol inkubiert und mit Entellan (Sigma) eingedeckelt.

2.9 Statistische Auswertungen

2.9.1 Chi-square -Test

Der Chi-square Test wurde benutzt, um die Beziehung zwischen der EMMPRIN-Expression und traditionellen Risikofaktoren zu bestimmen. Die Tumorproben wurden gruppiert in "positive Proteinexpression" (mehr als 10 % gefärbte Tumorzellen) und "negative Proteinexpression" (weniger als 10 % gefärbte Tumorzellen). Die Analysen wurden mit dem Programm SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) für PC (Version 11 für Windows) durchgeführt.

2.9.2 Univariate Analyse

Kaplan-Meier Kurven [162] wurden für jeden getesteten Marker auf dem Prognosearray für das Gesamtüberleben und das tumorassoziierte Überleben bestimmt. Wenn der beobachtete Effekt des Markers in Bezug auf das Gesamtüberleben bzw. das tumorassoziierte Überleben größer war als die übliche Streuung der Messwerte, wurde das gefundene Ergebnis als statistisch „signifikant“ ($p > 0,05$) bewertet. Die Analysen wurden

mit dem Programm SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) für PC (Version 11 für Windows) durchgeführt.

2.9.3 Multivariate Analyse

Die Unabhängigkeit der aus der univariaten Analyse als signifikant hervorgegangenen Marker wurde anschließend in einem multivariaten Cox-Regressionsmodell als Indikatorvariablen überprüft. Als statistisch signifikant wurden Werte von $p < 0,05$ angesehen. Diese Analyse wurde mit freundlicher Unterstützung von Prof. J. Berger (Institut für Mathematik und Datenverarbeitung in der Medizin, UKE, Hamburg) mittels des Programms SPSS für PC (Version 11 für Windows) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 EMMPRIN-Expression in primären Mammakarzinomen

3.1.1 EMMPRIN-Expression in primären Mammakarzinom in Korrelation zu klinischen und pathologischen Faktoren

Die maligne Progression von Karzinomen umfasst viele spezifische Schritte, die auch mit der Organisation des Epithels zusammenhängen. Dazu gehört z.B. der Verlust von Gewebestrukturen durch Modulierung von Zell-Zell- und Zell-Substrat-Kontakten [163]. Auch proteolytische Prozesse spielen eine zentrale Rolle. Erst der Abbau der Basalmembran und des umgebenen Stromas ermöglicht es Tumorzellen in benachbarte Gewebe einzuwandern [38]. Neuere Arbeiten weisen darauf hin, dass EMMPRIN an vielen Schritten der malignen Progression von Karzinomen beteiligt ist. So konnte gezeigt werden, dass EMMPRIN die Sekretion von matrixabbauenden Enzymen - den MMPs - durch peritumorale Fibroblasten induziert und damit nicht nur die Invasion von Tumorzellen, sondern auch die Proliferation durch Freisetzung in der extrazellulären Matrix gespeicherter Wachstumsfaktoren fördert [96, 164].

Im Folgenden sollte nun eine Untersuchung zur Bedeutung der EMMPRIN-Expression im humanen Mammakarzinom durchgeführt werden. Eine korrelative Studie erfolgte durch immunhistochemische Analysen von Mammakarzinom-Prognosearrays (TMA: Tissue Microarray). Durch die Verwendung eines solchen Gewebearrays, auf dem sich Primärtumorstanzen verschiedener Mammakarzinome befanden, konnten mit einem Objektträger 153 - 520 Gewebeproben gleichzeitig untersucht werden.

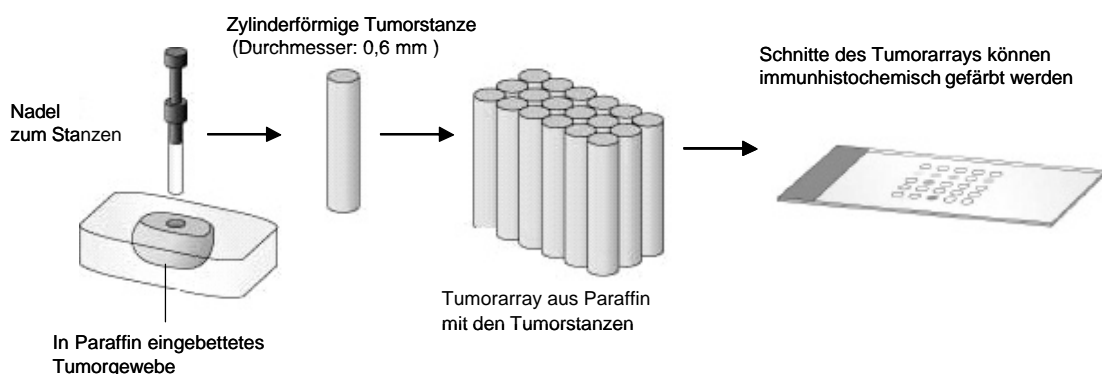


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Herstellung von Gewebearrays.

Für die Herstellung eines Arrays wurden Gewebezylinder mit einem Durchmesser von 0,6 mm aus ausgewählten Regionen von „Spender“-Tumorblöcken gestanzt und in einem neuen „Empfänger“-Paraffinblock angeordnet (s. Abb.: 3.1). Der so entstandene Paraffinblock konnte wie ein normaler Paraffinblock an einem Schlittenmikrotom geschnitten werden.

Der in dieser Arbeit verwendete Mammakarzinom-Prognosearray wurde von Prof. Dr. med. G. Sauter (Institut für Pathologie, UKE, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Der Array enthielt 2222 Mammakarzinomproben, von denen die klinisch-pathologischen Daten bekannt waren (s. 2.8.3), sowie Proben verschiedener Kontrollgewebe [161]. Keine der Patientinnen wies zum Zeitpunkt der Primärdiagnose Fernmetastasen auf. Ferner wurden alle Patientinnen über 10 Jahre nachbeobachtet. Da beim Mammakarzinom die Metastasenbildung viele Jahre nach der Diagnosestellung und der Resektion des Primärtumors neu auftreten kann, ist es wichtig, Patientinnen mit einer langen Nachbeobachtungszeit zu untersuchen.

Die immunhistochemische Färbung wurde, wie unter 2.8.3 beschrieben, durchgeführt. Eine repräsentative Färbung eines TMA's ist in Abb. 3.2 gezeigt.

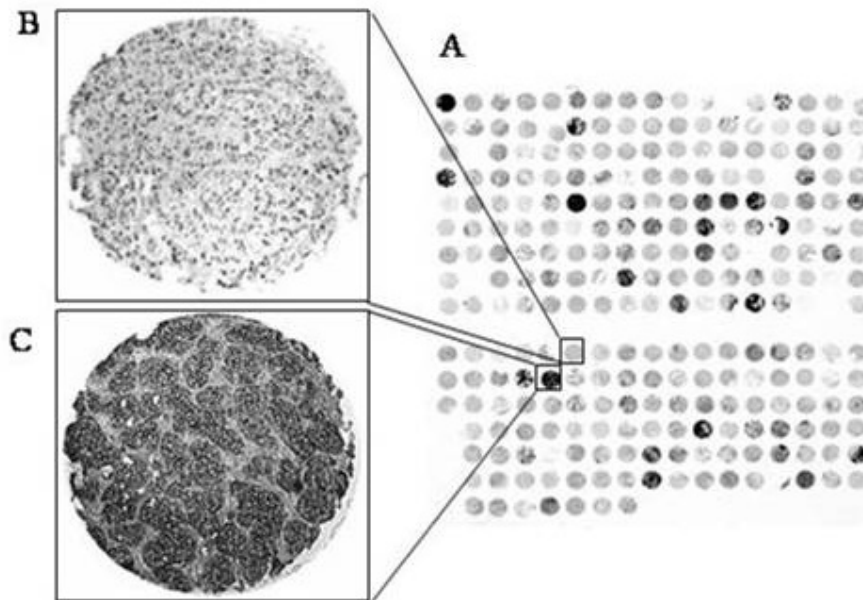


Abb. 3.2: Immunhistochemische Färbung von EMMPRIN in Mammakarzinomproben. (A) Mammakarzinom-Prognosearray (TMA). (B,C) Zwei vergrößert dargestellte Tumorstanzen, die repräsentativ eine negative (B) und eine positive (C) Färbung für EMMPRIN zeigen.

Aufgrund von fehlenden Tumorzellen in den Gewebestanden, während der Färbung abgelöstem Gewebe und dem Vorhandensein von nekrotischem oder beschädigtem Gewebe, konnte nicht von allen ursprünglich in den Array integrierten 2222 Gewebeproben ein interpretierbares Ergebnis erhalten werden. Die möglichen Korrelationen zwischen der EMMPRIN-Expression und den verschiedenen klinisch-pathologischen Faktoren wurden auf Basis von 1816 Tumorproben, die in der immunhistochemischen Färbung ein interpretierbares Ergebnis lieferten, statistisch evaluiert.

Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tab. 3.1 zusammengestellt. Die Resultate zeigten, dass EMMPRIN-Expression in 49,8 % ($n = 904$) der Tumore gefunden wurde. Davon wiesen 41,4 % ($n = 371$) eine schwache, 25,4 % ($n = 230$) eine mittlere und 33,2 % ($n = 300$) eine starke Färbung auf. Für die weitere statistische Analyse wurden alle Fälle, die eine EMMPRIN-Färbung zeigten, in einer Gruppe zusammengefasst. Diese Vereinfachung wurde vorgenommen, da die statistischen Analysen keine relevanten Unterschiede in der Prognose und dem Tumorphänotyp zwischen Tumoren mit variierender Färbeintensität zeigten. Obwohl in allen histologisch unterscheidbaren Subtypen von Mammakarzinom EMMPRIN-Expression nachweisbar war, ließen sich dennoch deutliche Unterschiede in der EMMPRIN-Expression zwischen den jeweiligen Tumorarten beobachten. EMMPRIN-Expression war weniger häufig in lobulären (28,6%) Karzinomen als in duktalem (51,8%) oder anderen (59,2%) Karzinomen ($p < 0,001$) und die Färbung schien invers mit dem Alter der Patientinnen ($p = 0,003$) zu korrelieren. Des Weiteren korrelierte die EMMPRIN-Expression mit einem hohen Tumorgrad, dies zeigte sich in einem steigenden Prozentsatz positiver Tumore von Grad 1 bis 3 ($p = 0,001$). Eine inverse Korrelation zeigte die EMMPRIN-Expression zum Östrogen- und Progesteronrezeptor-Status ($p < 0,001$, $p = 0,028$). Positivität war außerdem assoziiert mit dem histologisch bestimmten mitotischen Index ($p < 0,001$) und der Tumorgröße ($p = 0,001$).

Obwohl die EMMPRIN-Expression keinen Zusammenhang zur Lymphknoten-Metastasierung zeigte ($p=0,718$), da Patientinnen mit Tumorzellen in den Lymphknoten (Level pN1/2) ein fast gleiches EMMPRIN-Expressionsmuster im Primärtumor aufwiesen wie Patientinnen ohne Lymphknoten-Metastasen (Level pN0), zeigten die Ergebnisse deutlich, dass die EMMPRIN-Expression im Mammakarzinom mit Risikofaktoren wie Tumorgrad, negativem Hormonrezeptor-Status, Mitose-Index und Tumorgröße assoziiert war.

Tab. 3.1: EMMPRIN-Expression in Relation zu klinischen und pathologischen Faktoren.

Variable	EMMPRIN-Expression		p-Wert
	positiv	negativ	
gesamt (n=1816)	49,8% (904)	50,2% (912)	
Histologietyp			<0,001
duktales Karzinom (n=1285)	51,8% (665)	48,2% (620)	
lobuläres Karzinom (n=245)	28,6% (70)	71,4% (175)	
andere (n=262)	59,2% (155)	40,8% (107)	
gesamt (n=1792) ^a	49,7% (890)	50,3% (902)	
Tumorgroße			0,001
pT1 (n=632)	44,0% (278)	56,0% (354)	
PT2 (n=862)	53,2% (459)	46,8% (403)	
PT3/4 (n=316)	51,9% (164)	48,1% (152)	
gesamt (n=1810) ^a	49,8% (901)	50,2% (909)	
Lymphknoten-Status			0,718
pN0 (n=751)	49,5% (372)	50,5% (379)	
pN1/2 (n=753)	50,5% (380)	49,5% (373)	
gesamt (n=1504) ^a	50% (752)	50% (752)	
Differenzierungsgrad			<0,001
G1 (n=432)	39,8% (172)	60,2% (260)	
G2 (n=690)	41,4% (286)	58,6% (404)	
G3 (n=562)	66,7% (375)	33,3% (187)	
gesamt (n=1684) ^a	49,5% (833)	50,5% (851)	
Mitotischer-Index^b			<0,001
M1 (n=887)	38,1% (338)	61,9% (549)	
M2 (n=299)	54,2% (162)	45,8% (137)	
M3 (n=498)	66,7% (332)	33,3% (166)	
gesamt (n=1684) ^a	49,4% (832)	50,6% (852)	
Alter			0,003
= 50 (n=381)	56,4% (215)	43,6% (166)	
> 50 (n=1432)	47,9% (686)	52,1% (746)	
gesamt (n=1813) ^a	49,7% (901)	50,3% (912)	
Östrogenrezeptor-Status			<0,001
Negative (n=403)	72,0% (290)	28,0% (113)	
Positive (n=1330)	42,9% (571)	57,1% (759)	
gesamt (n=1733) ^a	49,7% (861)	50,3% (872)	
Progesteronrezeptor-Status			0,028
Negative (n=1164)	51,6% (601)	48,4% (563)	
Positive (n=607)	46,1% (280)	53,9% (327)	
gesamt (n=1771) ^a	49,7% (881)	50,3% (890)	

^a Aufgrund von fehlenden klinisch-pathologischen Daten variiert die Gesamtanzahl an Proben.^b M1=10 Mitosen pro Gesichtsfeld (GF), M2=10-20 Mitosen pro GF und M3=20 Mitosen pro GF.

3.1.2 Prognostische Signifikanz der EMMPRIN-Expression im humanen Mammakarzinom

Der Einfluss eines histopathologischen Faktors (z.B. der Tumorgöße oder der EMMPRIN-Expression) auf das Überleben eines Patientenkollektivs kann mit der Kaplan-Meier-Analyse untersucht werden. Dabei werden im Logranktest die Überlebenswahrscheinlichkeiten errechnet. Bei dieser Berechnung werden auch die Informationen berücksichtigt, die in den zensierten Daten vorhanden sind, d.h. Daten mit zunächst vorläufigem Charakter, weil die betreffenden Patientinnen noch nicht verstorben sind oder weil sie sich vorzeitig der Beobachtung entzogen haben. Um zu untersuchen, ob von einer repräsentativen Verteilung der Tumorproben auf dem Array ausgegangen werden kann, wurden zunächst bekannte Risikofaktoren auf ihre prognostische Bedeutung hin untersucht [8-12]. Mit den Tumoren des Prognosearrays konnte die publizierte prognostische Bedeutung der Tumorgöße, des Differenzierungsgrades, des Lymphknoten-Status, des Histologietyps und Hormonrezeptor-Status bestätigt werden. Somit kann von einem repräsentativen Kollektiv auf dem Array ausgegangen werden.

Zur Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeit wurde das tumorassoziierte Überleben verwendet. Im Gegensatz zum Gesamtüberleben werden beim tumorassoziierten Überleben nur die Todesfälle in die Analyse mit einbezogen, die eindeutig auf die Tumorerkrankung zurückzuführen sind. Die prognostische Signifikanz der EMMPRIN-Färbung wurde für das tumorassoziierte Überleben auf der Basis von 774 Tumorproben ermittelt, von denen klinische Nachbeobachtungsdaten und interpretierbare Färbungen vorlagen.

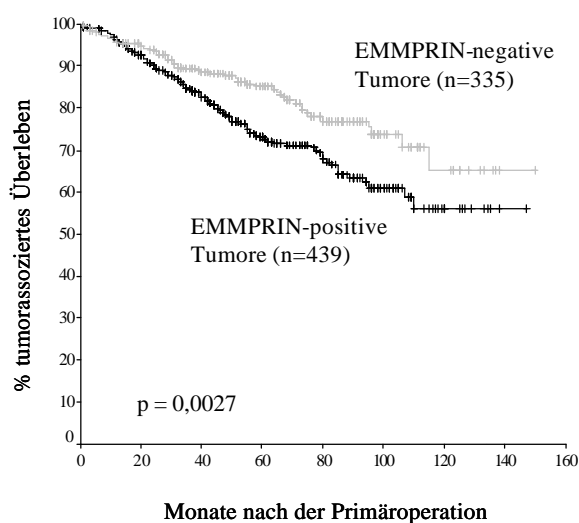


Abb. 3.3: Korrelation zwischen der EMMPRIN-Expression und dem tumorassoziierten Überleben von Mammakarzinom-Patientinnen.

Überlebens-Analysen wurden mit allen Proben, die in der EMMPRIN-Färbung ein interpretierbares Ergebnis zeigten und von denen die klinischen Nachbeobachtungsdaten verfügbar waren (n=774), durchgeführt.

Für die Überlebensanalyse wurden die Proben von Patientinnen, die eine EMMPRIN-Färbung zeigten, mit den Proben verglichen, die keine detektierbare Färbung aufwiesen. Die Analyse des tumorassoziierten Überlebens umfasste 439 Tumore mit nachweisbarer EMMPRIN-Expression und 335 Tumore, die keine EMMPRIN-Färbung zeigten. Es ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen einer erhöhten EMMPRIN-Expression und einem kürzeren Überleben der Patientinnen ($p=0,0027$) (s. Abb. 3.3).

Die Prognostische Relevanz der EMMPRIN-Expression, die in der univariaten Analyse eine signifikante Korrelation zum kürzeren Überleben der Patientinnen zeigte, sollte des Weiteren auf ihre Unabhängigkeit getestet werden. Hierzu wurde der Einfluss der EMMPRIN-Expression auf das Überleben in einem Cox-Regressionsmodell zusammen mit den wichtigsten Prognosefaktoren (Lymphknoten-Status, Tumorgröße, Differenzierungsgrad und Hormonrezeptor-Status) untersucht. In dieser multivariaten Analyse war die Expression von EMMPRIN kein unabhängiger prognostischer Faktor ($p = 0,275$). Bei der Untersuchung spezieller Untergruppen von Mammakarzinom-Patientinnen zeigte sich ein signifikanter prognostischer Einfluss der EMMPRIN-Expression bei älteren Patientinnen. Separate Kaplan-Meier-Analysen für Patientinnen jünger oder älter als 50 Jahre (eine Altersgrenze, die eine angenäherte Einteilung in prä- und post-menopausale Frauen erlaubt) zeigte einen Zusammenhang zwischen EMMPRIN-Expression und einem kürzeren tumorassoziierten Überleben bei Patientinnen die älter als 50 Jahre waren ($p = 0,0014$; Abb. 3.4 A), während für die andere Untergruppe (Patientinnen ≤ 50 Jahre) keine Korrelation gefunden wurde ($p = 0,736$; Abb. 3.4 B).

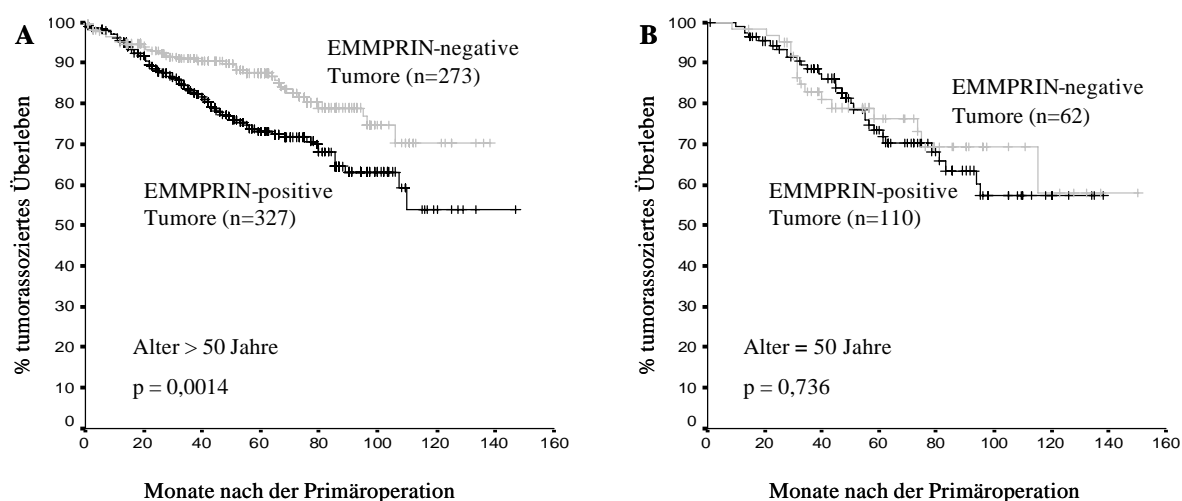


Abb. 3.4: Separate Kaplan-Meier-Analysen wurden für Patienten die älter (A) oder jünger (B) als 50 Jahre waren durchgeführt (n=772, von zwei Patientinnen waren das Alter nicht bekannt).

Wie die multivariate Analyse zeigte, ist die EMMPRIN-Expression bei post-menopausalen Patientinnen ein von anderen wichtigen Faktoren wie Tumorgröße, Lymphknoten-Status, Differenzierungsgrad und Östrogenrezeptor-Status ($p = 0,036$; relatives Risiko 1,7; Tab. 3.2) unabhängiger Prognosefaktor.

Tab. 3.2: Die multivariate Analyse mittels Cox-Regression zeigt einen prognostischen Einfluss der EMMPRIN-Expression bei über 50-jährigen Patientinnen.

Risikofaktor	Multivariate Analyse für Patientinnen älter als 50 Jahre ¹		
	Relatives Risiko	95% Konfidenz Intervall	p-Wert
Lymphknoten-Status pN1/2 versus pN0	4,4	2,4-8,0	<0,001
Differenzierungsgrad Grade 3 versus Grade 1-2	1,8	1,1-3,0	0,015
Tumorgröße pT3/4 versus pT1/2	2,2	1,4-3,6	0,001
Östrogenrezeptor-Status negativ versus positiv	1,9	1,1-3,6	0,021
EMMPRIN-Expression positiv versus negativ	1,7	1,0-2,8	0,036

¹ Eine schrittweise multivariate Analyse wurde unter Verwendung des Cox-Regressions-Hazard-Modells durchgeführt.

3.2 Analyse der Expression von EMMPRIN in humanen Mammakarzinomzelllinien und primären Tumorzellen

3.2.1 Expression von EMMPRIN in humanen Mammakarzinomzelllinien

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von EMMPRIN an primären Tumoren deuten auf eine große Bedeutung von EMMPRIN in der Karzinogenese des Mammakarzinoms hin. Im Weiteren sollten nun die molekularen Funktionen von EMMPRIN in Mammakarzinomzellen untersucht werden. Als erster Schritt wurde hierfür die Expression von EMMPRIN in Mammakarzinomzelllinien mittels Westernblot-Analyse untersucht. Es wurden Gesamtzellextrakte von 14 humanen Mammakarzinomzelllinien, die sich in ihrer Tumorigenität und im metastatischen Potenzial *in vivo* unterscheiden, hergestellt (s. 2.6.1). Um auszuschließen, dass unterschiedliche Proteinmengen geladen wurden, wurde der Blot zusätzlich mit einem Antikörper gegen HSC70 (Klon B6) inkubiert. Bei dem HSC70-Protein handelt es sich um ein konstitutiv exprimiertes Hitzeschockprotein [165]. Die

Evaluierung dieses Proteins als Ladungskontrolle für Tumorzelllinien wurde am ICRF (London, UK) vorgenommen (persönliche Mitteilung: Dr. Volker Assmann).

Der Westernblot in Abb. 3.5 zeigt die EMMPRIN-Expression der folgenden humanen Mammakarzinomzelllinien: SK-BR-3, T-47D, MDA-MB-468, MDA-MB-435S, ZR-75-1, MCF-7, MDA-MB-231, BT-474, BT-20, DU4475 und GI-101. Außerdem wurden die beiden Mikrometastasen-Zelllinien BC-S1 und BC-K1 untersucht. Bei diesen Zelllinien handelt es sich um SV40 large T Antigen immortalisierte mikrometastatische Zellen aus dem Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen [71]. Als Model für normales Brustepithel wurde die Zelllinie MTSV 1-7 verwendet. MTSV 1-7 Zellen sind normale humane Brustepithelzellen, die ebenfalls mit dem SV40 large T Antigen immortalisiert wurden.

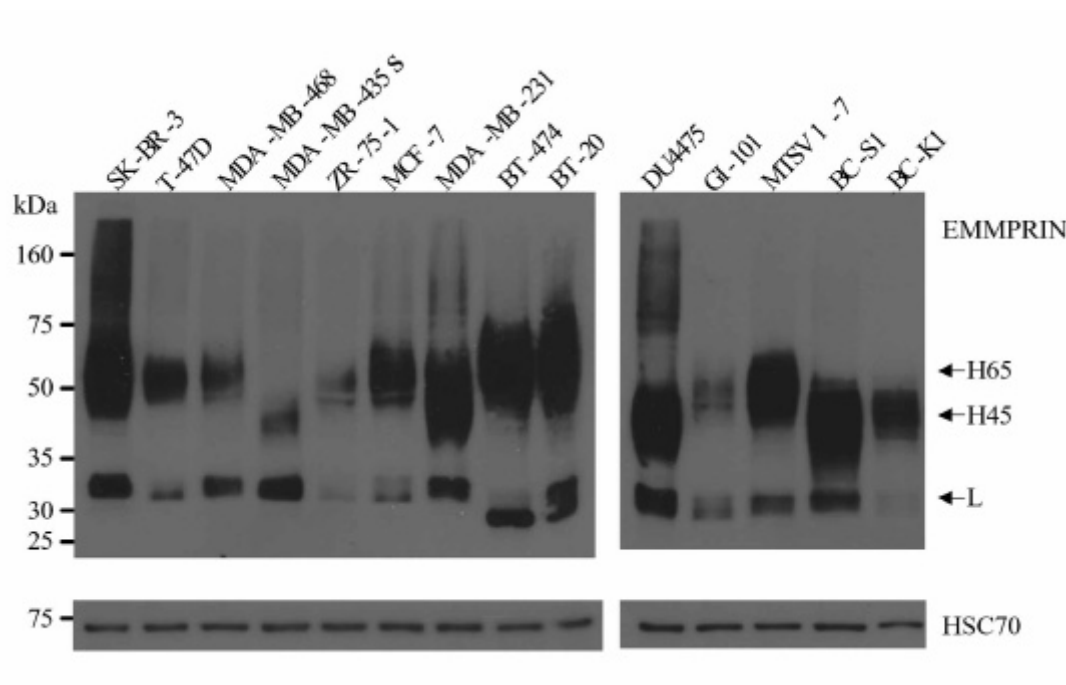


Abb. 3.5: Analyse der EMMPRIN-Expression in humanen Mammakarzinomzelllinien. 14 Mammakarzinomzelllinien wurden mit NP40 Lysispuffer lysiert und anschließend mit nicht-reduzierendem Probenpuffer aufgekocht. Jeweils 25 μ g Protein wurden pro Bahn aufgetragen und im 10% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf Nitrozellulose-Membran folgte der Nachweis der EMMPRIN-Proteine im Immunoblot, hierfür wurde der EMMPRIN-Antikörper HIM6 und der Sekundäreantikörper in einer 1:2000 Verdünnung eingesetzt. Der gleiche Blot wurde „gestrippt“ und anschließend mit einem Antikörper gegen HSC70 (B6; 1: 1×10^6 Verdünnung) detektiert.

In allen Zelllinien ließ sich die Expression von EMMPRIN nachweisen. Unterschiede zeigen die Zelllinien aber hinsichtlich der Expressionsstärke und der Molekulargewichte der EMMPRIN-Proteine. Ein Vergleich des EMMPRIN-Expressions-Niveaus zeigte in den Zelllinien T-47D, MDA-MB-468, ZR-75-1, MCF-7, MDA-MB-

435S, GI-101 und BC-K1 eine eher schwache Expression, während die Zelllinien SK-BR-3, MDA-MB-231, BT-474, BT-20, DU4475, BC-S1 und MTSV 1-7 eine starke Expression zeigten.

Abb. 3.5 zeigt, dass jede Zelllinie eine kleine EMMPRIN-Variante (=32 kDa) und eine große EMMPRIN-Variante (45-65 kDa) exprimiert. Im Weiteren wird das kleine EMMPRIN-Protein als L-Form (Low-Form) und die größere Variante als H-Form (High-Form) bezeichnet. Der Vergleich der L-Formen in den verschiedenen Zelllinien zeigte Unterschiede in der Expressionsstärke. Auffällig war, dass die Expressionsstärke der L-Form nicht immer mit der Expressionsstärke der jeweiligen H-Form korrelierten, z.B. wiesen die MDA-MB-468 und die MDA-MB-435S Zellen eine eher schwache Expression der H-Form auf, aber eine starke Expression der L-Form. Auch zeigten nicht alle Zelllinien für die L-Form das gleiche Molekulargewicht. Die meisten Zelllinien exprimierten eine L-Form von ~32 kDa, abweichend davon ließen sich bei den BT-474 und den BT-20 Zellen L-Formen mit einem Molekulargewicht von ~29 kDa nachweisen.

Die H-Form zeigte im Blot sehr diffuse Banden, was auf einen hohen Glykosylierungsgrad des Proteins hinweist. Vergleicht man die Größe der H-Form in den verschiedenen Zelllinien, so zeigten die meisten Zelllinien eine H-Form von ca. 65 kDa (H65-Form). Die *in vivo* aggressiveren Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-435S, MDA-MB-231 und DU4475 exprimierten dagegen eine H-Form von zirka 45 kDa. Diese Mammakarzinomzelllinien besitzen nach orthotoper Injektion in SCID- oder Nacktmäuse ein hohes metastatisches Potenzial [166]. Auch die Mikrometastasen-Zelllinien BC-S1 und BC-K1 exprimieren die H45-Form. Von den H65-Form exprimierenden Zelllinien entwickelt nur die GI-101 nach subkutaner Injektion in Nacktmäusen Metastasen [167].

Zusammenfassend lässt sich sagen:

1. Alle Mammakarzinomzelllinien exprimieren EMMPRIN
2. Die Expressionsstärke variiert zwischen den Zelllinien
3. Jede Zelllinie exprimiert eine H-Form und eine L-Form
4. Die Zelllinien exprimieren unterschiedliche H- und L-Formen
5. Es existieren eine H45-Form und eine H65-Form
6. Die Expression der H45-Form scheint mit der Aggressivität der Zelllinie zu korrelieren.

Die Expression der verschiedenen H-Formen ist besonders interessant, da nur die H-Form die Expression von MMPs stimulieren kann [100]. Weder die Existenz noch die Funktion der verschiedenen H-Formen in den Mammakarzinomzelllinien wurde bisher beschrieben.

3.2.3 Expression der EMMPRIN-Varianten in primären Tumorzellen

Um auszuschließen, dass das Auftreten verschiedener H-Formen bei Mammakarzinomzelllinien nur ein Phänomen von Zellkulturzelllinien ist, wurden auch Lysate von primären Brusttumoren mittels Westernblot-Analyse untersucht. Hierzu wurden Gesamtzellextrakte von drei Tumoren hergestellt. Abb. 3.6 zeigt das Ergebnis der Westernblot-Analyse und die histologischen Daten der jeweils untersuchten Tumore.

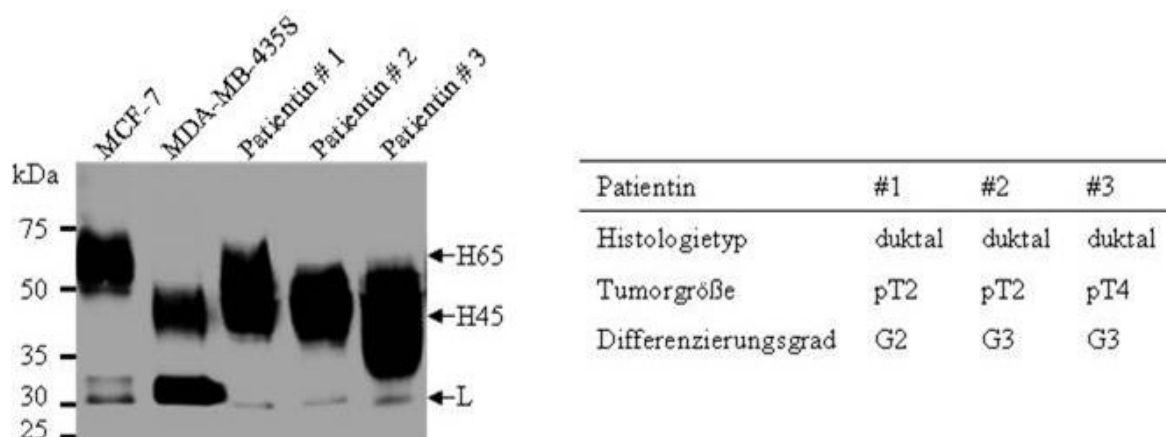


Abb. 3.6: Analyse der EMMPRIN-Expression in primären Mammakarzinomen. Mammakarzinom-Proben von drei Patientinnen wurden mit NP-40 Lysispuffer lysiert. Jeweils 25 µg Protein der Lysate wurden pro Bahn aufgetragen. Die Westernblot-Analyse erfolgte mit dem EMMPRIN-spezifischen Antikörper HIM6 (Verdünnung 1:1000). Parallel wurden Lysate der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-435S analysiert.

Um die EMMPRIN-Varianten in den Tumoren mit den Varianten der Zelllinien vergleichen zu können, wurden zwei Mammakarzinomzelllinien parallel zu den Tumorproben aufgetragen. Hierfür wurden die MCF-7 Zellen und die MDA-MB-435S Zellen ausgewählt, weil sie die H65-Form bzw. H45-Form exprimieren. Wie der Blot in Abb. 3.6 zeigt, waren auch bei den Primärtumoren die unterschiedlichen H-Formen nachweisbar. Um allerdings einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der H45-Form bei primären Mammakarzinomen und der Aggressivität der Tumore feststellen zu können, müsste ein größeres Patientenkollektiv untersucht werden.

Die Untersuchung der Brusttumore hat gezeigt, dass die Existenz verschiedener H-Formen des EMMPRIN-Proteins nicht eine Besonderheit der Mammakarzinomzelllinien

ist, sondern auch im primären Tumorgewebe von Patienten zu beobachten ist. Im Weiteren sollten nun die molekularen Ursachen der unterschiedlichen EMMPRIN-Proteine untersucht werden. Als mögliche Mechanismen, die zur Heterogenität der EMMPRIN-Isoformen beitragen könnten, kommen alternatives Spleißen der EMMPRIN-Primärtranskripte, Mutationen im *EMMPRIN*-Gen oder aber eine unterschiedliche Glykosylierung in Frage.

3.3 Untersuchung der molekularen Grundlagen der unterschiedlichen EMMPRIN-Varianten

Ellis und Mitarbeiter beschrieben erstmals die Expression von zwei EMMPRIN-Formen, der 32 kDa EMMPRIN-Form und einer 58 kDa Form den humanen LX-1 Zellen [93]. Ellis et al. gingen davon aus, dass es sich bei der kleineren Variante um ein Degradationsprodukt des EMMPRIN-Proteins handelt. Unterschiedliche Molekulargewichte der größeren EMMPRIN-Variante wurden für Zellen mit verschiedenen Ursprungsgeweben beschrieben [170]. Das Vorkommen unterschiedlicher H-Formen in Zellen des gleichen Ursprungsorgans war bis zum Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Für die weiteren Untersuchungen der EMMPRIN-Varianten wurden stellvertretend die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 verwendet. Diese erwiesen sich als repräsentativ hinsichtlich der Expression der H65-Form bzw. der H45-Form (s. Abb. 3.5).

3.3.1 Untersuchungen zu EMMPRIN-Gentranskripten in humanen Mammakarzinomzelllinien

Um zu untersuchen, ob die Heterogenität der EMMPRIN-Moleküle auf alternativem Spleißen der Primärtranskripte beruhen könnte, wurde eine RT-PCR-Analyse der mRNA der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 durchgeführt. Hierzu wurde aus den Zelllinien Gesamt-RNA isoliert und aus 3 µg RNA mit Hilfe von Oligo(dT)-Primern cDNA synthetisiert (s. 2.3.10). Die erhaltene cDNA wurde anschließend mit verschiedenen Primern zur Detektion von Spleißvarianten mittels PCR-Reaktionen amplifiziert.

Abb. 3.7 A gibt eine Übersicht über die bekannten humanen EMMPRIN-Isoformen und enthält zusätzlich die jeweiligen Primer, die zum Nachweis der EMMPRIN-Gentranskripte verwendet wurden. Die Isoform 2 kodiert für das als EMMPRIN bekannte Protein, die Gen-Produkte der Isoformen 1, 3 und 4 sind bisher gar nicht oder wenig

untersucht [171]. Die Isoform 2 besteht aus acht Exons, die Gesamtlänge dieser mRNA beträgt 1676 bp. Für die Amplifikation der Isoform 2 wurden die Primer E1 und E2 ausgewählt, das so entstehende Ampilifikat hat eine Länge von 881 bp und enthält den gesamten kodierenden Bereich. Zusätzlich werden durch die Primer Restriktionsschnittstellen für EcoR I am 5'- und 3'-Ende angefügt, die eine Klonierung des Transkriptes in den Vektor pIRES-N1 ermöglichen sollen. Wie die Abb. 3.7 B zeigt, wird in den beiden Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 die Isoform 2 exprimiert.

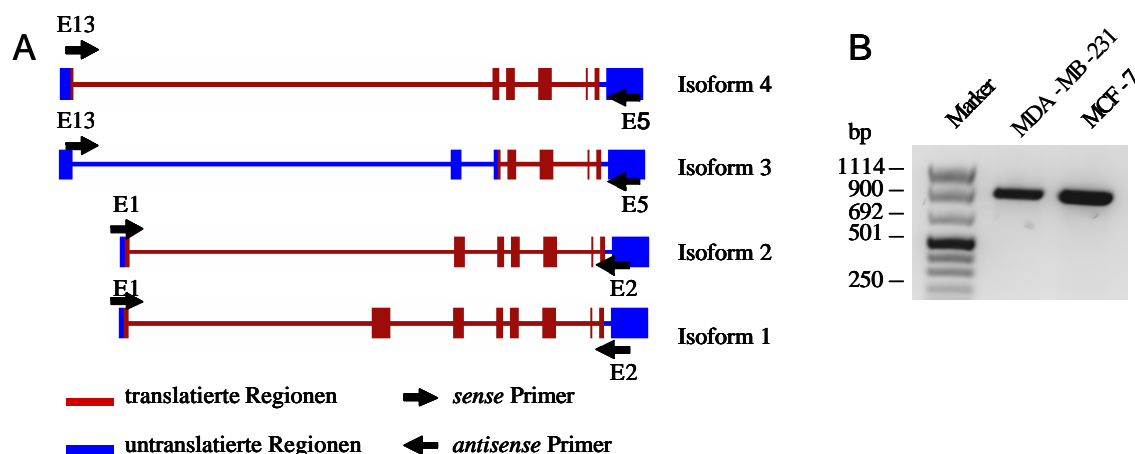


Abb. 3.7: EMMPRIN-Isoformen. (A) Schematische Darstellung der bekannten EMMPRIN-Spleißvarianten und der zum Nachweis verwendeten Primer. (B) Untersuchung der EMMPRIN-Gentranskripte in humanen Mammakarzinomzelllinien mittels RT-PCR. Gesamt-RNA der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurde mit Oligo(dT)-Primern revers transkribiert und die cDNA mittels der Primer E1 und E2 amplifiziert

Es konnten keine weiteren Fragmente nachgewiesen werden, die auf die Existenz der Isoform 1 oder anderer Spleißvarianten hinweisen. Die PCR-Reaktionen mit den Primer E13 und E5 zur Detektion der Isoformen 3 und 4 ergab kein Produkt, es muss somit davon ausgegangen werden, dass diese Spleißvarianten nicht von MCF-7 oder MDA-MB-231 Zellen exprimiert werden.

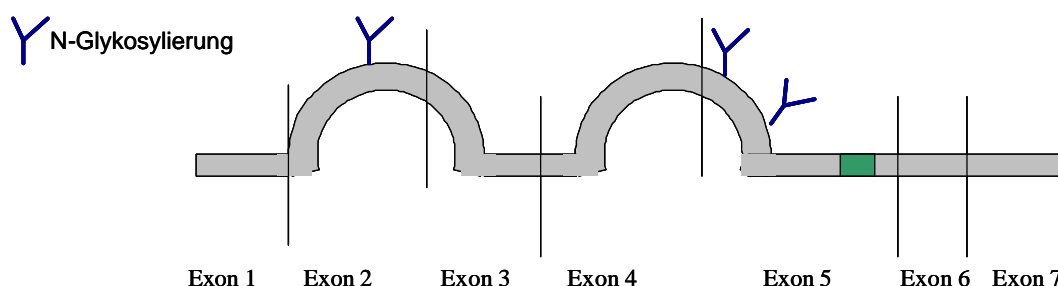
Im Weiteren sollte nun untersucht werden, ob es Unterschiede in den Sequenzen der EMMPRIN cDNAs in MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen gibt. Für die Sequenzierreaktionen wurden die cDNAs über die mit den Primern E1 und E5 eingefügten EcoR I-Schnittstellen in den Vektor pIRES-N1 kloniert. Die Sequenzierreaktionen wurden mit den Primern E1 und E5 durchgeführt. Ein Vergleich der Sequenzen zeigt eine 100% - ige Übereinstimmung zwischen den EMMPRIN cDNAs aus MCF-7 Zellen und MDA-MB-231 Zellen.

Somit lässt sich sagen, dass die mittels Westernblot-Analyse detektierten unterschiedlichen EMMPRIN-Proteine in den Mammakarzinomzelllinien nicht durch

alternatives Spleißen der EMMPRIN-Primärtranskripte oder durch Sequenzabweichungen (Mutationen oder SNPs („Single Nucleotide Polymorphism“)) entstehen.

3.3.2 Untersuchungen zur Glykosylierung von EMMPRIN

Kohlenhydrate sind entweder über O-glykosidische Bindungen mit dem Sauerstoffatom der Seitenkette von Serin- oder Threoninresten oder über eine N-glykosidische Bindung mit der freien Aminogruppe des Asparagins verbunden. Voraussetzung für eine N-glykosidische Bindung ist, dass folgende Aminosäuresequenz-Motive im Protein vorliegen: Asn-X-Thr oder Asn-X-Ser, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht, außer für Prolin und Asparagin. Mit Hilfe des Programms NetNGly 1.0 (www.cbs.dtu.dk) kann man anhand der Proteinsequenz bestimmen, welche Aminosäuren eine N-Glykosylierungsstelle darstellen könnten. Für O-glykosidische Bindungen existiert eine vergleichbare Konsensus-Sequenz nicht. Die Abb. 3.8 zeigt den schematischen Aufbau des EMMPRIN-Proteins mit den drei theoretischen N-Glykosylierungspositionen.



```

MAAALFVLLGFALLGTHGASGAAGTVFTTVEDLGSKILLTCSLNDSATEVTGHRWLKGGVVLKEDALPGQ
KTEFKVDSDDQWGEYSCVFLPEPMGTANIQLHGPPRVKAVKSSEHINEGETAMLVCKSESVPPVTDWAW
YKITDSEDKALMNGSESRFFVSSSQGRSELHIENLNMEADPGQYRCNGTSSKGSQQAITLVRSHLAALW
PFLGIVAEVLVLVTIIFIYEKRRKPEDVLDDDDPAGSAPLKSSGQHQNDKGKNVRQRNSS
  
```

Abb. 3.8: Schematischer Aufbau des EMMPRIN-Proteins. Die Positionen der theoretischen N-Glykosylierungspositionen sind blau markiert. Die Transmembranregion ist grün dargestellt. Loops stellen Ig-Domänen dar. In der unter dem Bild angegebenen Aminosäuresequenz ist das Ende jedes Exons durch einen Strich markiert und die Aminosäuren der Ig-Domänen wurden unterstrichen.

Um festzustellen, ob die EMMPRIN-Varianten durch unterschiedliche N-Glykosylierung zu erklären sind oder ob es auch O-glykosidisch gebundene Kohlenhydrate gibt, wurden die Zelllinien zur ersten Analyse mit Tunikamycin behandelt.

3.3.2.1 Tunikamycinbehandlung von humanen Mammakarzinomzelllinien

Das Nucleosidantibiotika Tunikamycin blockiert die Anheftung von N-Acetylglucosamin an Dolicholphosphat, den ersten Schritt der N-Glykosylierung. Aufgrund dieser Eigenschaft wird Tunikamycin zur Analyse von N-Glykosylierungspositionen eingesetzt. Da Tunikamycin auf jeden Zelltyp unterschiedlich toxisch wirkt, wurden verschiedene Konzentrationen im Bereich von 0,1-10 μg Tunikamycin/ml Medium an den beiden repräsentativen Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 ausgetestet. Als Negativkontrolle wurde die gleiche Anzahl an Zellen ohne Tunikamycin kultiviert. Da die Tunikamycin-Stocklösung DMSO enthält, wurden als zusätzliche Kontrolle Zellen mit der entsprechenden Menge DMSO im Medium inkubiert. Die Behandlung der Zellen erfolgte für 24 h. Im Anschluss daran wurden die Proteine mit NP-40 Lysispuffer extrahiert und die Veränderungen des EMMPRIN-Proteins mittels Westernblot-Analyse detektiert.

Die höchste Dosis Tunikamycin, die nicht zu einem Absterben der Zellen führte, lag bei den MDA-MB-231 Zellen bei 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, die MCF-7 Zellen zeigten dagegen auch bei 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tunikamycin nach 24 h keinen Zelltod. Die Behandlung mit der entsprechenden Menge DMSO (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Medium bzw. 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Medium) übte keinen Einfluss auf die Zellvitalität aus. Die geringste Konzentration an Tunikamycin im Medium, bei der noch ein Einfluss auf die Glykosylierung von EMMPRIN in der Westernblot-Analyse nachzuweisen war, lag bei den MCF-7 Zellen bei 0,63 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und bei den MDA-MB-231 Zellen bei 0,16 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In Abb. 3.9 sind die Ergebnisse der Tunikamycin-Behandlung dargestellt.

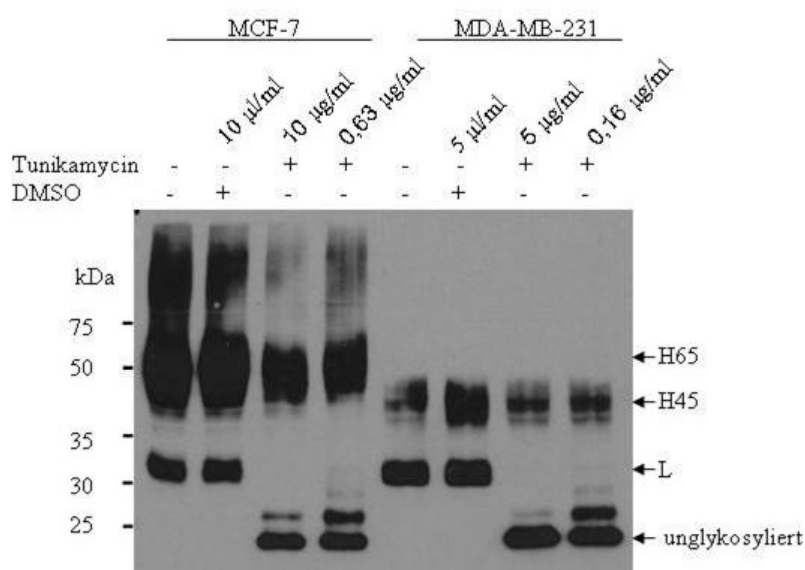


Abb. 3.9: Einfluss von Tunikamycin auf die EMMPRIN-Varianten in MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen. Die Zelllinien wurden mit der angegebenen Konzentration Tunikamycin oder DMSO für 24 h behandelt. Die Westernblot-Analyse erfolgte mit dem Antikörper HIM6 (1:4000 Verdünnung).

Wie der Westernblot zeigt, hatte die Behandlung der Zellen mit DMSO keinen Einfluss auf die Expression des EMMPRIN-Proteins in den Zelllinien. Die Behandlung der MCF-7 Zellen mit 0,63 µg/ml oder 10 µg/ml Tunikamycin führte zu einer dosis-abhängigen Verringerung der H-Form, zu einem vollständigem Verschwinden der L-Form und zur Entstehung dreier neuer Banden mit Molekulargewichten von ~ 24 kDa, ~27 kDa und 30 kDa. Identische Ergebnisse wurden für MDA-MB-231 Zellen erhalten. Die Entstehung eines solchen Bandenmusters ist ein typisches Ergebnis einer Tunikamycinbehandlung, jede neue Bande zeigt dabei eine N-Glykosylierungsposition an. Demnach lässt sich das Ergebnis wie folgt interpretieren: Das Gewicht des kleinsten EMMPRIN-Proteins (~ 24 kDa) entspricht dem theoretischen Gewicht des „nackten“, d.h. nicht mit Kohlenhydraten dekorierten EMMPRIN-Proteins. Durch die Glykosylierung jeweils einer Position wächst das Protein um jeweils ca. 2-3 kDa auf 27, 30 bzw. 32 kDa. Durch die vollständige Glykosylierung aller drei Positionen entsteht somit die L-Form von EMMPRIN mit einem Molekulargewicht von 32 kDa.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die 32 kDa-Form von EMMPRIN somit sowohl in den MCF-7 Zellen wie auch in den MDA-MB-231 Zellen an allen drei N-Glykosylierungspositionen glykosyliert ist. Auch die H45- und die H65-Formen sind N-glykosyliert, da eine Tunikamycinbehandlung zu einer Reduktion der H-Formen führt. Ob die größeren EMMPRIN-Proteine auch O-glykosidisch gebundene Zucker enthalten, lässt sich aufgrund der bisherigen Ergebnisse nicht ausschließen. Zur weiteren Analyse der Art der glykosidischen Bindung in den H-Formen wurde deshalb eine N-Glykosidase F Behandlung der EMMPRIN-Proteine durchgeführt.

3.3.2.2 N-Glykosidase F Behandlung von EMMPRIN in humanen Mammakarzinomzelllinien

N-Glykosidase F ist eine Glykoamidase, die die Verbindung zwischen dem Asparagin-Rest des Proteins und der N-Acetylglucosamin-Gruppe, die die Verbindung zwischen Kohlenhydrat und Protein herstellt, trennt. Da das Enzym nahezu alle bekannten N-glykosidisch gebundenen Kohlenhydrate freisetzt, auch tetra- und pentamerverzweigte Ketten, ist es das bevorzugte Enzym zur vollständigen Entfernung von N-Glykosylierungen.

Für die Behandlung mit N-Glykosidase F wurden die EMMPRIN-Proteine durch eine vorhergehende Immunpräzipitation mit dem EMMPRIN-spezifischen Antikörper HIM6 angereichert. Von jeder Immunpräzipitation wurde eine Hälfte für 2 h mit N-

Glykosidase F bei 37°C inkubiert, die andere Hälfte wurde zur Kontrolle ohne Enzym bei 37°C inkubiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.10 dokumentiert.

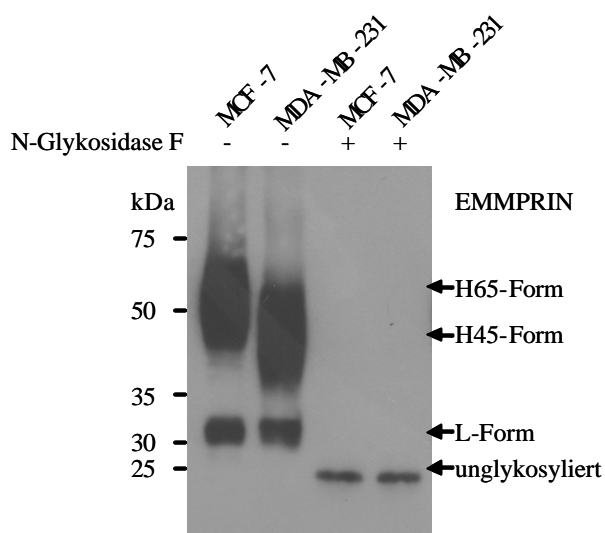


Abb. 3.10: N-Glycosidase F Behandlung der EMMPRIN-Proteine führte zur vollständigen Deglykosylierung. Von den angegebenen Zelllinien wurden mit Triton X-100 Lysispuffer Lysate hergestellt. Die Proteine wurden anschließend zur Immunpräzipitation mit dem EMMPRIN-Antikörper HIM6 verwendet. Jeweils die Hälfte der Immunpräzipitation wurde mit N-Glykosidase F inkubiert, die andere Hälfte wurde zur Kontrolle ohne Enzym inkubiert. Die Westernblot-Analyse wurde mit dem EMMPRIN-Antikörper HIM6 durchgeführt.

Wie die Westernblot-Analyse zeigt, wurden durch den Verdau der EMMPRIN-Proteine mit N-Glykosidase F nicht nur die L-Proteine, sondern auch die H65-Form aus den MCF-7 Zellen und die H45-Form aus den MDA-MB-231 Zellen vollständig deglykosyliert. Nach der N-Glykosidase F Behandlung lag in beiden Ansätzen nur noch das „nackte“ EMMPRIN-Protein von ~24 kDa vor. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass EMMPRIN keine O-glykosidisch gebundenen Kohlenhydrate trägt.

3.3.2.3 Nachweis von β 1,6 verzweigten Poly-laktosaminen im EMMPRIN-Molekül

Tang und Mitarbeiter konnten in ihrer jüngsten Studie zeigen, dass die Kohlenhydratstruktur der EMMPRIN H-Form aus HT1080 Zellen im Gegensatz zur L-Form β 1,6 verzweigte Poly-laktosamine enthält [108]. Für diese Zuckerstruktur ist ein positiver Einfluss auf Tumorprogression beschrieben [172, 173]. Da in der Arbeit von Tang et al. nur die H-Form aus HT1080 Zellen untersucht wurde, stellt sich die Frage, ob beide H-Formen aus den Mammakarzinomzelllinien β 1,6 verzweigte Poly-laktosamine enthalten.

Die Bindung des Lektins L-PHA ist indikativ für β 1,6 verzweigte Poly-laktosamine [174]. Für die Untersuchungen der H-Formen wurden wie unter 2.7.3 beschrieben Zelllysate der MCF-7 Zellen und der MDA-MB-231 Zellen mit Brij96-Lysispuffer hergestellt. Die Proteine wurden dann zur Präzipitation mit Agarose gekoppeltem L-PHA verwendet. Der Nachweis gebundener EMMPRIN-Proteine erfolgte mittels Westernblot-

Analyse. Abb. 3.11 zeigt im Vergleich die EMMPRIN-Proteine in den Gesamtzelllysaten der beiden Zelllinien und die EMMPRIN-Proteine, die mit L-PHA-Agarose aus den Lysaten präzipitiert wurden.

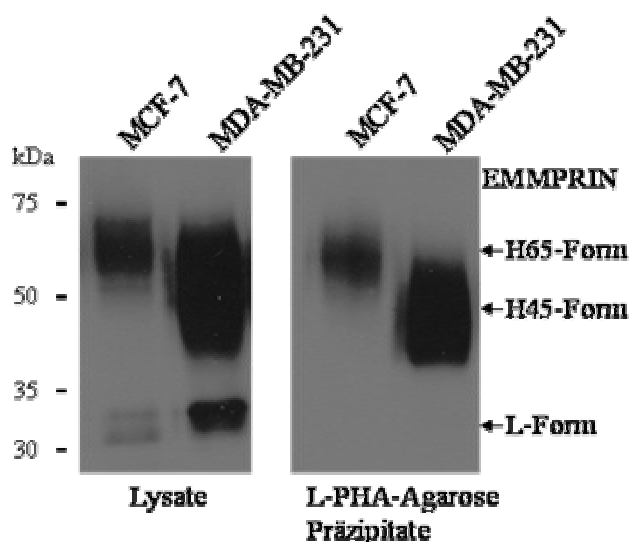


Abb. 3.11: Bindung der EMMPRIN-Proteine an PHA-L. Von den angegebenen Zelllinien wurden mit 1% Brij96 Detergenz Zelllysate hergestellt und die Proteine zur Präzipitation mit dem direkt an Agarose gekoppelten Lektin PHA-L verwendet. Die gebundenen Proteine wurden mittels Westernblot-Analyse mit dem EMMPRIN-Antikörper HIM6 untersucht.

Gebunden wurden beide EMMPRIN H-Formen im Gegensatz zur L-Form. Da nur spezifisch die H-Formen präzipitiert wurden, kann eine unspezifische Bindung der EMMPRIN-Proteine an die Agarose-Beads ausgeschlossen werden. Zur Kontrolle von unspezifisch gebundenen Proteinen wurde auch eine Inkubation der Lysate mit Agarose-Beads ohne Lektin durchgeführt. Die Westernblot-Analysen zeigten auch für diese Versuche keine an die Agarose-Beads gebundenen EMMPRIN-Proteine (Daten nicht gezeigt). Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass sowohl die H45-Form aus den MDA-MB-231 Zellen wie auch die H65-Form aus den MCF-7 Zellen, aber keine der jeweiligen L-Formen β 1,6 verzweigte Polylaktosamine enthalten.

3.3.2.4 Nachweis von Lewis^X-Strukturen an der H65 EMMPRIN-Variante

Zur weiteren Untersuchung der Kohlenhydratstruktur der verschiedenen EMMPRIN-Proteine wurden drei Kohlenhydrat-spezifische Antikörper verwendet. Die Antikörper wurden freundlicherweise von Dr. Kleene (ZMNH, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um aus der Ratte stammende monoklonale Antikörper gegen die Antigene HNK-1, L3 und L5 [145, 146, 175]. Das HNK-1 Antigen ist eine sulfatierte Glucuronsäure, die als Ligand für Laminin und Selektine identifiziert wurde [163], der

Antikörper L3 erkennt Oligomannose-Strukturen und der Antikörper gegen L5 bindet spezifisch nicht sialysierte Lewis^X-Strukturen

Für die Untersuchungen wurde EMMPRIN aus den repräsentativen Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 mittels Immunpräzipitationen mit dem EMMPRIN-spezifischen Antikörper HIM6 angereichert. Als Negativ-Kontrolle wurden auch Immunpräzipitationen mit dem MOPC21 Antikörper durchgeführt. Dieser Antikörper gehört, wie der HIM6 Antikörper, zur IgG1 Subklasse. Er detektiert kein bekanntes Antigen im humanen oder murinen System und ist daher eine weitverbreitete Isotypkontrolle für Immunpräzipitationen und immunhistochemische Anwendungen. Die Proteine wurden in der Westernblot-Analyse hinsichtlich der geladenen Mengen an EMMPRIN und der Bindung Kohlenhydrat-spezifischer Antikörper untersucht. Während die Antikörper gegen HNK-1 und L3 keinerlei Reaktivität mit EMMPRIN zeigten (Daten nicht gezeigt), detektierte der gegen Lewis^X-Strukturen gerichtete Antikörper L5 spezifisch nur die aus den MCF-7 Zellen isolierte H65-Form (Abb. 3.12).

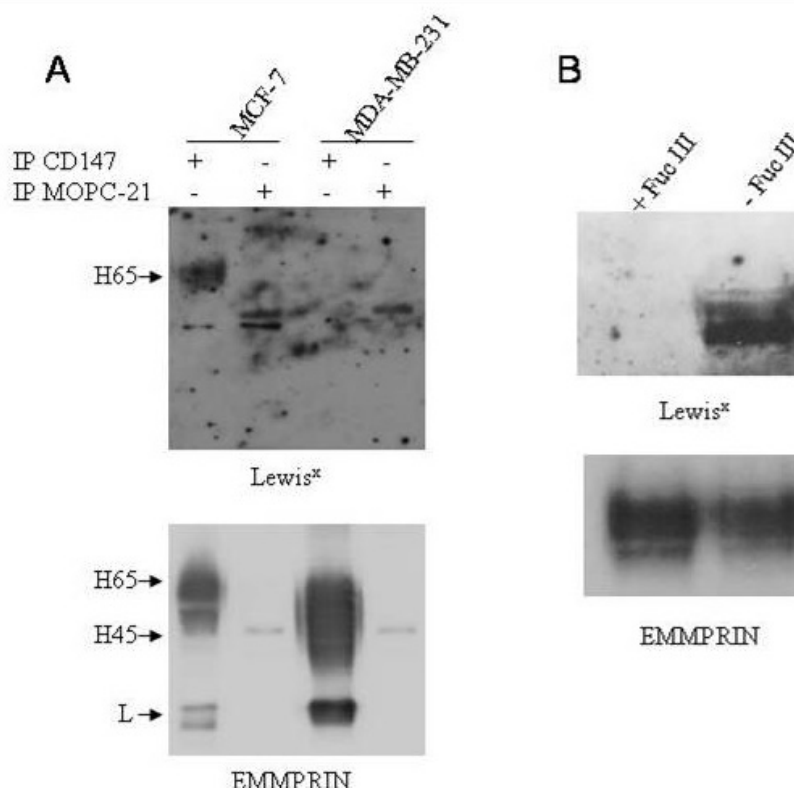


Abb. 3.12: Reaktivität von EMMPRIN mit Lewis^X Antikörper L5. (A) Die angegebenen Zelllinien wurden mit 1% Triton X-100 lysiert. EMMPRIN- and MOPC21-Immunpräzipitationen wurden mit den Antikörpern Anti-Lewis^X L5 in der Verdünnung 1:100 (oberer Blot) im Westernblot analysiert. Der gleiche Blot wurde „gestrippt“ und mit dem EMMPRIN-spezifischen Antikörper HIM6 inkubiert (unterer Blot). (B) MCF-7 Zellen wurden mit Triton X-100 Lysispuffer lysiert. EMMPRIN wurde mit dem Antikörper HIM6 immunpräzipitiert und wie angegeben mit a(1-3,4)-spezifische Fucosidase III aus *Xanthomonas sp* behandelt. Lewis^X-Epitope wurden durch Inkubation des Blots mit dem Antikörper L5 (Verdünnung 1:100) nachgewiesen (oberer Blot). Der gleiche Blot wurde „gestrippt“ und mit dem EMMPRIN-spezifischen Antikörper HIM6 inkubiert (unterer Blot).

Zusätzlich sind in der Westernblot-Analyse Banden von ca. 50 kDa in den Spuren der Isotypkontroll-Versuche detektiert worden (Abb.3.12 A). Da diese Banden unabhängig vom primären Antikörper erscheinen, wird es sich um die schwere Kette des MOPC21 Antikörpers handeln, die im Westernblot von dem Sekundärantikörper erkannt wird. Anscheinend zerfällt der MOPC21 Antikörper im Gegensatz zu dem EMMPRIN-spezifischen HIM6 Antikörper trotz der Verwendung von nicht-reduzierendem Probenpuffer teilweise in seine Einzelketten.

Zur Verifizierung des nachgewiesenen Lewis^X-Epitops wurde eine zusätzliche Glykosidasebehandlung der aus MCF-7 Zellen immunpräzipitierten EMMPRIN-Proteine durchgeführt. Es wurde hierfür die $\alpha(1-3,4)$ -spezifische Fucosidase III aus *Xanthomonas sp.*, die spezifisch $\alpha 1-3$ und $\alpha 1-4$ gebundene Fucosen abspaltet, verwendet (s. Abb. 3.13).

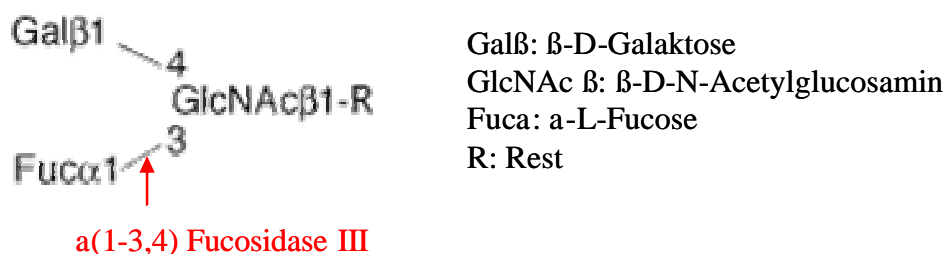


Abb. 3.13: Lewis^X-Struktur und Aktivität der $\alpha(1-3,4)$ Fucosidase III

Durch die Abtrennung der Fucose von dem Lewis^X-Trisaccharid sollte die Bindung des Antikörpers L5 inhibiert und damit seine Spezifität kontrolliert werden. Die immunpräzipitierten EMMPRIN-Proteine wurden wie unter 2.7.2 beschrieben mit Fucosidase behandelt. Eine anschließende Westernblot-Analyse zeigte, dass durch die Glykosidasebehandlung die Bindung des L5 Antikörpers an EMMPRIN vollständig unterdrückt wurde (Abb. 3.12 B).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die nachgewiesenen Unterschiede in den Molekulargewichten der hochmolekularen EMMPRIN-Proteine in humanen Mammakarzinomzellen zum Teil auf die Anwesenheit oder Abwesenheit von Lewis^X-Strukturen zurückzuführen sind.

3.2.2 Vergleich der Expression von EMMPRIN mit der Caveolin-Expression

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die Unterschiede zwischen den EMMPRIN-Formen durch differenzielle Glykosylierung entstehen. Wie die unterschiedliche Glykosylierung reguliert wird ist nicht bekannt. Zeitgleich zu meinen Untersuchungen veröffentlichten Tang und Mitarbeiter die erste Arbeit, die die Unterschiede zwischen der L-Form und der H-Form untersuchte. Tang und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Caveolin durch die Bindung der EMMPRIN L-Form die Entstehung der EMMPRIN H-Form hemmt. Caveoline sind eine kleine Familie von Membranproteinen, welche die Hauptkomponenten der sog. Caveolae bilden, Omega-förmige Einstülpungen der Zytoplasmamembran, die in allen Säugerzellen vorkommen. Innerhalb dieser Strukturen bilden die Caveoline eine Art „Steuer-Gerüst“ für Signalmoleküle [106, 181]. Für das 22 kDa Membranprotein Caveolin wurden in verschiedenen Studien Tumorsupressor-Eigenschaften beschrieben [168, 169]. Tang und Mitarbeiter zeigten diese Ergebnisse anhand von HK293-Zellen und A431-Zellen. Durch eine Analyse der Caveolin-Expression in dem Kollektiv der Mammakarzinomzelllinien sollte hier nun untersucht werden, ob es eine Korrelation zwischen der Expression der verschiedenen EMMPRIN-Formen und der Expression von Caveolin gibt (Abb. 3.14).

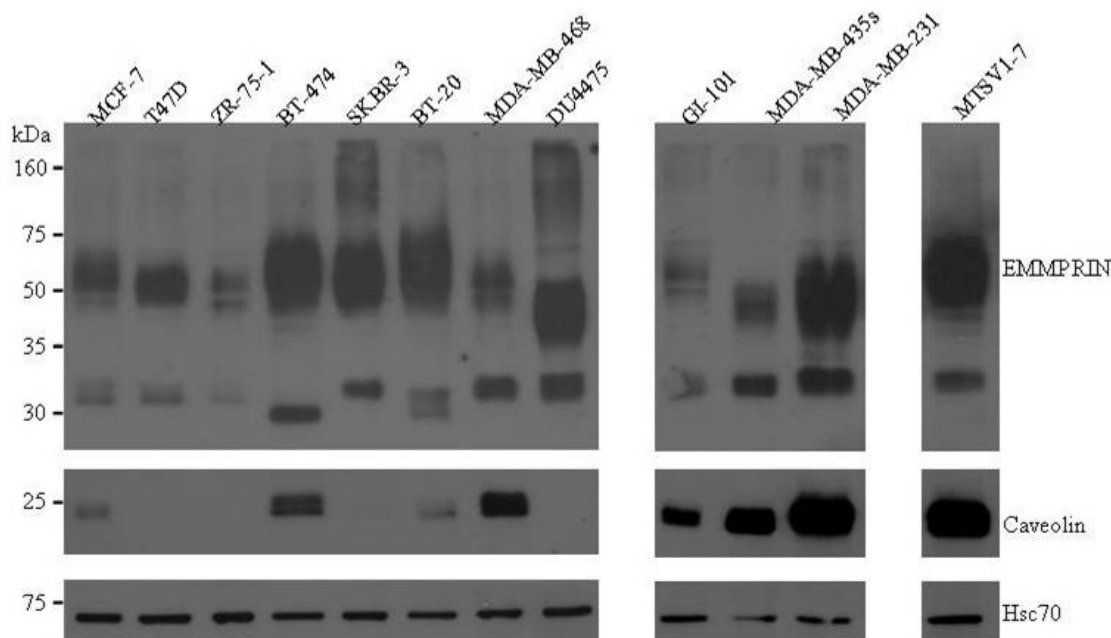


Abb. 3.14: Vergleich der EMMPRIN-Varianten-Expression und der Caveolin-Expression. Jeweils 25 µg Protein der lysierten Mammakarzinomzelllinien wurden pro Bahn aufgetragen und im 12% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis der EMMPRIN-Proteine im Immunoblot erfolgte mit dem EMMPRIN-Antikörper HIM6 (1: 4000 Verdünnung), der gleiche Blot wurde „gestrippt“ und Caveolin (Antikörper pAb; 1:1000 Verdünnung) und HSC70 (Antikörper B6; 1: 1x10⁶ Verdünnung) detektiert.

Für die Entstehung der H45-Form und der H65-Form konnte kein Zusammenhang zur Caveolin-Expression beobachtet werden. Die H45- exprimierenden Zelllinien zeigten keine auffällig hohe oder niedrige Caveolin-Expression im Vergleich zu den H65-Form exprimierenden Zellen. Auch für das Auftreten der ungewöhnlichen 29 kDa L-Form der BT-474 Zellen lieferte die Caveolin-Expression keine Erklärung.

3.4 Untersuchungen zur Sezernierung von EMMPRIN

3.4.1 Einfluss der Glykosylierung auf die Entstehung des sezernierten EMMPRINs

Schon 1989 wurde von Ellis und Mitarbeitern die Existenz einer löslichen EMMPRIN-Form postuliert [176]. Taylor et al. konnten zeigen, dass die lösliche Form sowohl mit einem N-terminal spezifischen EMMPRIN-Antikörper als auch mit einem gegen den C-Terminus gerichteten Antikörper nachgewiesen werden kann, und es sich somit bei dem sezernierten EMMPRIN-Protein nicht um eine durch Proteasen prozessierte Variante handelt [139].

Um zu untersuchen, ob die Art der EMMPRIN-Glykosylierung einen Einfluss auf die Entstehung der löslichen Form hat oder ob alle Varianten sezerniert werden können, wurden die Überstände der repräsentativen Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 untersucht. Die Zelllinien wurden in T25-Zellkulturflaschen bis zu einer Dichte von 90% unter Standardbedingungen kultiviert und 24 h mit 3 ml serumfreiem Medium inkubiert. Jeweils 100 µl der Überstände wurden wie unter 2.6.3 beschrieben für eine Proteinfällung verwendet. Die präzipitierten Proteine wurden in 30 µl 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen. In der Westernblot-Analyse konnte gezeigt werden, dass sowohl die H45-Form der MCF-7 Zellen wie auch die H65-Form der MDA-MB-231 Zellen sezerniert wurden (Abb. 3.15). Die L-Form konnte weder in den Überständen der MCF-7 Zellen noch der MDA-MB-231 Zellen nachgewiesen werden.

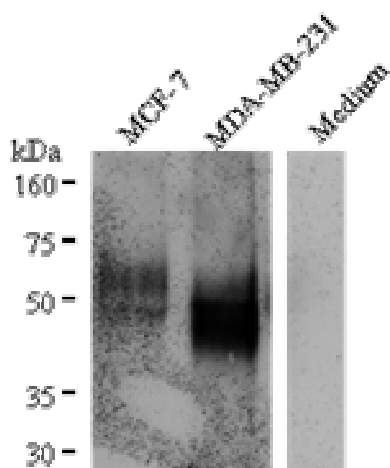


Abb. 3.15: Westernblot-Analyse des EMMPRIN-Proteins im Überstand von MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen. Jeweils 100 μ l Überstand wurden für eine Proteinfällungen verwendet, die präzipitierten Proteine wurden in 30 μ l nichtreduzierendem Probenpuffer aufgenommen und EMMPRIN in der Westernblot-Analyse mit dem Antikörper HIM6 (Verdünnung 1:200) detektiert.

Somit lässt sich feststellen, dass eine vollständige Glykosylierung des Proteins wichtig für die Sezernierung ist, es aber keinen Unterschied zwischen den H-Varianten gibt.

3.4.2 Einfluß der transmembranen Region auf die Entstehung der löslichen EMMPRIN Formen

Aufgrund der oben beschriebenen Arbeit von Taylor und Mitarbeitern stellt sich die Frage, wie EMMPRIN sezerniert wird, wenn eine Prozessierung durch Proteasen ausgeschlossen werden kann. Meine Untersuchungen der EMMPRIN-Gentranskripte (s. 3.3.1) hatten gezeigt, dass es keine Spleißvarianten in den Mammakarzinomzelllinien gibt, durch die eine lösliche EMMPRIN-Form entstehen könnte. Es muss somit einen speziellen Mechanismus für die Sezernierung geben.

Eine Besonderheit der Transmembranenregion von EMMPRIN ist die Aminosäure Glutaminsäure. Das Vorkommen von hydrophilen Aminosäuren in der eigentlich hydrophoben Transmembranregion deutet auf eine besondere Funktion hin. Es wäre denkbar, dass diese Aminosäure die Einlagerung in die Membran stört und es zu einer Sezernierung kommt oder aber, dass andere Proteine sich anlagern und eine Sezernierung vermitteln. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob die Sezernierung durch diese Aminosäure beeinflusst wird. Durch eine zielgerichtete Mutagenese wurde dafür Glutaminsäure in die hydrophobe Aminosäure Valin umgeschrieben.

3.4.2.1 Herstellung der EMMPRIN-Mutante (E218V)EMMPRIN-FLAG

Die humane EMMPRIN-cDNA wurde mittels RT-PCR aus der RNA der Zelllinie MCF-7 (Primer E1 und E5) synthetisiert. Dabei wurde die cDNA des FLAG-Peptids über den Primer E5 an das 3'-Ende der EMMPRIN-cDNA (ohne Stop-Codon) fusioniert (Abb. 3.16). Das FLAG-Peptid (Aminosäuresequenz: DYDDDDK) ermöglicht es über den FLAG-spezifischen Antikörper M2 transfizierte Zellen einfach nachzuweisen. Diese Funktion ist vor allem bei der Transfektion von humanen Zellen wichtig, um das rekombinante EMMPRIN von dem natürlich vorkommenden EMMPRIN zu unterscheiden (s. auch 3.5).

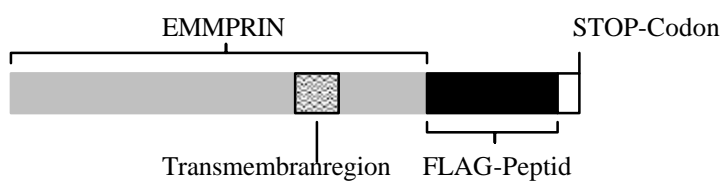


Abb.3.16: Aufbau des hergestellten EMMPRIN-FLAGs. An das humane EMMPRIN wurde C-terminal das FLAG-Peptid ligiert. Dafür wurde das ursprüngliche STOP-Codon entfernt.

Die verwendeten Primer enthielten flankierende Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym EcoR I, so konnte die cDNA über die EcoR I Schnittstelle des pBluescript II SK Vektors inkloniert werden. Die Mutagenese wurde wie unter 2.3.11 beschrieben durchgeführt. Durch die Mutageneseprimer (E6 und E7) wurde die in der Transmembranregion mit [gag] kodierte Glutaminsäure in das durch [gtg] kodierte Valin umgeschrieben. Die Transformation des Mutagenese-Ansatzes in *E. Coli* ergab 20 Klone. Es wurden acht Klone aufgearbeitet und die jeweilige Plasmid-DNA für Sequenzierreaktionen eingesetzt. Der Sequenzvergleich mit der ursprünglichen cDNA zeigte bei allen eine erfolgreiche Mutagenese. Ein Beispiel ist in Abb. 3.17 gezeigt.

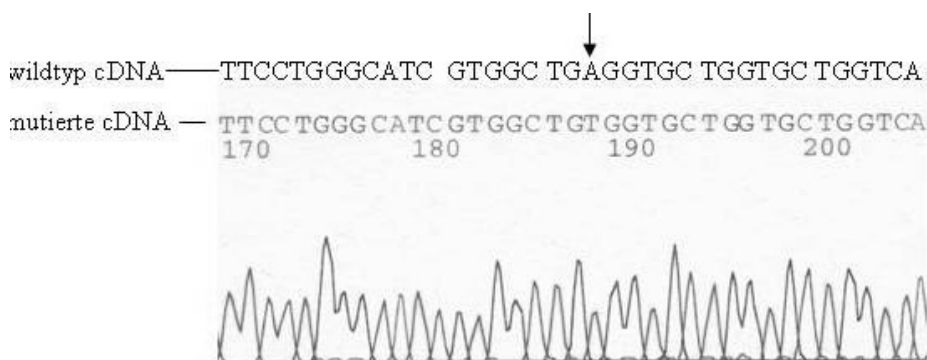


Abb. 3.17: Sequenzierung von (E218V)EMMPRIN-FLAG. Die Base 189 zeigt die eingefügte Mutation (Einbau von T statt A)

Nach der erfolgreichen Durchführung der Mutagenese wurden sowohl die cDNA für EMMPRIN-FLAG als auch für (E218V)EMMPRIN-FLAG für Transfektionsexperimente in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert.

3.4.2.2 Einfluss des Aminosäureaustausches E218V auf das lösliche EMMPRIN

Um zu untersuchen, ob der Austausch von Glutaminsäure durch Valin in der Transmembranregion die Sezernierung des EMMPRIN-Proteins beeinflusst, wurden die leicht zu transfizierenden CHO-K1 Zellen transient mit dem Expressionsplasmiden pcDNA3.1, pcDNA3.1^{EMMPRIN-FLAG} und pcDNA3.1^{(E218V)EMMPRIN-FLAG} transfiziert. Die Transfektionen wurde wie unter 2.4.1 beschrieben in T25-Zellkulturflaschen durchgeführt. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 h in 3 ml serumfreiem Medium kultiviert. Jeweils 100 µl der Überstände wurden für die Proteinfällungen verwendet. Die präzipitierten Proteine wurden in 30 µl 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für die Westernblot-Analyse mit dem EMMPRIN-spezifischen Antikörper HIM6 eingesetzt (Abb. 3.18).

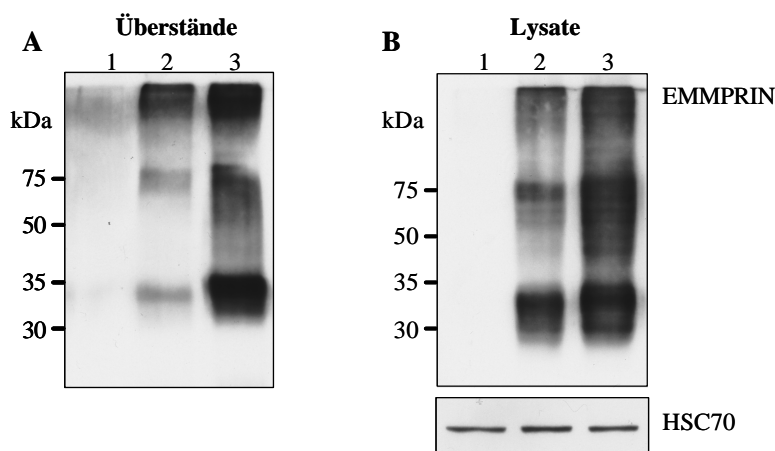


Abb. 3.18: Sowohl EMMPRIN-FLAG wie auch die Mutante (E218V)EMMPRIN-FLAG wurden von CHO-K1 Zellen sezerniert. CHO-K1 Zellen wurden transfiziert mit pcDNA3.1 (Bahn 1), pcDNA3.1EMMPRIN-FLAG (Bahn 2) und pcDNA3.1(E218V)EMMPRIN-FLAG (Bahn 3). (A) Westernblot-Analyse des EMMPRIN-Proteins im Überstand der transfizierten CHO-K1 Zellen. Jeweils 200 µl Überstand wurden für eine Proteinfällungen verwendet, die präzipitierten Proteine wurden in 30 µl nicht-reduzierenden Probenpuffer aufgenommen und EMMPRIN in der Westernblot-Analyse mit dem Antikörper HIM6 (Verdünnung 1:200) detektiert. (B) Die transfizierten Zellen wurden 48 h nach der Transfektion lysiert und EMMPRIN in der Westernblot-Analyse mit dem Antikörper HIM6 (Verdünnung 1:1000) detektiert. Der gleiche Blot wurde „gestrippt“ und HSC70 mit dem Antikörper B6 (1: 1x10⁶ Verdünnung) detektiert.

Parallel wurden auch Lysate der transfizierten Zellen in der Westernblot-Analyse untersucht. Wie in der Abb. 3.18 zu sehen ist, weisen die mit dem Wildtyp-EMMPRIN transfizierten CHO-K1-Zellen eine schwächere Expression des Konstruktes auf. Dieses

Phänomen zeigte sich auch nach Transfektion der Konstrukte in COS-Zellen. Hinsichtlich der Sezernierung zeigen die Ergebnisse, dass sowohl das Wildtyp-EMMPRIN als auch das (E218V)EMMPRIN sezerniert wurden, allerdings war im Unterschied zu den Analysen mit dem nativen EMMPRIN (s. 3.4.1) auch die L-Form im Überstand nachzuweisen. In diesen Modell-Zelllinien hatte somit der Aminosäure-Austausch keinen Einfluss auf die Sezernierung von EMMPRIN.

3.5 Etablierung von EMMPRIN-FLAG exprimierenden Mammakarzinomzelllinien

In weiteren Studien sollte analysiert werden, ob EMMPRIN kausal an der Proliferation, Invasion und Metastasierung humaner Mammakarzinomzellen beteiligt ist. Speziell sollte untersucht werden, ob die unter 3.3 identifizierten verschiedenen Glykosylierungs-Varianten von EMMPRIN sich hier in ihrer Funktion unterscheiden. Für diese Untersuchungen sollten zwei repräsentative Mammakarzinomzelllinien mit einer C-terminal FLAG-getaggen EMMPRIN cDNA transfiziert werden. Das FLAG-Peptid ermöglicht es nicht nur über den FLAG-spezifischen Antikörper M2 transfizierte Zellen einfach nachzuweisen, es eröffnet außerdem die Möglichkeit größere Mengen des Fusionsproteins über kommerziell erhältliche Säulen aufzureinigen.

Kriterien für die Wahl der zu transfizierenden Zelllinien waren eine niedrige EMMPRIN-Expression und eine differenzielle Expression der H45-Form und der H65-Form. Zelllinien, die diese Bedingungen erfüllten, waren die MDA-MB-468 Zellen (H65-Form exprimierend) und die MDA-MB-435S Zellen (H45-Form exprimierend).

3.5.1 Herstellung des EMMPRIN-FLAG-Expressionsplasmids

Für die stabile Transfektion der Mammakarzinomzelllinien wurde die EMMPRIN-FLAG-cDNA in den bizistronische Vektor pIRES-N1 kloniert (s. Abb. 3.19). Unter der Kontrolle des starken CMV-Promotors sollte eine hohe Expression des Fusionsproteins gewährleistet werden. Des Weiteren sollte durch die IRES (Internal Ribosomal Entry Site)-Sequence vor dem Neomycin-Resistenzgen (Neo^R) eine „Cap“-unabhängige Initiation der Translation

ermöglicht werden, wodurch die Selektion stabil transfizierter Zellen mit dem Antibiotikum Geneticin (G418-Sulphat) erleichtert werden sollte.

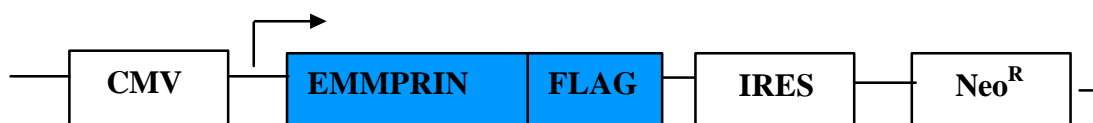


Abb. 3.19: Expressionsplasmid für das EMMPRIN-FLAG Fusionsprotein

Die unter 3.4.2 beschriebene EMMPRIN-FLAG-cDNA wurde über die EcoR I Schnittstellen in den pIRES-N1 Vektors inkloniert. Die Orientierung des Inserts wurde durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym Sca I überprüft. Um auszuschließen dass die cDNA Mutationen enthielt, wurde das Insert vollständig sequenziert. Es konnten keine Mutationen festgestellt werden. Im Weiteren wird der Vektor als pIRES-N1^{EMMPRIN-FLAG} bezeichnet.

3.5.2 Nachweis der Expression von EMMPRIN-FLAG

Um zu überprüfen, ob der Vektor pIRES-N1^{EMMPRIN-FLAG} funktionell ist, wurde in Vorversuchen die leicht zu transfizierende HeLa-Zellen transient mit dem Expressionsplasmid transfiziert. Die Transfektion wurde mit LipofectamineTM2000 wie unter 2.4.1 beschrieben durchgeführt. 48 h nach der Transfektion konnte im Westernblot die EMMPRIN-FLAG-Expression nachgewiesen werden (s. Abb. 3.20 A). Mit dem FLAG-spezifischen Antikörper M2 ließ sich das Protein auch immunzytochemisch in HeLa-Zellen detektieren, dazu wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion auf Glasplättchen in 24-Well-Platten ausgesät und nach weiteren 24 h mit dem FLAG-spezifischen Antikörper M2 immunzytochemisch gefärbt (s. Abb. 3.20 B).

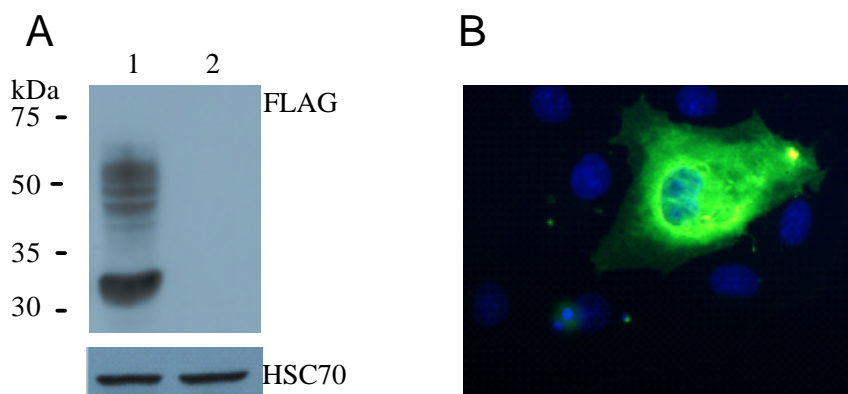


Abb. 3.20: Expression des EMMPRIN-FLAG Fusionsproteins in HeLa-Zellen. (A) 25 μ g Protein der transfizierten HeLa-Zellen wurden in einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Westernblot-Analyse erfolgte mit dem FLAG-spezifischen Antikörper M2 (1:1000 Verdünnung). Der gleiche Blot wurde „gestrippt“ und HSC70 mit dem Antikörper B6 (1: 1x10⁶ Verdünnung) detektiert. (B) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der pIRESEMMPRINFLAG transfizierten HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion auf Glasplättchen in 24-Well-Platten ausgesät, und nach weiteren 24 h mit dem FLAG-Antikörper M2 (1:1000 Verdünnung) inkubiert. Die Detektion des primären Antikörpers erfolgte durch den FITC-markierten anti-Maus IgG Antikörper (1:50 Verdünnung). Die Zellkerne wurden durch Inkubation mit DAPI gefärbt. Die Zellen wurden bei 400-facher Vergrößerung und 1,6 s Belichtungszeit fotografiert.

3.5.3 Stabile Transfektion von Mammakarzinomzelllinien mit dem pIRES-N1^{EMMPRIN-FLAG} Expressionsplasmids

Die humanen Brustkrebszelllinien MDA-MB-435S und MDA-MB-468 wurden mit dem Expressionsplasmid pIRES-N1^{EMMPRIN-FLAG} wie unter 2.4.2 beschrieben stabil transfiziert. Zur Herstellung der MOCK-transfizierten Kontrollzelllinien wurden die gleichen Zelllinien mit dem Vektor pIRES-N1 ohne Insert transfiziert. Von jedem Transfektionsansatz wurden 15 mit G418 selektionierte Klone isoliert und expandiert. Die resistenten Klone wurden bezüglich des zu exprimierenden Proteins mittels Westernblot, FACS-Analyse und RT-PCR untersucht.

3.5.3.1 Analyse der EMMPRIN-FLAG Expression in den transfizierten Zelllinien

Für die Westernblot-Analyse wurden jeweils 25 μ g Proteine Gesamtlisat der selektierten Klone in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf HybondECL-Nitrocellulose erfolgte der Immunoblot mit dem FLAG-spezifischen monoklonalen Antikörper M2. Als Positivkontrolle wurden parallel 25 μ g Proteinlysate einer LT β R-FLAG exprimierenden Fibroblasten-Zelllinie (etabliert von Dr. Volker Assmann, Institut für Tumorbologie) aufgetragen. Mit Hilfe dieser Westernblot-Analyse konnte weder in den mit pIRES^{EMMPRIN-FLAG} transfizierten MDA-MB-468 noch in den

MDA-MB-435S Zellen das Fusionsprotein EMMPRIN-FLAG nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle zeigte dagegen immer ein deutliches Signal (Daten nicht gezeigt). Erst durch das Auftragen von 50 μg Protein pro Probe und das Transferieren der Proteine auf PVDF-Membran, konnte die Expression des Fusionsproteins nachgewiesen werden (s. Abb. 3.21 A). Ein Vergleich der EMMPRIN-Expressionsstärke zwischen den MOCK-transfizierten Kontrollzelllinien und den pIRES-N1^{EMMPRIN-FLAG} transfizierten Zellen zeigte eine nur geringe Steigerung der Expression in einigen Klonen, andere Klone zeigten keinerlei Veränderung in der EMMPRIN-Expression (s. Abb. 3.21 B).

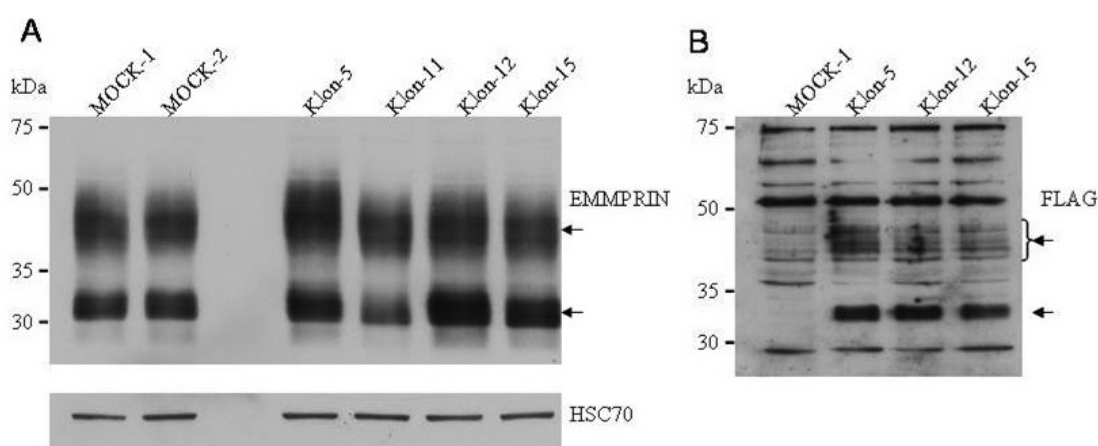


Abb. 3.21: Nachweis der EMMPRIN-FLAG-Expression in den pIRESEMMPRIN-FLAG stabil transfizierten MDA-MB-435S Klonen. Lysate der mit pIRES-N1 stabil transfizierten Zelllinie (MOCK-1, -2) und mit pIRES^{EMMPRIN-FLAG} stabil transfizierten Zelllinien (Klon-5, -11, -12, -15) wurden im Westernblot analysiert. (A) 50 μg Protein der angegebenen Zelllinien wurden in einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Immobilisierung auf PVDF-Membran erfolgte die Detektion des FLAG-Epitops mit dem Antikörper M2 (1:500 Verdünnung). (B) 25 μg Protein der angegebenen Zelllinien wurden in einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Immobilisierung auf HybondECL-Nitrocellulose erfolgte die Western-Blot-Analyse mit dem EMMPRIN-spezifischen Antikörper HIM6 (1:4000 Verdünnung). Der gleiche Blot wurde „gestrippt“ und HSC70 mit dem Antikörper B6 (1: 1x10⁶ Verdünnung) detektiert.

Der Klon 12 der Zelllinien MDA-MB-435S^{EMMPRIN-FLAG} zeigte unter den 15 expandierten Klonen die stärkste EMMPRIN-Expression. Eine densitometrische Auswertung der Expressionsstärke ergab eine 1,5-2 fache Steigerung der EMMPRIN-Expression für diesen Klon im Vergleich zu der untransfizierten Ursprungszelllinie. Auch in den Klonen der MDA-MB-468^{EMMPRIN-FLAG}-Zelllinie konnte keine deutliche Steigerung der EMMPRIN-Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde eine Analyse der EMMPRIN-Expression am Durchflusszytometer durchgeführt. Auch hier ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Ursprungszelllinien und den mit dem Expressionsvektor pIRES^{EMMPRIN-FLAG} transfizierten Klonen nachweisen (Daten nicht gezeigt).

3.5.3.2 Nachweis der Transkription des EMMPRIN-FLAG Transgens in den transfizierten Zelllinien

Um sicher zu stellen, dass die mit $\text{pIRES}^{\text{EMMPRIN-FLAG}}$ transfizierten Klonen der MDA-MB-468-Zellen und der MDA-MB-435S Zellen, das Konstrukt ins Genom integriert haben und transkribieren, wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt. Abb. 3.22 A gibt eine Übersicht der PCR-Strategie. Für die Synthese der cDNA wurde aus den Zelllinien Gesamt-RNA isoliert und mit Hilfe des genspezifischen-Primers E4 umgeschrieben (s.2.3.10). Der Primer E4 bindet die EMMPRIN cDNA in der Nähe des N-Terminus. Die erhaltene cDNA wurde anschließend mit den Primern pIRES-1 und E3 zur Detektion der EMMPRIN-FLAG cDNA mittels PCR-Reaktionen amplifiziert. Auch in den MOCK-transfizierten Kontrollzelllinien wurde die Transkription des Kontrollkonstruktes nachgewiesen. Die RNA der Zelllinien wurde hierfür mit Oligo(dT)-Primern umgeschrieben und die cDNA anschließend mit den Primern pIRES-3 und pIRES-4 amplifiziert. Die Abb. 3.22 (B, C) gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der PCR-Analysen. In allen untersuchten Zelllinien konnten die jeweiligen Transgene nachgewiesen werden.

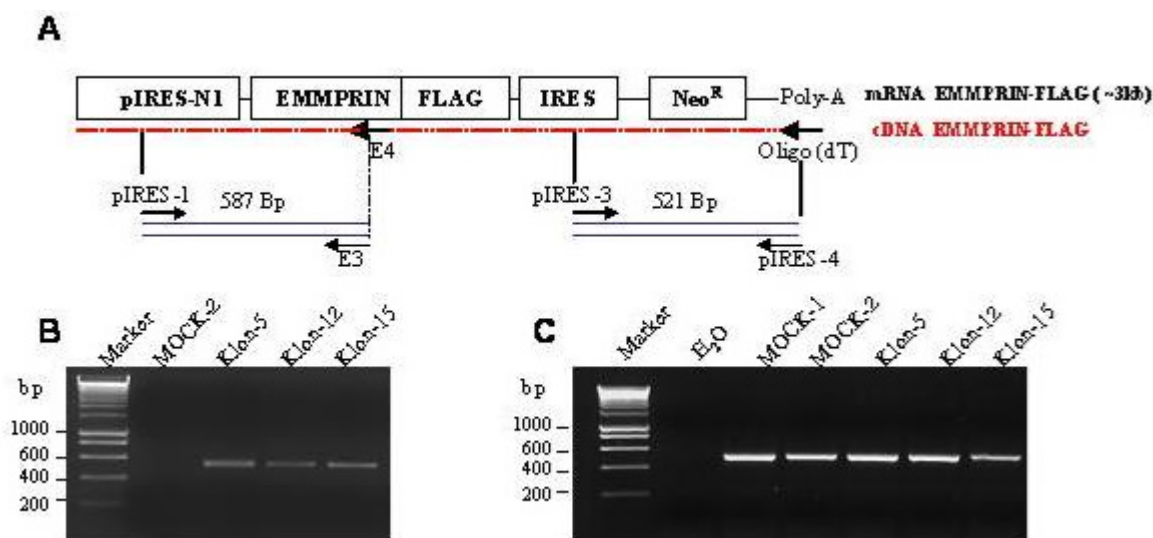


Abb. 3.22: Nachweis des EMMPRIN-FLAG-Gentranskriptes in den mit pIRESEMMPRIN-FLAG stabil transfizierten MDA-MB-435S Klonen. (A) Schematische Darstellung der EMMPRIN-FLAG mRNA. Rot eingezeichnet der Primer E4 und der Oligo(dT)-Primer für die reverse Transkription. Die Primerpaare pIRES-1 und E3 so wie pIRES-3 und pIRES-4 wurden zum Nachweis der Transkripte verwendet. (B) Gesamt-RNA der mit pIRES-N1 stabil transfizierten Zelllinie (MOCK-2) und mit $\text{pIRES}^{\text{EMMPRIN-FLAG}}$ stabil transfizierten Zelllinien (Klon-5, -12, -15) wurde mit dem genspezifischen Primer E4 revers transkribiert und die cDNA mittels der Primer pIRES-1 und E3 amplifiziert. (C) Gesamt-RNA der mit pIRES-N1 stabil transfizierten Zelllinie (MOCK-1, -2) und mit $\text{pIRES}^{\text{EMMPRIN-FLAG}}$ stabil transfizierten Zelllinien (Klon-5, -12, -15) wurde mit dem Oligo(dT)-Primer revers transkribiert und die cDNA mittels der Primer pIRES-3 und pIRES-4 amplifiziert

Die Daten zeigen, dass die stabilen Transfektionen der Zelllinien MDA-MB-435S und MDA-MB-468 mit dem Konstrukt $\text{pIRES-N1}^{\text{EMMPRIN-FLAG}}$ und dem Kontrollplasmid

pIRES-N1 methodisch erfolgreich waren. Die Transkription der eingebrachten Transgene konnte nachgewiesen werden und somit kann von einer stabilen Insertion der Plasmide in das Genom ausgegangen werden. Da aber sowohl die mit pIRES^{EMMPRIN-FLAG} transfizierten MDA-MB-468 Zellen wie auch die MDA-MB-435S keine signifikante Überexpression des EMMPRIN-Proteins zeigten, wurden keine weiteren funktionellen Studien mit den Transfektanten durchgeführt. Warum nur eine sehr schwache Expression des Fusionsproteins nachzuweisen war, lässt sich anhand der Versuche nicht erklären und bleibt zu diskutieren. Für weitere funktionelle Studien wurde nun eine Knock-down-Strategie für EMMPRIN entwickelt.

3.6 RNAi-vermittelte Herunterregulierung von EMMPRIN in humanen Mammakarzinomzelllinien

Die meisten Mammakarzinomzelllinien zeigen eine starke EMMPRIN-Expression. Die Zelllinie MDA-MB-231 ist eine der am stärksten EMMPRIN-exprimierenden Mammakarzinomzelllinien. Um die Funktion von EMMPRIN in der Tumorprogression zu untersuchen, sollte nun mittels der RNAi-Technologie die Expression von EMMPRIN in den MDA-MB-231 Zellen herunterreguliert werden. Es wurden die MDA-MB-231 Zellen ausgewählt, weil sie einerseits eine sehr hohe EMMPRIN-Expression zeigen und außerdem im Tiermodell mit immundefizienten Mäusen ein hohes metastatisches Potential besitzen [166]. Theoretisch sollte eine Reduktion der EMMPRIN-Expression zu einem weniger aggressiven Phänotyp der Zelllinie führen. Ziel war es, Zellklone mit reduzierter EMMPRIN-Expression im Vergleich zu der Ursprungszelllinie in verschiedenen funktionellen Assays zu untersuchen. Die RNAi-Technologie musste für diese Studie erst etabliert werden. Folgende Einzelschritte wurden dafür durchgeführt:

1. Optimierung der Transfektionsbedingungen für siRNA-Moleküle
 - a) durch Verwendung von Fluorescein-markierter siRNA
 - b) durch Verwendung einer validierten siRNA gegen MAPK1
2. Berechnung und Synthese von EMMPRIN-spezifischen siRNAs
3. Validierung einer geeigneten EMMPRIN-spezifischen siRNA
4. Herstellung eines EMMPRIN-spezifischen siRNA-Expressionsvektors
5. stabile Transfektion des EMMPRIN-spezifischen siRNA-Expressionsvektors in die MDA-MB-231 Zellen

3.6.1 Optimierung der Transfektionsbedingungen für siRNA

3.6.1.1 Austesten der Transfektionsbedingungen mit Fluorescein-markierter siRNA

Zu Beginn der Versuche sollte ausgetestet werden unter welchen Bedingungen eine optimale Transfektionseffizienz der MDA-MB-231 Zellen mit siRNA Molekülen zu erreichen ist. Zur Kontrolle des Transfektionserfolges wurde eine mit Fluorescein-markierte siRNA verwendet, die in humanen und murinen Zellen kein Ziel-Gen besitzt. Für die Versuche wurden die MDA-MB-231 Zellen in „Chamber Slides“ ausgesät. Es wurden für die Transfektionen verschiedene Transfektionsreagenzien (Lipofectamine, Oligofectamine, RNAiFect), siRNA Konzentrationen (200 pmol – 400 pmol) und Zelldichten (40 % - 60 % Konfluenz) wie unter 2.5.2 beschrieben, ausgetestet.

Vier Stunden nach der jeweiligen Transfektion wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Abb. 3.23 zeigt ein Beispiel für eine Transfektion mit einer hohen Effizienz.

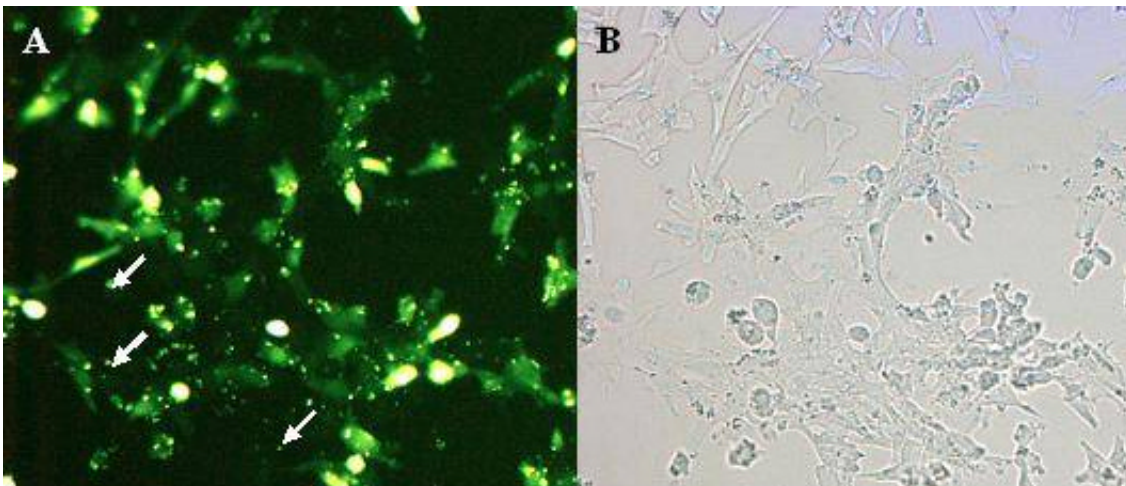


Abb. 3.23: Aufnahme Fluorescein-markierter siRNA in MDA-MB-231 Zellen. Die Analyse erfolgte 4 h nach der Transfektion (Lipofectamine, 40 % Zelldichte, 80 pmol siRNA) am Fluoreszenzmikroskop (400-fache Vergrößerung). (A) Aufnahme im Fluoreszenzkanal. Die Pfeile zeigen Transfektionskomplexe, die an Zellwänden hängen. (B) Aufnahme des gleichen Ausschnittes im Phasenkontrast.

Da die Auswertung der Transfektionseffizienz am Fluoreszenzmikroskop subjektiv sein kann, wurde die Prozentzahl transfizierter Zellen auch durchflusszytometrisch bestimmt. Die unter verschiedenen Bedingungen transfizierten Zellen wurden vier Stunden nach der Transfektion geerntet. Bei der folgenden Analyse sollten nur lebende Zellen betrachtet werden. Um lebende von toten Zellen zu unterscheiden, wurde der rote DNA-Farbstoff 7-AAD eingesetzt. Nur sterbende oder tote Zellen mit durchlässiger Membran können 7-AAD aufnehmen. In Abb. 3.24 A ist die im Fluoreszenzkanal 3 gemessene Rotfluoreszenz

der nicht mit siRNA transfizierten Kontrollzellen gegen das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) aufgetragen. Die Vorwärtsstreuung ist ein Maß für die Zellgröße. Es sind zwei Populationen zu erkennen. Die Region R1 legt die Grenze zwischen beiden Populationen fest und grenzt durch 7-AAD gefärbte stark fluoreszierende Zellen aus. Die Region R1 von der Kontrolle wurde für alle weiteren Proben übernommen, so dass nur die lebenden Zellen für die Quantifizierung Fluorescein-markierten siRNA Aufnahme analysiert wurden.

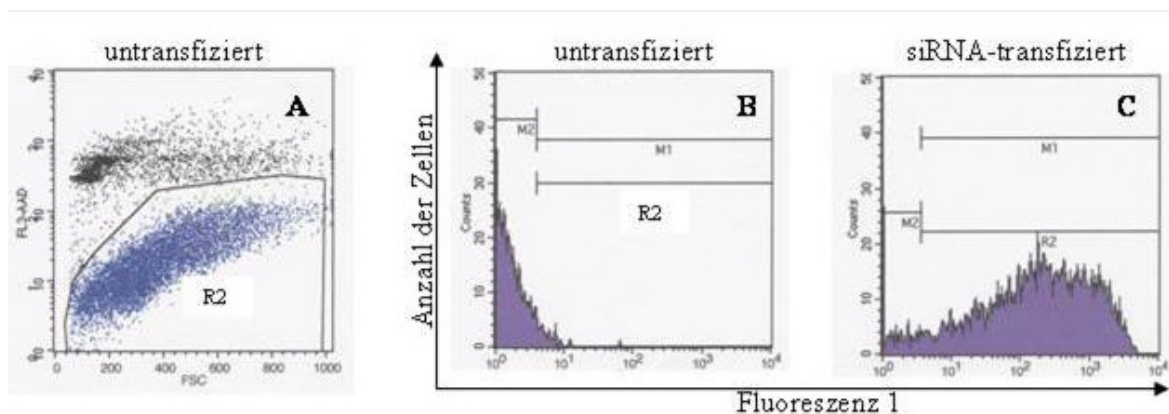


Abb. 3.24: Analyse der Aufnahme von Fluorescein-markierter siRNA in MDA-MB-231 Zellen mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden in 6-Well-Platten bei einer Dichte von 40 % mit 360 pmol siRNA mittels Lipofectamine transfiziert. Als Kontrolle wurden Zellen ohne siRNA mit Lipofektamin behandelt. (A) Die Region 1 (R1) legt die Grenze zwischen den toten durch 7-AAD gefärbten stark fluoreszierenden (Fluoreszenz 3, FL3-AAD) Zellen und den intakten lebenden Zellen fest. FSC: Forward Scatter, Vorwärtsstreuung. (B,C) Als Histogramm dargestellt die Zellzahl gegen die Fluoreszenz 1 Intensität der ohne und mit siRNA transfizierten Zellen. M1 legt die Grenze zwischen den für Fluoreszenz 1 positiven und negativen Zellen fest.

In Abb. 3.24 B und C sind jeweils im Histogramm die Zahl der lebenden ausgewerteten Zellen gegen die im Fluoreszenzkanal 1 gemessene Grünfluoreszenz aufgetragen. Die Region M1 legt die Grenze zwischen stark grün fluoreszierenden, d.h. siRNA-positiven Zellen, und siRNA-negativen Zellen fest. Sie wurde so gewählt, dass nicht mehr als 1 % der Zellen in der Kontrolle als falsch positiv klassifiziert wurden (s. Abb. 3.24 B). Abb. 3.24 C zeigt das Transfektionsergebnis mit der maximal erreichten Transfektionseffizienz. Diese Ergebnisse zeigten, dass 95 % der lebenden Zellen transfiziert waren. Unter den optimierten Bedingungen (Lipofectamine, 360 pmol siRNA, 40 % Zelldichte) wurden die EMMPRIN-spezifischen siRNAs EMMPRIN-1 und EMMPRIN-2 getestet. Nach 72 h wurden die transfizierten MDA-MB-231 Zellen im Westernblot hinsichtlich ihrer EMMPRIN-Expression analysiert. Das Ergebnis zeigte keine Reduktion der EMMPRIN-Expression (Daten nicht gezeigt).

Ein Problem bei der Arbeit mit Fluorescein-markierten siRNAs ist der schnelle Abbau des Fluoresceins in der Zelle, der eine Auswertung der Transfektion nach spätestens 8 h erfordert. Bei vielen Zellen ist nach dieser kurzen Zeit unter dem Fluoreszenzmikroskop deutlich zu sehen, dass die siRNA nicht aufgenommen wurde, sondern als Transfektionskomplex an der Zellmembran hängt (s. Abb. 3.23). In der FACS-Analyse werden diese Zellen als positives Ereignis gewertet. Somit ist die Bestimmung der Transfektionseffizienz mit Hilfe von Fluorescein-markierter siRNA nicht möglich und sinnvoll. Um ausschließen zu können, dass der Mangel „an Effekt“ auf eine zu geringe Transfektionseffizienz zurückzuführen ist, wurden für weitere Versuche zur Optimierung der Transfektionseffizienz eine von Qiagen validierte siRNA gegen die MAPK verwendet, für die eine Expressionsreduktion von bis zu 90 % in verschiedenen humanen und murinen Zelllinien beschrieben wurde.

3.6.1.2 Optimierung der Versuchsbedingungen mit einer validierten siRNA gegen MAPK1

Da die methodischen Vorversuchen nur der Validierung einer geeigneten siRNA gegen EMMPRIN dienten, wurden für die weiteren Versuche, die ebenfalls EMMPRIN-exprimierenden leicht zu transfizierenden HeLa-Zellen verwendet. Analog zu den mittels Fluorescein-markierter siRNA ausgetesteten Bedingungen wurden mit Hilfe der MAPK1-spezifischen siRNA Transfektionen durchgeführt. Die Zellen wurden entweder nach drei oder nach fünf Tagen geerntet und die Expression von MAPK1 in der Westernblot-Analyse nachgewiesen. Abb. 3.25 zeigt einige Beispiele für die Inhibierung der MAPK1-Expression durch verschiedene siRNA-Transfektionsmethoden.

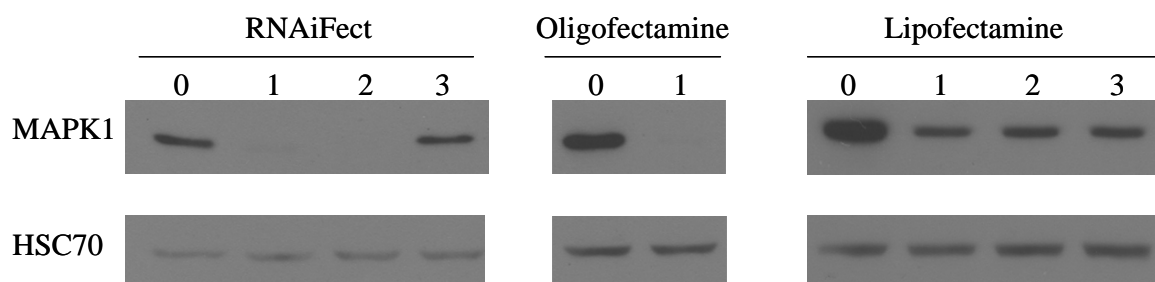


Abb. 3.25: Unter verschiedenen Bedingungen mit MAPK1-spezifischer siRNA transfizierte HeLa-Zellen. 0: Kontrolle, mit unspezifischer siRNA transfiziert. 1: 300 pmol MAPK1-siRNA, Zelldichte 40 %; 2: 400 pmol MAPK1-siRNA, Zelldichte 40 %; 3: 400 pmol MAPK1-siRNA, Zelldichte 60 %. 25 µg Protein der transfizierten HeLa-Zellen wurden in einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Westernblot-Analyse erfolgte mit dem MAPK1-spezifischen Antikörper Taq100 (1:1000 Verdünnung). Der gleiche Blot wurde „gestrippt“ und HSC70 mit dem Antikörper B6 (1: 1x10⁶ Verdünnung) detektiert.

Eine Reduktion der Expression drei Tage nach den Transfektionen konnte nicht reproduzierbar gezeigt werden, aber mit allen Reagenzien konnte eine Reduktion der MAPK1 Expression nach fünf Tagen erreicht werden. Die deutlichste Inhibierung der Expression wiesen die mit Oligofectamine transfizierten Zellen (300 pmol siRNA; 40% Zelldichte) auf. Diese Bedingungen wurden im Folgenden auch für die EMMPRIN-spezifischen siRNAs verwendet.

3.6.2 Validierung einer geeigneten EMMPRIN-spezifischen siRNA

Für die Berechnung von EMMPRIN-spezifischen siRNAs wurde der Algorithmus „HiPerformance“ von Qiagen verwendet. Die beiden besten Kandidaten, die der Algorithmus ermittelte, wurden von Qiagen synthetisiert (s. Material und Methoden). Nach dem in 3.6.1 optimierten Transfektionsprotokoll wurden HeLa Zellen mit den beiden synthetisierten EMMPRIN-spezifischen siRNAs EMMPRIN-1 und EMMPRIN-2 transfiziert. Fünf Tage nach der Transfektion erfolgte der Nachweis der EMMPRIN-Expression in der Westernblot-Analyse (s. Abb. 3.26).

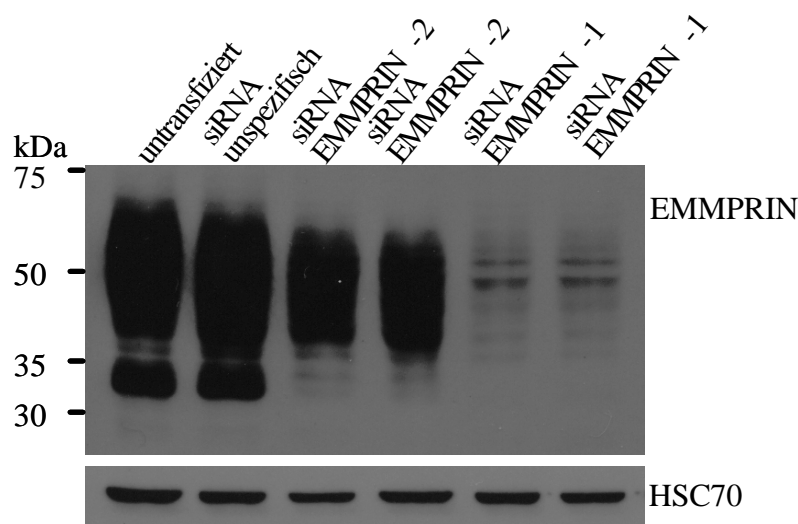


Abb. 3.26: Austestung der EMMPRIN-spezifischen siRNAs EMMPRIN-1 und EMMPRIN-2 durch transiente Transfektion in HeLa-Zellen. Die Westernblot-Analyse erfolgte mit dem EMMPRIN-spezifischen Antikörper HIM6 (1:4000 Verdünnung). Der gleiche Blot wurde „gestrippt“ und HSC70 mit dem Antikörper B6 (1: 1x10⁶ Verdünnung) detektiert.

Das Ergebnis zeigte für die siRNA EMMPRIN-1 eine stärkere Reduktion der EMMPRIN-Expression. Die Ziel-Sequenz der siRNA EMMPRIN-1 wurde daher für die Herstellung eines siRNA-Expressionsvektors verwendet.

3.6.3 Stabile Expression von anti-EMMPRIN shRNAs in MDA-MB-231 Zellen

Die durch synthetische siRNA-Moleküle in Säugerzellen induzierte RNAi ist nur von kurzer Dauer. Eine Möglichkeit diesem Problem zu begegnen, stellt die intrazelluläre Synthese von so genannten „short hairpin RNAs“ (shRNAs) durch Verwendung von siRNA-Expressionsvektoren. Unter Verwendung des Vektors pSilencer 3.1-H1 sollte eine stabile Herunterregulierung von EMMPRIN in MDA-MB-231 Zellen erreicht werden, die zu einer mindestens 70%igen Reduktion des Proteins führt. Die Herstellung des EMMPRIN-spezifischen siRNA-Expressionsvektors pSilencer-siEMMPRIN erfolgte wie unter 2.5.3 beschrieben. In den Vektor pSilencer 3.1-H1 wurde hierfür über die Restriktionsschnittstellen für BamH I und Hind III ein 69 bp-langes Insert, das durch Anealing zweier komplementärer Oligos hergestellt wurde, ligiert. Abb. 3.27 zeigt den genauen Aufbau des cDNA-Fragments. Zur Kontrolle der korrekten Klonierung wurde das Konstrukt mit den Primern pSilencer1 und pSilencer2 die flankierend zur MCS binden, sequenziert. Die Sequenzierungen bestätigte die richtige Klonierung.

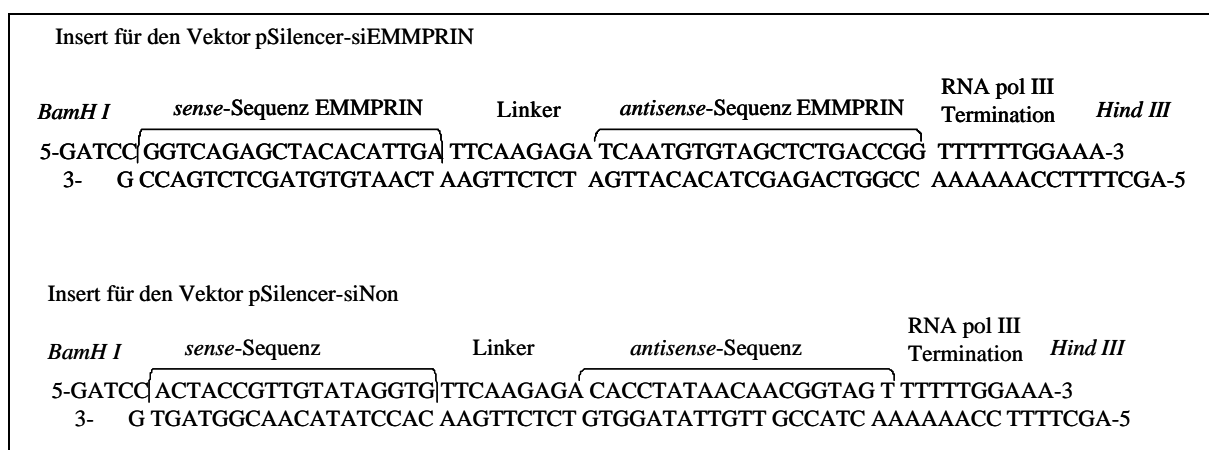


Abb. 3.27: Für die Herstellung der Vektoren pSilencer-siEMMPRIN und pSilencer-siNon verwendete cDNA-Fragment.

Für die Vektor-vermittelte intrazelluläre Expression der EMMPRIN-spezifischen shRNA, wurde die Zelllinie MDA-MB-231 mit den Konstrukten pSilencer-siEMMPRIN und pSilencer-siNon stabil-transfiziert. Der Vektor pSilencer-siNon enthält ein Insert für eine siRNA ohne Zielprotein (s. Abb. 3.27) und dient zur Herstellung der Kontrollzelllinien. Die Transfektion der MDA-MB-231 Zellen erfolgte wie unter 2.4.1 beschrieben mit dem Transfektionsreagenz FuGENE 6. Da der Vektor pSilencer 3.1-H1 ein Gen für die Puromycinrestenz enthält, erfolgte die Selektion der stabil-transfizierten Zellklone mit der in „Killing-Curves“ ermittelten Konzentration von 500 ng/ml Puromycin. Von jedem Transfektionsansatz wurden 20 mit Puromycin selektionierte Klone

isoliert und expandiert. Die resistenten Klone wurden bezüglich der EMMPRIN-Expression mittels Westernblot-Analyse untersucht.

Wie in Abb. 3.28 dargestellt, führte die stabile Transfektion mit pSilencer-siEMMPRIN in den generierten Zellklonen zu einer unterschiedlich starken Reduktion der EMMPRIN-Expression.

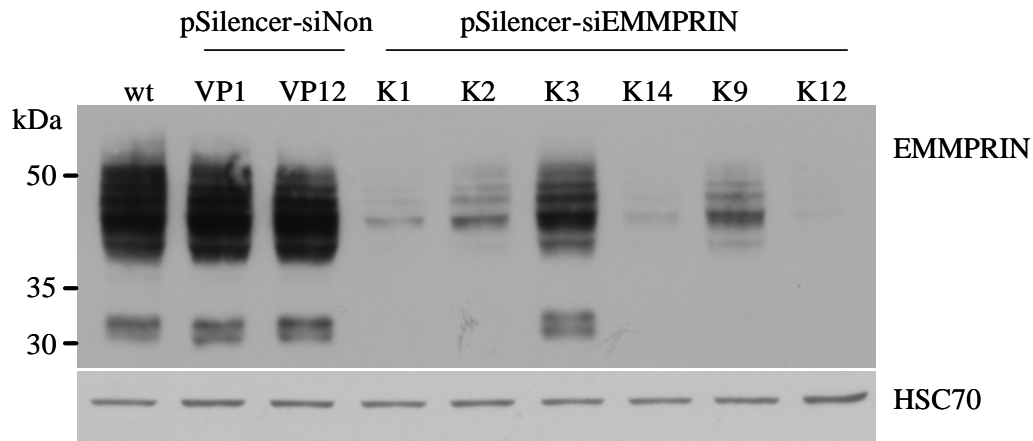


Abb. 3.28: Herstellung von stabilen MDA-MB-231 Klonen mit reduziertem EMMPRIN-Level. Für die Westernblot-Analyse der EMMPRIN-Proteine wurden jeweils 25 µg Protein pro Zelllinie geladen. Die unterschiedlichen Zelllinien wurden durch stabile Transfektionen mit dem Vektor pSilencer-siNon (Klone: VP1 und VP12) bzw. pSilencer-siEMMPRIN (Klone: K1, K2, K3, K14, K9 und K12) generiert, parallel wurden die untransfizierten, parentalen (wt) MDA-MB-231 Zellen aufgetragen.

Die höchste Inhibierung der Expression im Vergleich zur der Ursprungszelllinie zeigten die Klone K12 und K14 mit 95 % bzw. 93 % Reduktion. Die Quantifizierung der Expression erfolgte densitometrisch (Software: GeneTools, Syngene, Cambridge, UK). Eine Übersicht über die Verteilung der EMMPRIN-Reduktion zeigt das Schema in Abb. 3.29. Danach ist bei 40 % der etablierten Zelllinien eine Inhibierung von über 70 % (ein Wert der üblicherweise als Grenzwert für ein erfolgreiches siRNA-Experiment angesetzt wird)

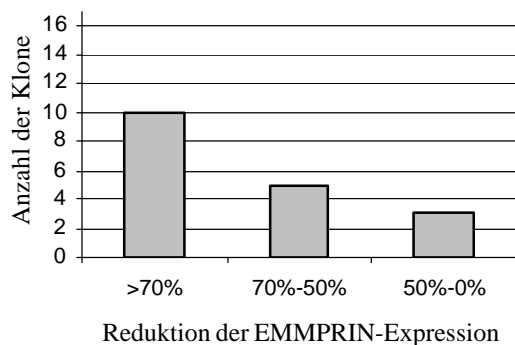


Abb. 3.29: Übersicht über die Verteilung der EMMPRIN-Reduktion in den mit pSilencer-siEMMPRIN transfizierten MDA-MB-231 Klone. Es wurden 18 Klone analysiert.

zu beobachten. Die mit pSilencer-siNon transfizierten Zelllinien zeigten wie erwartet keine veränderte EMMPRIN-Expression (s. Abb. 3.28).

3.6.4 Einfluss der EMMPRIN-Expression auf die Proliferation

Im ersten Teil der Arbeit konnte durch die Untersuchung von primären Mammakarzinomen gezeigt werden, dass eine erhöhte EMMPRIN-Expression mit einer hohen Mitoserate korreliert. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob die Inhibierung der EMMPRIN-Expression einen Einfluss auf die Proliferation der MDA-MB-231 Zellen *in vitro* hat. Dazu wurden MTT-Proliferationsassays über einen Zeitraum von 8 Tagen durchgeführt. In den Assays wurden zwei Zellklone mit reduzierter EMMPRIN-Expression (K12 und K14), zwei mit pSilencer-siNon transfizierte Klone (VP1 und VP12) und die parentalen MDA-MB-231 Zellen getestet. Wie Abb. 3.30 zu entnehmen ist, war keine signifikante Veränderung der Teilungsrate zwischen den Zelllinien *in vitro* zu beobachten.

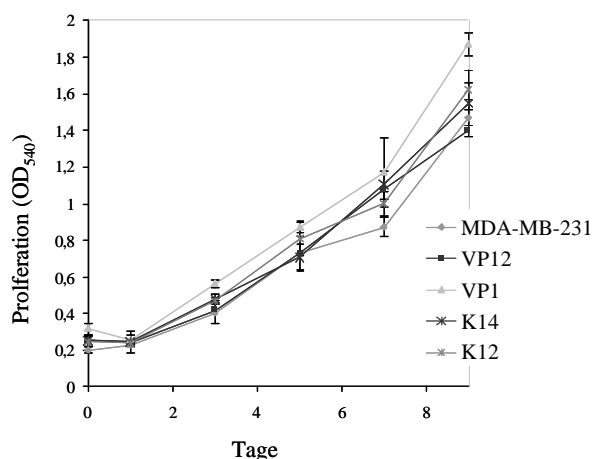


Abb. 3.30: Einfluss der EMMPRIN-Expression auf die Proliferation. Für den MTT-Proliferationsassay wurden pro Well einer 96-Well-Platten 6,5 x 10³ Zellen der verschiedenen MDA-MB-231 Klone ausgesät. K12 und K14: pSilencer-siEMMPRIN transfizierte Klone, VP12 und VP1: pSilencer-siNon transfizierte Klone. Dargestellt ist die Proliferationsrate über acht Tage. Die Abbildung zeigt jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung von Dreifachbestimmungen.

3.6.5 Einfluss der EMMPRIN-Expression auf die Produktion von MMPs

Da in verschiedenen Studien beschrieben wurde, dass EMMPRIN die Sekretion von MMPs durch peritumorale Fibroblasten induziert, interessierte die Fragestellung, wie sich die RNAi-inhibierte EMMPRIN-Expression auf die Induktion von MMPs auswirkt. In ersten Versuchen wurde dafür die für die Tumorprogression bedeutsamen MMPs MMP-1-, -2-, -3- und -9 untersucht. Für diese MMPs wurde eine Stimulierung der Produktion durch EMMPRIN beschrieben.

Die Produktion der MMPs wurde sowohl in den etablierten MDA-MB-231 Klonen in Abwesenheit von Fibroblasten als auch in Anwesenheit von Fibroblasten analysiert. Um den Einfluss der EMMPRIN-Expression auf Fibroblasten zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Ansätze durchgeführt. Im ersten Verfahren wurde die Stimulation von MMP-2 und MMP-9 in Tumorzell/Fibroblasten Co-Kultur-Assays analysiert. In einer alternativen Methode wurde Fibroblasten für 72 h mit serumfreiem durch Tumorzellen konditioniertem Medium stimuliert. In beiden Ansätzen wurden nach Abschluss der Stimulation die geernteten Überstände in Gelatine-Zymogrammen hinsichtlich MMP-2- und MMP-9-Sekretion untersucht.

3.6.5.1 Effekte der EMMPRIN-Reduktion auf die MMP-Produktion in den MDA-MB-231 Zellen

Die Analysen zur MMP-1- und MMP-3-Expression in den MDA-MB-231 Klonen zeigten keine Korrelation zu der EMMPRIN-Expression (s. Abb. 3.31).

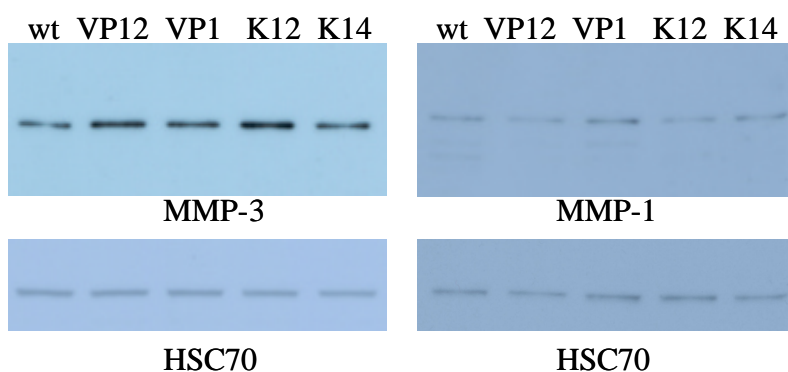


Abb. 3.31: Expression von MMP-3 und MMP-1 in den MDA-MB-231 Klonen. 25 µg Proteinlysate der angegebenen MDA-MB-231 Klone (wt: unveränderte MDA-MB-231 Zellen, K12 und K14: pSilencer-siEMMPRIN transfizierte Klone, VP12 und VP1: pSilencer-siNon transfizierte Klone) wurden in einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Westernblot-Analyse erfolgte mit dem MMP-3-spezifischen Antikörper 10D6 und MMP-1-spezifischen Antikörper Ab-6 (beide 1:100 Verdünnung). Die gleichen Blots wurden „gestrippt“ und HSC70 mit dem Antikörper B6 (1: 1x10⁶ Verdünnung) detektiert.

Da allerdings die Expression von MMP-1 und MMP-3 in Westernblot-Analysen nur in den Lysaten und nicht im Überstand nachweisbar war, kann keine Aussage über den Einfluss von EMMPRIN auf die Sekretion und die Aktivierung der MMPs gemacht werden. Für diese Fragestellung müssten die Zellüberstände in speziellen Aktivitäts-Assays untersucht werden. Eine Fibroblasten-unabhängige Expression von MMP-2 und MMP-9 in den verschiedenen MDA-MB-231 Klonen konnte weder im Westernblot noch im Zymogramm nachgewiesen werden.

3.6.5.2 Effekte der EMMPRIN-Reduktion auf die MMP-Produktion in Fibroblasten

Zur Untersuchung des Einflusses von EMMPRIN auf Fibroblasten wurden in Co-Kultivierungs-Versuchen jeweils 4×10^4 Zellen der stabil-transfizierten MDA-MB-231 Klone mit 4×10^4 dermalen Fibroblasten in 24-Well-Platten kultiviert. Nach 72 h wurden die serumfreien supplementierten Überstände geerntet und im Gelatine-Zymogramm untersucht. Die Experimente zeigten, dass die Induktion der MMP-2- und MMP-9-Produktion in den Fibroblasten durch die Tumorzellen sehr gering war. Zwischen den MDA-MB-231 Klonen konnten die Analysen keine Unterschiede zeigen (Daten nicht gezeigt).

In dem alternativen Versuchsansatz zur Stimulation der Fibroblasten mit konditioniertem Überständen der MDA-MB-231 Klone, konnten leichte Unterschiede zwischen den Klonen festgestellt werden. So wurde durch das Medium der in der EMMPRIN-Expression reduzierten Klone K12 und K14 eine etwas schwächere MMP-2-Sekretion induziert. Für MMP-9 konnte eine verringerte Sekretion der aktivierten MMP-9-Form beobachtet werden (s. Abb. 3.32).

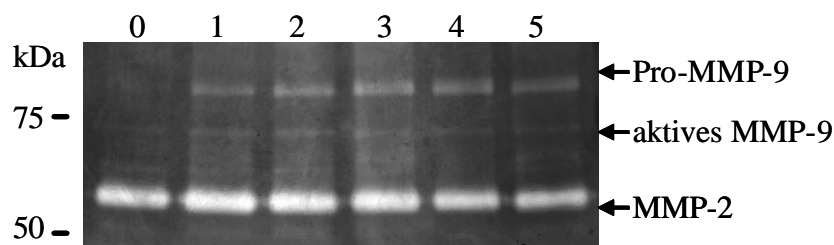


Abb. 3.32: MMP-Sezernierung von Fibroblasten nach Inkubation mit konditioniertem Medium. Dermale Fibroblasten (dF) wurden mit konditioniertem serumfreiem Medium der verschiedenen MDA-MB-231 Klone für 72 h inkubiert. 20 μ l der jeweiligen Fibroblasten Überstände wurden dann im Zymogramm analysiert. Bahn 0: dF+nicht-konditioniertes Medium, Bahn 1: dF+Medium von MDA-MB-231; Bahn 2+3: dF+ Medium von pSilencer-siNon transfizierten MDA-MB-231 (Klon VP12 und VP1); Bahn 4+5: dF+ Medium von pSilencer-siEMMPRIN transfizierten MDA-MB-231 (Klon K14 und K12).

Es zeigte sich auch in diesem Versuchsansatz nur eine geringe Stimulation der MMP-Sekretionen der Fibroblasten durch die parentalen MDA-MB-231 Zellen. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Unterschieden in der MMP-2-Sekretion zwischen den unbehandelten Fibroblasten und den mit konditioniertem Medium der parentalen MDA-MB-231 Zellen stimulierten Fibroblasten nur um einen Faktor 2 handelt (Daten nicht gezeigt). Da außer EMMPRIN noch verschiedene andere Faktoren die MMP-Sekretion in peritumoralen Fibroblasten stimulieren, ist es schwierig den Einfluss von EMMPRIN bei einer so geringen Gesamt-Stimulation zu bestimmen. Um auszuschließen dass die schwache Aktivierbarkeit der Fibroblasten eine spezielle Eigenschaft der verwendeten Fibroblasten-Kultur ist, wurden noch zwei weitere Kulturen anderer Spender für die Versuche eingesetzt. Auch mit diesen Fibroblasten konnten keine anderen Resultate erzielt werden.

3.6.7 Einfluss der reduzierten EMMPRIN-Expression auf Zell-Migration

Im folgenden Versuchen sollte am Verhalten von Zellklustern (Sphäroiden) in 3D-Kollagen-Matrices analysiert werden, ob EMMPRIN einen Einfluss auf die Ablösung und Migration von Tumorzellen aus dem Zellverband hat. Um die Situation des Zellverbandes im Tumor eines Patienten möglichst wirklichkeitstreu abzubilden, wurde dieses dreidimensionale Modell gewählt.

Die generierten MDA-MB-231 Zelllinien wurde zur Herstellung der Sphäroide 48 h in PolyHEMA-beschichteten Zellkulturflaschen kultiviert. Durch die Beschichtung bleiben die Zellen in Suspension und es bilden sich Zellaggregate. Die gewonnenen Sphäroide wurden wie unter 2.4.5 beschrieben in Kollagen-Matrix mit 6% FCS gegossen und über 24 h gefilmt. Durch die Kollagen-Matrix wird angenähert die Situation von Tumorzellen in der EZM simuliert. Die Versuche wurden im Institut für Dermatologie in Würzburg in Kooperation mit Dr. Wolf und Prof. Friedl durchgeführt. Abb. 3.33 fasst die Ergebnisse zusammen. Gezeigt wurden jeweils Sphäroide der generierten MDA-MB-231 Zelllinien kurz nach dem Einbringen in die 3D-Matrix. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich noch alle Zellen im Sphäroid. Das jeweilige zweite Bild (Abb. 3.33) zeigt den gleichen Ausschnitt aus dem Kollagen-Block nach 24 h mit den unterschiedlichen Auswanderungs-Mustern der Zelllinien aus den Aggregaten. Auffällig war, dass sich die beiden pSilencer-siNon transfizierten Kontrollzelllinien anders als die parentale Zelllinie verhalten. Die Kontrollzelllinien VP12 und VP1 zeigen eine deutlich größere Adhärenz zum Zellaggregat

und migrieren langsamer. Zwischen den parentalen MDA-MB-231 Zellen und den EMMPRIN-reduzierten Klonen K12 und K14 konnten keine Unterschiede in der Ablösung vom Sphäroid und in der Migrationsgeschwindigkeit festgestellt werden.

Um zu untersuchen, ob das auffällige Verhalten der Kontrollzelllinien ein spezifisches Phänomen der ausgewählten Klone ist, oder ob der Phänotyp durch den Kontrollvektor verursacht wird, müssten weitere Vektor-transfizierte Klonen überprüft werden. EMMPRIN scheint in diesem Modellsystem, weder die Zell-Zell-Adhäsion der MDA-MB-231 Zellen noch die Migration durch die Kollagen I Matrix zu beeinflussen.

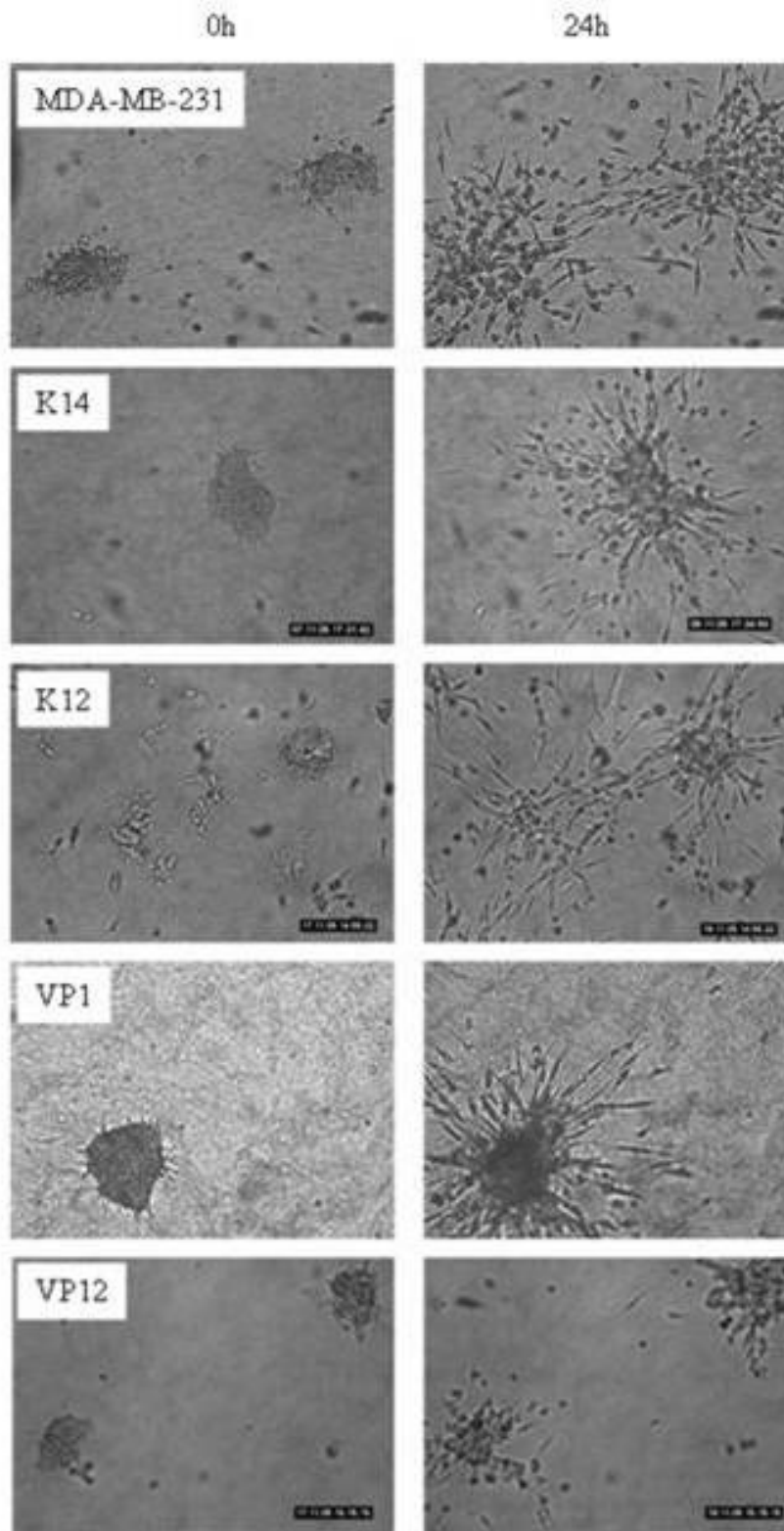


Abb. 3.33: Zell-Migrations-Assay. Sphäroide der verschiedenen MDA-MB-231 Zelllinien wurden in Kollagen I Matrix eingegossen, mit Medium überschichtet und über 24h gefilmt. Es sind jeweils die Sphäroide zum Startzeitpunkt und nach 24h gezeigt.

4. Diskussion

Die Tumorprogression stellt einen hochkomplexen Prozess dar, der aus einer Vielzahl von Einzelschritten besteht. Die maligne Zelle benötigt einen speziellen Phänotyp, der es ihr ermöglicht, alle Schritte der Tumorentwicklung bis hin zur „erfolgreichen“ Metastasierung zu bewältigen. Sie muss die Fähigkeiten besitzen sich aus dem Zellverband zu lösen, in das umgebende Bindegewebe einzuwandern und ins Gefäßsystem (Blut- und /oder Lymphgefäße) einzudringen. Für die Ausbildung solider Metastasen müssen die Zellen an das Kapillarbett anderer Organe adhären, ins Zielorgan extravasieren und im Parenchym des Zielorgans proliferieren. Eine steigende Zahl an Ergebnissen weist darauf hin, dass EMMPRIN, ein multifunktionales Protein auf der Oberfläche von Tumorzellen, Schlüsselereignisse der Metastasierungs-Kaskade beeinflusst und dadurch eine wichtige Rolle bei der Progression von Karzinomen spielen könnte.

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression und Bedeutung von EMMPRIN im humanen Mammakarzinom zu untersuchen. Hierzu standen Gewebearrays mit Mammakarzinom-Proben von 2222 Patientinnen und den entsprechenden klinisch-pathologischen Daten zur Verfügung. Des Weiteren wurde die Expression und posttranslationale Modifizierung von EMMPRIN in 14 Mammakarzinomzelllinien mit unterschiedlichem metastatischem Potenzial analysiert. Durch die stabile Überexpression von EMMPRIN bzw. durch Knock-down Experimente in Mammakarzinomzelllinien sollte der Einfluss von EMMPRIN hinsichtlich metastasierungs-relevanter Aspekte wie Proliferation, Stimulierung von MMPs und Migration untersucht werden.

4.1 Prognostische Bedeutung der EMMPRIN-Expression in humanen Mammakarzinomen

Caudroy und Mitarbeiter untersuchten in einer immunhistochemischen Studie mit einem Kollektiv von 20 Proben die EMMPRIN-Expression beim Mammakarzinom [177]. Es wurde gezeigt, dass EMMPRIN stärker von Tumorzellen als von normalen Epithelzellen exprimiert wird. Eine Korrelation zu klinisch-pathologischen Daten oder die prognostischen Relevanz wurden in der Studie von Caudroy et al. nicht untersucht.

In der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studie wurde das erste Mal die Bedeutung der EMMPRIN-Expression im humanen Mammakarzinom durch die Verwendung der TMA-Technologie untersucht. So waren die Untersuchung einer großen

Anzahl von Mammakarzinom-Proben und die Korrelation der Färbeergebnisse mit verschiedenen klinischen-pathologischen Daten möglich. Die Ergebnisse zeigten, dass die EMMPRIN-Expression im Mammakarzinom mit Risikofaktoren wie einem hohen histologischen Grad, dem mitotischen Index, einem negativem Hormonrezeptor-Status und der Tumorgroße assoziiert ist. Eine positive EMMPRIN-Färbung korrelierte zudem bei der Untersuchung des Gesamt-Kollektives mit einem schlechteren tumorspezifischen Überleben. Interessanterweise hat die Analyse von Untergruppen gezeigt, dass die EMMPRIN-Expression nur für postmenopausale, nicht aber für jüngere Patientinnen von prognostischer Bedeutung ist. Da die EMMPRIN-Expression eine inverse Korrelation zum Hormonrezeptor-Status zeigte, ist es möglich, dass die prognostischen Aspekte von EMMPRIN von den postmenopausalen Änderungen im Hormonhaushalt abhängig sind. Eine aktuelle Untersuchung konnte an humanem Endometriumgewebe zeigen, dass sowohl die Glykosylierung als auch die Expression von EMMPRIN durch Östrogen und Progesteron beeinflusst werden [178]. Hieraus ließe sich schlussfolgern, dass die EMMPRIN-Expression in den Tumorzellen von prämenopausalen Patientinnen zyklusbedingten Schwankungen unterliegt. Da der Zyklus-Status zum Zeitpunkt der Primäroperation nicht bekannt ist, könnte die Bestimmung der EMMPRIN-Expression in der Gruppe der jüngeren Patientinnen durch die unterschiedlichen Zyklusphasen zum Zeitpunkt der Operation „verfälscht“ sein. Der Einfluss von Hormonen auf die EMMPRIN-Expression in Endometriumzellen wurde in früheren Arbeiten auch für das EMMPRIN der Maus und der Ratte (Basigin) beschrieben [179, 180]. Ob die EMMPRIN-Expression in den Epithelzellen des Mammagewebes allerdings hormonell reguliert wird, ist noch nicht bekannt.

4.2. Expression von EMMPRIN in Mammakarzinomzelllinien

4.2.1 EMMPRIN wird als H- und als L-Form exprimiert

14 humane Mammakarzinomzelllinien, die sich in ihrer Tumorigenität und ihrem metastatischen Potenzial *in vivo* unterscheiden, wurden in der Westernblot-Analyse hinsichtlich ihrer EMMPRIN-Expression untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle Zelllinien EMMPRIN exprimieren, es aber Unterschiede in der Expressionsstärke gibt. Jede Zelllinie exprimiert zwei EMMPRIN-Varianten. Es wurde jeweils ein kleineres

EMMPRIN-Protein von 29-32 kDa (L-Form) und ein größeres EMMPRIN-Protein mit einem Molekulargewicht von 45-65 kDa (H-Form) nachgewiesen.

Schon in den ersten Arbeiten über EMMPRIN wurde die Existenz einer H-Form und einer L-Form beschrieben. Es wurde vermutet, dass es sich bei der L-Form um ein Degradationsprodukt handeln könnte, das bei der Aufarbeitung entsteht [93]. In späteren Arbeiten wurde die in Geweben und Zelllinien detektierte L-Form als unglykosylierte, inaktive Vorform klassifiziert [97, 100, 135, 177]. Die von mir durchgeführten Analysen haben dagegen gezeigt, dass die L-Form genauso wie die H-Form an drei N-Glykosylierungspositionen glykosyliert ist. Die aktuellen Arbeiten von Tang et al. bestätigen dieses Ergebnis und führten zu einem neuen Verständnis der Struktur und Funktion der L-Form [105, 108]. Tang und Mitarbeiter zeigten an der Fibrosarkomen-Zelllinie HT1080, dass die Zuckerstruktur der L-Form (32 kDa) im Vergleich zur H-Form keine β 1,6 verzweigten Polyglaktosamine enthält [108]. Für β 1,6 verzweigte Polyglaktosamine ist ein progressiver Einfluss auf die Tumorentwicklung und die MMP-Stimulation beschrieben [170, 171]. Tang et al. konnten in ihren aktuellen Arbeiten zeigen, dass die Bindung von Caveolin an die EMMPRIN L-Form die Anheftung von β 1,6 verzweigten Polyglaktosamine blockiert [108]. Da nur die vollständig glykosylierte H-Form in der Plasmamembran homophile Oligomere bilden und die MMP-Produktion stimulieren kann, inhibiert Caveolin somit die EMMPRIN-vermittelte MMP-Produktion [105].

Nicht beschrieben ist allerdings die Expression von unterschiedlichen L-Formen. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Analysen zeigten, dass die Mammakarzinomzelllinien BT-20 und BT-474 eine kleinere L-Form (~ 29 kDa) als die übrigen Zelllinien exprimieren. Diese Variante ist entweder geringer glykosyliert als die von Tang et al. beschriebene Variante oder gar nicht glykosyliert. Um zu untersuchen, ob die Entstehung verschiedener Molekulargewichte mit der Caveolin-Expression in den Zelllinien korreliert, wurde die Caveolin-Expression in den Zelllinien bestimmt. Theoretisch könnte das Fehlen von Caveolin zu einem Fehlen der 32 kDa L-Form führen.

4.2.2 Die EMMPRIN L-Form und Caveolin

Caveoline sind eine kleine Familie von Membranproteinen, welche die Hauptkomponenten der sog. Caveolae bilden, Omega-förmige Einstülpungen der Zytoplasmamembran, die in allen Säugerzellen vorkommen. Innerhalb dieser Strukturen bilden die Caveoline eine Art „Steuer-Gerüst“ für Signalmoleküle, wie z.B. den EGF-Rezeptor, RAS-Proteine und RAS-

abhängige Proteinkinasen, und fungieren als negative Regulatoren der Signalkaskaden [106, 181]. Eine Vielzahl von Studien zum Mammakarzinom hat gezeigt, dass Caveolin Tumorsupressor-Eigenschaften besitzt [174].

Tang et al. konnten die Bindung der EMMPRIN L-Form an Caveolin und eine Co-Lokalisation in der Plasmamembran zeigen [105]. Da der Caveolin-EMMPRIN-Komplex nicht im Bereich der Caveolae liegt, postulierte Tang einen Mechanismus für Caveolin als Tumorsupressor, der unabhängig von der Caveolae-abhängigen Signaltransduktion ist.

Die Analyse der Caveolin-Expression in den von mir untersuchten Mammakarzinomzelllinien zeigte keine Korrelation zwischen dem Auftreten der unterschiedlichen L-Formen und der Caveolin-Expression. Für die Expression der 29 kDa L-Form liefert die Caveolin-Expression somit keine Erklärung. Zum Verständnis der 29 kDa Form müsste in weiteren Analysen untersucht werden, ob diese L-Form gar nicht oder geringer glykosyliert ist und ob auch diese Variante an Caveolin bindet. Die von Tang postulierte Korrelation zwischen einer starken Caveolin-Expression mit einer starken Expression der L-Form konnte auch nicht bestätigt werden [108].

4.2.3 Die Expression verschiedener H-Formen

Das Molekulargewicht der H-Form variierte zwischen den untersuchten Mammakarzinom Zelllinien. Die meisten Zelllinien exprimierten eine H-Form von 65 kDa (H65-Form). Die im Mausmodell sehr aggressiven Zelllinien MDA-MB-435S, MDA-MB-231 und DU4475 exprimierten dagegen eine H-Form von ~45 kDa (H45-Form). Auch die Mikometastasen-Zelllinien BC-S1 und BC-K1 exprimieren die H45-Form. Das Auftreten der H45-Form scheint somit mit einem höheren metastatischen Potenzial der Zelllinien zu korrelieren.

Untersuchungen am EMMPRIN im Maus- und Ratten-Model haben gezeigt, dass verschieden glykosylierte Varianten organspezifisch exprimiert werden [182, 183]. Außerdem werden unterschiedliche Spleißvarianten von Basigin exprimiert. Northernblot-Analysen zeigten verschiedene Spleißvarianten in den unterschiedlichen Organen der Maus [182]. Für die von mir untersuchten EMMPRIN-Varianten in den Mammakarzinom-Zelllinien konnte ich zeigen, dass es sich nicht um Spleißvarianten oder mutierte EMMPRIN-Moleküle handelte. Die genauere Untersuchung der Glykosylierung zeigte, dass beide H-Formen ausschließlich N-glykosyliert waren. Das im Maussystem untersuchte Basigin enthält im Gegensatz dazu wahrscheinlich zusätzliche O-Glykosylierungen [173, 182].

Die einzige Studie, in der unterschiedliche H-Formen im humanen System untersucht worden sind, ist die Arbeit von Noguchi und Mitarbeitern [178]. Die in dieser Arbeit untersuchten EMMPRIN-Varianten aus dem Endometrium, waren ebenfalls ausschließlich N-glykosyliert. Welche posttranslationalen Modifizierungen zu den unterschiedlichen Molekulargewichten führten oder ob es im Endometriumgewebe EMMPRIN-Spleißvarianten gibt, zeigte die Arbeit jedoch nicht.

Die Funktionen der unterschiedlichen H-Varianten von EMMPRIN sind bis jetzt weder im humanen noch im murinen System aufgeklärt.

4.2.4 Identifizierung der H65-Form als Träger von Lewis^X-Strukturen

Die weitere Analyse der Kohlenhydratstrukturen der H-Formen zeigte, dass sowohl die H45-Form als auch die H65-Form β 1,6 verzweigte Polylaktosamine enthalten, aber nur die H65-Form zusätzliche Lewis^X-Gruppen besitzt.

In verschiedenen Tumoren konnte gezeigt werden, dass eine starke Expression von Lewis^X-Gruppen oder von der Lewis^X verwandten Gruppe sialyl Lewis^X mit einem stärkeren metastatischen Potenzial assoziiert ist. Sowohl im Blasenkarzinom als auch im Lungenkarzinom ist die Expression von Lewis^X-Gruppen ein starker Marker für ein kürzeres Rezidiv-freies Intervall und eine schlechtere Prognose [184-186]. Dieses Phänomen könnte durch die Fähigkeit von Lewis^X-Gruppen, Integrin-abhängige Zell-Substrat-Adhäsion zu beeinflussen, erklärt werden. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass Lewis^X wichtig für die Aktivierung von Integrinen ist und dadurch die Zell-Substrat-Bindung und die Zell-Zell-Adhäsion stimuliert [187]. Es stellt sich allerdings die Frage, warum Lewis^X-Gruppen auf der H65-Form, die mit einem geringeren metastatischen Potenzial korreliert ist, exprimiert sind. Eventuell sind Lewis^X-Gruppen nur für bestimmte Phasen der malignen Progression von Vorteil, wie z.B. die Invasion und Extravasation, in der Zell-Substrat-Bindung bzw. die Bindung von Tumorzellen an Endothelzellen [188]. Im Blutstrom könnten Lewis^X-Gruppen von Nachteil für die Tumorzellen sein. So konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Lewis^X zur Erkennung und Lyse von Tumorzellen durch natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) führen kann [189, 190]. NK-Zellen sind primitive T-Lymphozyten, denen der spezifische T-Zellrezeptor zur Antigenerkennung fehlt. Circa 15 % der peripheren Blut-Lymphozyten sind NK-Zellen. Charakteristisch ist für sie, dass sie tumoröse und virusinfizierte Zellen, die keine oder veränderte MHC-Klasse-I Moleküle exprimieren, zerstören können [191].

Normale gesunde Zellen entkommen der NK-Lyse, da ihr MHC-Klasse-I Moleküle NK-Zellen inaktiviert. Viele metastatische Tumorzellen exprimieren wenig oder gar keine MHC-Klasse-I Moleküle und müssen sich daher besonders vor NK-Zellen schützen [79, 191]. Einen Verlust von Lewis^X-Gruppen bei den *in vivo* metastatischen Zelllinien könnte dem Schutz vor NK-Zellen dienen. Die für Xenograft-Modelle verwendeten immundefizienten SCID- oder Nacktmäuse besitzen eine normale NK-Zellpopulation.

Auch für die Embryonalentwicklung sind Lewis^X-Gruppen wichtig. Muramatsu und Mitarbeiter zeigten, dass Lewis^X-Gruppen im Maus-Embryo während des 8-Zell-Stadiums stark exprimiert werden, und bis zum Tag 10 der Entwicklung wieder verloren gehen [187]. Eine Blockierung der Lewis^X-Gruppen während der Embryonal-Entwicklung führte zum Zerfall des 8-Zell-Stadiums [192]. Maramatsu lieferte auch die ersten Hinweise, dass Basigin der Träger von Lewis^X-Gruppen im Maus-Embryo ist [87]. In den adulten Geweben der Maus konnte dagegen nur in Nierenzellen Lewis^X-Strukturen an Basigin nachgewiesen werden [182]. Das humane EMMPRIN wurde in der vorliegenden Arbeit das erste Mal als Träger von Lewis^X-Strukturen beschrieben [193].

4.3 Das lösliche EMMPRIN

4.3.1 Sezernierung der unterschiedlichen EMMPRIN-Varianten

Die lösliche EMMPRIN-Form fand lange Zeit wenig Beachtung. Zwar wurde schon in der Arbeit von Ellis et al. (1989) die Existenz erwähnt und vermutet, dass es sich um ein durch Proteasen freigesetztes EMMPRIN-Protein handelt, aber erst 2002 untersuchten Taylor et al., ob die lösliche Form tatsächlich trunziert ist [93, 139]. Es konnte gezeigt werden, dass das lösliche Protein sowohl mit einem Antikörper gegen den C-Terminus als auch mit einem Antikörper gegen den N-Terminus nachgewiesen werden kann [139]. Somit muss das vollständige EMMPRIN-Protein sezerniert werden.

Für meine Untersuchungen war von Interesse, ob die Glykosylierung einen Einfluss auf die Sezernierung hat. Die Analysen verschiedener Zelllinien, die unterschiedlich glykosylierte EMMPRIN-Proteine exprimieren, zeigten, dass nicht die L-Form sondern nur die H-Form als lösliches Protein nachweisbar ist. Es machte aber keinen Unterschied, ob die Zelllinie die H45-Form oder die H65-Form exprimierte. Beide H-Formen lagen als sezernierte Form vor.

Die Sezernierung der H-Form kann ein Mechanismus der Tumorzelle zur Stimulierung der MMP-Produktion in Fibroblasten der näheren Umgebung sein, die nicht im direkten Kontakt zu Tumorzellen stehen. Dies kann zu einem effektiveren Abbau der extrazellulären Matrix und damit zu der vermehrten Freisetzung von Wachstumsfaktoren führen. Es würde zudem erklären, warum die L-Form nicht sezerniert wird. Sun et al. konnten zeigen, dass das unglykosylierte oder wenig glykosylierte EMMPRIN die Stimulierung der MMP-Produktion blockiert [100].

4.3.2. Bedeutung der transmembranen Region für die Sezernierung

Zu Beginn meiner Arbeit gab es keine Studien zur Entstehung des löslichen EMMPRIN-Proteins. Ungewöhnlich ist die Sezernierung eines Proteins, das eine transmembrane Region enthält. Durch die von mir durchgeführten Analysen der EMMPRIN cDNAs konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der löslichen Form um eine Spleiß-Variante ohne transmembrane Region handelt. Die Arbeit von Taylor zeigte, dass das sezernierte EMMPRIN nicht trunkiert ist [139]. Somit muss es einen speziellen Mechanismus für die Sezernierung geben.

Auffällig an der transmembranen Region ist das Vorkommen der hydrophilen Aminosäure Glutaminsäure. Eine hydrophile Aminosäure sollte die Wechselwirkungen mit der lipophilen Membran stören. Von anderen transmembranen Proteinen wie z.B. dem T-Zell-Rezeptor ist bekannt, dass hydrophile Aminosäuren in der Membranregion der Interaktion mit anderen Transmembranproteinen dienen [194]. Es wäre nun denkbar, dass diese Aminosäure die Einlagerung in die Membran stört und es zu einer Sezernierung kommt, oder aber dass andere Proteine sich anlagern und eine Sezernierung vermitteln. Um die Funktion der Glutaminsäure zu untersuchen, wurde diese durch eine zielgerichtete Mutagenese gegen die hydrophobe Aminosäure Valin ausgetauscht. Zur Untersuchung der Sezernierung wurden sowohl die mutierte EMMPRIN cDNA wie auch die unveränderte cDNA in die Zelllinien CHO-K1 und COS7 transient transfiziert. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl das mutierte als auch das unmutierte EMMPRIN-Protein sezerniert werden. Für diese Modell-Zelllinien hatte somit der Aminosäure-Austausch keinen Einfluss auf die Sezernierung. Im Unterschied zu den Untersuchungen an den humanen Zelllinien wurde in den COS7- und den CHO-K1-Zellen auch die EMMPRIN L-Form sezerniert. Eventuell wird in den humanen Zellen die Sezernierung der L-Form durch die Bindung an andere Proteine wie z.B. Caveolin verhindert. Es wäre vorstellbar, dass eine Interaktion von

EMMPRIN mit dem nicht-humanen Caveolin der CHO-K1- oder COS7-Zellen nicht möglich ist. Um endgültig die Rolle der Glutaminsäure für die Sezernierung zu bestimmen, müsste die Untersuchung in humanen Zellen durchgeführt werden. Erste Transfektions-Studien mit der mutierten cDNA wurden auch an der humanen Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa durchgeführt (Daten nicht gezeigt). In diesem Fall mussten die rekombinaten EMMPRIN-Moleküle über den FLAG-Tag nachgewiesen werden, um sie von dem natürlichen vorkommenden EMMPRIN unterscheiden zu können. In den durchgeführten Versuchen reichte die Sensitivität des anti-FLAG Antikörpers nicht aus, um die rekombinaten EMMPRIN-Proteine im Überstand nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Eventuell müsste in dem humanen Modellsystem eine sensitivere Methode, z.B. ein ELISA durchgeführt werden. Ein ELISA-Assay würde allerdings keine Aussage darüber zu lassen, welche EMMPRIN-Isoform sezerniert wird.

In einer zeitgleich veröffentlichten Arbeit wurde die Sezernierung von EMMPRIN durch Abschnürung EMMPRIN-haltiger Mikrovesikel von der Tumorzelle beschrieben [195]. Die abgelösten Vesikel besitzen eine geringe Haltbarkeit, so dass durch den Zerfall EMMPRIN ins Medium entlassen wird. Sidhu et al. konnten zeigen, dass die Entstehung der Mikrovesikel über eine Signalkaskade reguliert ist, die von Proteinkinase C, Ca^{+} -Immobilisierung und MEK1/2 abhängig ist. Sidhu et al. zeigten weiter, dass die EMMPRIN-haltigen Mikrovesikel aus spezifischen Membranregionen entstehen. Da die L- und die H-Form nicht in den gleichen Bereichen der Zellmembran auftreten, könnte diese Arbeit auch meine Beobachtung erklären, dass nur die H-Form und nicht die L-Form sezerniert wird [105]. Sowohl im Hinblick auf die Signaltransduktion wie auch für die spezifische Lokalisation in der Membran, wäre ein Einfluss der Glutaminsäure in der transmembranen Region denkbar.

Eine ebenfalls sehr aktuelle Arbeit von Tang und Mitarbeitern zeigte im Überstand von MDA-MB-231 Zellen eine trunkierte EMMPRIN-Form ohne C-Terminus. Diese Beobachtung würde für eine Freisetzung durch Proteasen sprechen und der Arbeit von Taylor widersprechen, der mit derselben Zelllinie gearbeitet hat [136, 139]. Aus diesen Arbeiten und meinen eigenen Beobachtungen lässt sich somit schließen, dass möglicher Weise verschiedene Mechanismen für die Sezernierung von EMMPRIN verantwortlich sind.

4.4. Funktionelle Untersuchungen von EMMPRIN

4.4.1 Stabile Transfektion von Mammakarzinomzelllinien zur Überexpression von EMMPRIN

Die Ergebnisse der histologischen Studie zeigten, dass EMMPRIN-Expression im Mammakarzinom mit Risikofaktoren wie einem hohen histologischen Grad, dem mitotischen Index, Tumorgröße und einem schlechteren tumorspezifischen Überleben assoziiert ist. Um zu analysieren, ob die gefundenen Korrelationen zwischen EMMPRIN und den verschiedenen Risikofaktoren auch auf kausalen Zusammenhängen basieren, sollte EMMPRIN stabil in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien überexprimiert werden. Da auch der Aspekt der unterschiedlichen Glykosylierungs-Varianten berücksichtigt werden sollte, wurden Zelllinien ausgewählt, die sich bezüglich der H-Formen unterscheiden.

Für die Überexpression von EMMPRIN wurde ein EMMPRIN-FLAG Konstrukt hergestellt und in den bizistronischen Vektor pIRES-N1 kloniert. Nach der stabilen Transfektion der Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-435S und MDA-MB-468 konnte die Expression des EMMPRIN-FLAG-Proteins auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Auf Protein-Ebene waren nur geringe Mengen der L-Form und kaum nachweisbare Mengen der H-Form detektierbar.

Eine Ursache für die geringe EMMPRIN-FLAG Expression könnte der verwendete Vektor pIRES-N1 liefern. Der Vektor enthält, wie eine Vielzahl von eukaryontischen Expressionsvektoren, als Selektionsmarker das Gen für Neomycin. Das Neomycin-Gen kann auf Promotoren wie SV40 oder CMV inhibierend wirken und zu einer 5-10fachen Reduktion der Expression führen. Dieser Effekt wurde an Fibroblasten-Zelllinien gezeigt [196]. In wie weit dieser Mechanismus auch in den Mammakarzinomzelllinien auftritt, ist nicht bekannt.

Die erste Arbeit, in der eine Zelllinie (MDA-MB-436) stabil mit der EMMPRIN cDNA transfiziert wurde, zeigte eine 20fache Überexpression auf RNA-Ebene [164]. Die Protein-Expression wurde in dieser Arbeit nicht gezeigt. Die einzigen weiteren Arbeiten, in denen EMMPRIN stabil überexprimiert wurde, beschreiben eine Steigerung der EMMPRIN-Expression um einen Faktor 1,5 bis 2 [136, 197]. Dieses Ergebnis entspricht auch meinen Ergebnissen. Eine Erklärung für die geringen Expressions-Steigerungen liefern die Arbeiten allerdings nicht.

Da in den geplanten weiteren funktionellen Untersuchungen der Effekt einer 1,5 bis 2fachen Überexpression wahrscheinlich nicht ausreichend wäre, wurde für weitere Studien eine Knock-Down Strategie entwickelt.

4.4.2 siRNA-vermittelter Knock-Down von EMMPRIN in der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231

4.4.2.1 Etablierung der RNAi

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von EMMPRIN mittels siRNA stabil inhibiert. Um dies zu erreichen, musste die RNAi-Technologie zunächst am Institut etabliert werden. Im Vergleich zu anderen Methoden zur Expressions-Reduktion wie Antisense-Oligonukleotide, Ribozyme oder Inhibitoren der Signaltransduktion, gilt der Einsatz von RNAi als sehr viel effizienter und spezifischer [152, 198-200]. Die Inhibierung der Expression durch RNAi ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Zelltyp, Stärke der Expression, Rate des RNAi vermittelten mRNA-Abbaus, Halbwertszeit des Proteins und die Sekundärstruktur der mRNA spielen dabei eine wichtige Rolle [152, 198, 200]. Entscheidend für die Effizienz der RNAi ist allerdings die gewählte Zielsequenz auf der mRNA. Um mittels transienter Transfektion verschiedene Zielsequenzen austesten zu können, muss eine hohe Transfizierbarkeit der Zellen gewährleistet sein.

4.4.2.2 Optimierung der Transfektionseffizienz

Für die Transfektionen wurden kationische Lipide eingesetzt, die einen Komplex mit der siRNA bilden, der endozytotisch aufgenommen wird. Es wurden drei verschiedene kationische Lipide getestet: Lipofectamin (Invitrogen), dessen Vorgänger Lipofectin eines der ersten erfolgreich verwendeten Transfektionsreagenzien für siRNA war, Oligofectamin (Invitrogen) und RNAifect (Qiagen) [199, 201]. Für die Optimierung der Transfektionsbedingungen wurde eine unspezifische Fluoreszenzmarkierte siRNA verwendet. Es konnten Transfektionseffizienzen von über 90% erreicht werden. Die Übertragung der optimierten Bedingungen auf eine EMMPRIN-spezifische siRNA zeigte allerdings keinen Einfluss auf die EMMPRIN-Expression in den MDA-MB-231 Zellen. Ein Nachteil der Fluoreszenz-markierten siRNA war die geringe Haltbarkeit der Fluoreszenz von maximal 8 h. Es ist bekannt, dass die Aufnahme von siRNA nach 2 – 4 h ihr Maximum erreicht [202]. Die toxischen Effekte der Transfektion setzen aber erst sehr viel später ein, so dass eine Bestimmung der vital transfizierten Zellen mit dieser Methode nicht möglich war. Zudem ist es schwierig, zu unterscheiden, ob die Fluoreszenzmarkierten siRNAs von den Zellen aufgenommen wurden oder sie nur auf der Zellmembran angeheftet sind.

Die weitere Optimierung wurde deshalb mit einer validierten siRNA gegen die MAPK1 an den leichter zu transfizierenden HeLa-Zellen durchgeführt. Die unter diesen

Bedingungen durchgeführten Transfektionen brachten mit den gegen EMMPRIN gerichteten siRNAs die gewünschte Reduktion, und es konnte eine geeignete Zielsequenz für die Generierung eines siRNA-Expressionsvektor ausgewählt werden.

4.4.2.3 Stabiler Knock-Down von EMMPRIN mittels RNAi

Der Vektor pSilencer H1 (s. 2.5.3) ist nach dem gleichen Prinzip aufgebaut, wie der erste für RNAi entwickelte Vektor pSuper von Brummelkamp und Mitarbeitern [154]. Die Insertion der siRNA-spezifischen Sequenz erfolgt ebenfalls nach dem von Brummelkamp beschriebenen Prinzip [154]. Durch die stabile Transfektion der MDA-MB-231 Zellen mit dem Vektor pSilencer-siEMMPRIN wurden Zelllinien generiert, die einen unterschiedlichen EMMPRIN-Expressions-Level zeigten. Dieses weist darauf hin, dass ähnlich wie bei Plasmid-Transfektionen zur Expression von Proteinen, der Ort der Integration ins Genom einen Einfluss auf das Expressions-Niveau der siRNA und damit auf die Effizienz des Knock-Downs hat. Insgesamt lieferte die Methode der Vektor-vermittelten RNAi sehr gute Silencing-Effekte.

4.4.3 Korrelation zwischen EMMPRIN-Expression und Proliferation

In der in dieser Arbeit durchgeführten histologischen Untersuchungen der primären Mammakarziome wurde eine positive Korrelation zwischen EMMPRIN, dem mitotischen Index und der Tumorgroße gezeigt. In einer weiteren Studie unseres Institutes wurde darüber hinaus eine Korrelation zwischen der EMMPRIN-Expression und dem Proliferationsmarker Ki67 nachgewiesen [83]. EMMPRIN kann durch die Stimulierung der MMP-Expression, die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus der EZM fördern. Es lässt sich daher nicht sagen, ob die EMMPRIN-Expression im Primärtumor direkt auf die Proliferation der Tumorzellen wirkt, oder ob die Proliferation durch freigesetzte Wachstumsfaktoren aktiviert wird.

Die RNAi-vermittelte Reduzierung der EMMPRIN-Expression in den MDA-MB-231 Zellen zeigte *in vitro* keinen Einfluss auf die Proliferation. Dieses Ergebnis entspricht den Untersuchungen von Zucker et al.. Auch Zucker und Mitarbeiter konnten durch eine Überexpression von EMMPRIN in den MDA-MB-436 Zellen keinen Einfluss auf die Proliferation beobachten [164]. Im Gegensatz dazu zeigten Xu und Hemler, dass die Reduktion der EMMPRIN-Expression in HEK293-Zellen zu einer verminderten Proliferation führt [197]. Xu et al. konnten nachweisen, dass EMMPRIN in der

Zellmembran der HEK293-Zellen als Komplex vorliegt mit den Proteinen: LAT1 (L-Typ Aminosäure-Transporter), MCT (Monokarboxylat-Transporter) und CD98hc. Xu et al. konnten weiter zeigen, dass eine Reduktion der EMMPRIN-Expression zu einem verminderten Transport des metabolisch wichtigen Transporter LAT1 in die Membran führt. Auch die Lokalisation von MCT1 und MCT4 in der Membran sind abhängig von der EMMPRIN-Expression [117]. Vermutlich führt in den von Xu et al. untersuchten HEK293-Zellen die verminderte EMMPRIN-Expression zu einem verminderten Metabolismus der Zelle und somit zu einer Reduktion der Proliferation.

Die widersprüchlichen Ergebnisse zum Einfluss von EMMPRIN auf die Proliferation, könnten durch unterschiedliche Glykosylierungen der EMMPRIN-Proteine und damit verbundenen unterschiedlichen Funktionen in den untersuchten Zelllinien begründet sein. Eventuell sind die Zelllinien in ihrem Metabolismus auch nicht im gleichen Maße abhängig von dem CD98hc-Komplex.

4.4.4 Effekte der EMMPRIN-RNAi auf die MMP-Produktion

MMPs werden im Primärtumor auch von Tumorzellen, hauptsächlich aber von assoziierten Fibroblasten exprimiert [38]. Die Untersuchung der MMP-Expression in den MDA-MB-231 Zellen zeigte eine deutliche Expression von MMP-1 und -3. Nicht nachgewiesen werden konnte die Expression von MMP-2 und -9. Die Reduktion der EMMPRIN-Expression durch RNAi zeigte keine Effekte auf die MMP-1- und -3-Produktion. EMMPRIN scheint somit nicht durch autokrine Mechanismen die Produktion von MMP-1 und -3 zu regulieren, wie es für die MMP-2-Expression von MDA-MB-435 Zellen beschrieben wurde. Sun und Mitarbeiter konnten zeigen, dass sowohl Antikörper gegen EMMPRIN als auch ein unvollständig glykosyliertes, rekombinantes EMMPRIN-Protein die MMP-2-Produktion der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-435 inhibieren [100]. In der Studie von Sun et al. konnten in dem gleichen Versuch keine Veränderung der MMP-9-Expression festgestellt werden [100]. Die MMP-1-, -3- und -9-Expression von Tumorzellen scheint somit im Gegensatz zur MMP-2 Expression nicht durch EMMPRIN kontrolliert zu werden.

Eine EMMPRIN-abhängige MMP-Expression wurde in verschiedenen Studien an Tumorzell/Fibroblasten Co-Kulturen gezeigt [100, 134-136, 203]. In den in dieser Arbeit durchgeführten Stimulationsversuchen von Fibroblasten durch Tumorzellen konnte ein schwacher Einfluss von EMMPRIN auf die MMP-2-Expression und die Expression der

aktiven MMP-9-Form der Fibroblasten, aber kein Einfluss auf die proMMP-9-Expression gezeigt werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Studie von Sun et al., die an Versuchen mit MDA-MB-435 Zellen und dermalen Fibroblasten ebenfalls zeigen konnte, dass die MMP-2-Expression durch EMMPRIN gesteigert wird [100]. Die Ergebnisse widersprechen aber z.B. den Untersuchungen von Tang et al., der in MDA-MB-231 Zellen beobachtet hat, dass EMMPRIN auch die proMMP-9-Expression in Fibroblasten aktiviert [136, 203]. Eine mögliche Ursache für die widersprüchlichen Ergebnisse könnten die verwendeten Fibroblasten sein. In allen *in vitro* Studien wurden primäre dermale Fibroblasten verwendet. Schon 1989 haben Prescott und Mitarbeiter gezeigt, dass dermale Fibroblasten von unterschiedlichen Spendern nach Stimulation durch Tumorzellen nicht in gleicher Weise die MMP-Produktion aktivieren [204].

4.4.5 Bedeutung von EMMPRIN für die Migration

Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass EMMPRIN mit den $\alpha_3\beta_1$ - und $\alpha_6\beta_1$ -Integrinen in der Zellmembran assoziiert ist [99, 104, 205]. Integrine sind eine große Familie von Zelladhäsionsmolekülen, die Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix-Kontakte vermitteln [206]. Integrine können darüber hinaus über Adaptorproteine Proliferation und Überlebensmechanismen steuern [207, 208]. Vermutlich aktiviert auch EMMPRIN über die Interaktion mit Integrinen den FAK-Signalweg [140-142]. Epitheliale Tumorzellen können durch Aktivierung des FAK-Signalweges der Apoptose, die bei Verlust des Substratkontakts aktiviert wird, entgehen [209]. Aber nicht nur die Wechselwirkung von EMMPRIN mit Integrinen weist daraufhin, dass EMMPRIN ein wichtiges Zelladhäsionsmolekül in der Tumorprogression sein könnte. Auch Untersuchungen an der humanen Monocyten-Zelllinie U937 haben gezeigt, dass EMMPRIN Integrin-unabhängig Zellaggregation fördern kann [210].

Mit Hilfe eines 3D-Modells sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob EMMPRIN auch einen Einfluss auf die Zellaggregation und Migration von Tumorzellen hat. Um die Bedingungen im Tumor besser nachzustellen, wurden die Tumorzellen nicht als Einzelzellen, sondern in Form von Aggregaten (Sphäroiden) untersucht. Die Sphäroide wurden in einer Kollagen I Matrix eingegossen und über 48 h gefilmt. Kollagen I ist der Hauptbestandteil der interstitiellem Bindegewebefibrillen. Metastasierende Tumorzellen müssen sowohl bei der Invasion wie auch für die Extravasation durch das interstitielle Bindegewebe des jeweiligen Organs migrieren. In dem ausgewählten Modellsystem

konnten keine Effekte von EMMPRIN auf die Auflösung von Zell-Zell-Kontakten oder auf die Migration festgestellt werden. Die mittels RNAi in der EMMPRIN-Expression reduzierten Zelllinien zeigten keine Unterschiede zur Ursprungszelllinie. Auffällig waren in ihrem Migrationsverhalten dagegen die Vektor-transfizierten Kontroll-Zelllinien VP1 und VP12. Die Zellen dieser Zelllinien lösten sich sehr langsam aus den Sphäroiden.

Die Zelllinie MDA-MB-231 ist im Xenograft-Modell eine der aggressivsten Mammakarzinomzelllinien. Das Genom dieser Zelllinie zeigt starke genetische Abberationen. So fehlen zum Beispiele fast vollständig die Chromosomenarme 13p und 14p [211]. Es ist davon auszugehen, dass das Genom insgesamt sehr instabil ist und es dadurch zur Entstehung von genomisch-veränderten Subklonen kommt, die sich auch phänotypisch von der Ursprungs-Zelllinie unterscheiden. Verschiedene Arbeiten konnten für die MDA-MB-231 Zelllinie nachweisen, dass die Isolierung von Subklonen, die einen eher epithelialen Phänotyp im Vergleich zur Ursprungs-Zelllinie besitzen, möglich ist [212]. Die isolierten Subklone waren meistens im Xenograft-Modell weniger tumorigen als die ursprünglichen MDA-MB-231 Zellen [212, 213]. Zur Aufklärung, ob es sich bei den von mir verwendeten Kontroll-Zelllinien VP1 und VP12 um spezielle Subklone der Zelllinie handelt, oder ob das besondere Verhalten durch den Kontrollvektor verursacht wird, müssten in weiteren Studien eine größere Anzahl an Vektor-transfizierten Zelllinien analysiert werden.

Auch könnten für die mögliche Rolle von EMMPRIN als Adhäsionsmolekül andere Matrixbestandteile wie Laminin oder Fibronectin von größerer Bedeutung als Kollagen I sein. Fibronectin und Laminin sind Liganden für die EMMPRIN assoziierten Integrine [206]. Auch in der Interaktion von Fibroblasten mit Tumorzellen könnte EMMPRIN eine wichtige Rolle als Adhäsionsmolekül spielen. Fibroblasten zeigen einen intensiven „Cross-Talk“ mit angrenzenden Tumorzellen, wodurch verschiedene Mechanismen initiiert werden, die die Tumorprogression sowohl fördern als auch hemmen können [38, 214, 215]. Auch hier wären weitere Funktionen von EMMPRIN als Adaptorprotein denkbar.

4.5 Ausblick

EMMPRIN konnte in der histologischen Studie mit verschiedenen Risikofaktoren assoziiert werden. Eine positive EMMPRIN-Färbung korrelierte darüber hinaus mit einem schlechteren tumorspezifischen Überleben. In den funktionellen *in vitro* Untersuchungen

zeigte EMMPRIN keinen direkten Einfluss auf die Proliferation oder Migration der Tumorzellen. Da die *in vitro* Versuche ohne assoziierte Zellen wie Fibroblasten oder immunologischen Zellen durchgeführt wurden, spiegeln sie jedoch nicht die komplexen Interaktionen, die innerhalb eines Tumors stattfinden, wieder. In weiterführenden Studien sollten *in vitro*- und *in vivo*-Modelle verwendet werden, die stärker die Interaktion von Tumorzellen und assoziierten Zellen beleuchten. Unter diesem Aspekt wurden in einem ersten Pilotversuch die EMMPRIN-reduzierten MDA-MB-231 Zellen im Vergleich zur parentalen Zelllinie im Xenograft-Modell untersucht. Das Experiment konnte allerdings im Rahmen der Doktorarbeit noch nicht abgeschlossen werden. Auch hinsichtlich der Interaktion von Tumorzellen mit Zellen des Immunsystems könnte EMMPRIN eine wichtige Funktion einnehmen. Verschiedene Untersuchungen an T-Lymphozyten haben gezeigt, dass EMMPRIN wichtig ist für die Reifung von T-Zellen, aber auch für deren Aktivierung [86, 216-218].

EMMPRIN - ein therapeutisches Angriffsziel?

Das humane EMMPRIN wurde in der vorliegenden Arbeit das erste Mal als Träger von Lewis^X-Gruppen beschrieben. Muramatsu et al. zeigten, dass auch das murine EMMPRIN ein Träger von Lewis^X-Gruppen in der Embryonalentwicklung ist [187]. Ob EMMPRIN auch in der humanen Embryonalentwicklung Lewis^X-Gruppen trägt, ist noch nicht untersucht. Die Expression von embryonalen Marker-Proteinen ist allerdings charakteristisch für Tumorzellen. Viele Mechanismen wie z.B. EMT, Proliferation, Gewebeumbau und Angiogenese sind sowohl für die Embryonal-Entwicklung wie auch für die Tumorprogression wichtig [219, 220]. Häufig sind Proteine in der Embryonalentwicklung und in der Tumorprogression für ihre speziellen Funktionen posttranslational anders modifiziert als im normalen adulten Gewebe [187, 221]. Dies macht sie zu potenziellen Angriffszielen für Anti-Tumor-Therapien.

Die hier identifizierten strukturell unterschiedlichen und wahrscheinlich auch funktionell unterschiedlichen EMMPRIN-Moleküle in Tumoren mit identischem histologischen Ursprung zeigen die Notwendigkeit der Entwicklung monoklonaler Antikörper, die spezifisch die unterschiedlichen EMMPRIN-Isoformen erkennen. In einer Studie unseres Institutes konnte an verschiedenen humanen Geweben gezeigt werden, dass hauptsächlich epitheliale Zellen, aber auch Keimzellen, Myozyten des linken Herzventrikels und vaskuläre Endothelzellen des Gehirns EMMPRIN exprimieren [193]. Andere Arbeiten bestätigen ebenfalls die Expression von EMMPRIN in lebenswichtigen

Organen [96]. Für einen Einsatz von EMMPRIN als therapeutisches Angriffsziel wäre eine differenziertere Analyse der Expression unter Berücksichtigung der EMMPRIN-Varianten in gesunden Geweben notwendig. Isoform-spezifische Antikörper könnten dazu beitragen, neue Wege zur Therapie und Prognose des Mammakarzinoms zu ebneten und gleichzeitig weitere Untersuchungen zur Biologie von EMMPRIN ermöglichen.

5. Zusammenfassung

EMMPRIN ist ein multifunktionelles Zelladhäsionsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie, das viele Schritte der Tumorprogression beeinflusst [96]. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der möglichen Rolle von EMMPRIN beim humanen Mammakarzinom. Es sollte nicht nur die Expression, posttranslationale Modifizierung und Sezernierung von EMMPRIN untersucht werden, sondern auch funktionelle Untersuchungen durchgeführt werden, um einen Einfluss von EMMPRIN auf die tumorbiologisch wichtigen Prozesse wie Proliferation, Migration und Expression von MMPs zu untersuchen.

Erstmals konnte in dieser Arbeit mit Hilfe der Tissue-Microarray-Technologie an über 2000 Mammakarzinomproben gezeigt werden, dass eine signifikante Korrelation zwischen EMMPRIN-Expression in primären Mammakarzinomen und der Überlebensrate der Patientinnen nach mehr als 10 Jahren Beobachtungszeit besteht. Weitere Studien zielten darauf ab, zu klären, ob EMMPRIN auch kausal an der Invasion und Metastasierung humaner Mammakarzinomzellen beteiligt ist.

Durch eine Expressionsstudien an 14 humanen Mammakarzinomzelllinien, die sich in ihrer Tumorigenität und ihrem metastatischen Potenzial *in vivo* unterscheiden, konnte gezeigt werden, dass die Mammakarzinomzelllinien zwei unterschiedliche Formen des reifen, vollständig posttranslational-modifizierten EMMPRIN-Moleküls exprimieren. Interessanterweise zeigte sich, dass eine Korrelation zwischen im Mausmodell aggressiveren Mammakarzinomzelllinien und der Expression eines EMMPRIN-Proteins mit einem Molekulargewicht von 45 kDa (H45-Form) besteht. Die Tatsache, dass die Existenz der verschiedenen EMMPRIN-Moleküle auch in humanen, primären Mammakarzinomen nachgewiesen werden konnte, unterstreicht die Bedeutung dieser Beobachtung. Die Expression unterschiedlicher EMMPRIN-Moleküle in humanen Mammakarzinomzellen wurde in dieser Arbeit das erste Mal gezeigt.

Im Weiteren sollte die molekulare Ursache für die Heterogenität der EMMPRIN-Moleküle ergründet werden. Es konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen EMMPRIN-Proteine nicht durch alternatives Spleißen der EMMPRIN-Primärtranskripte oder Mutationen entstehen. Die detaillierte molekulare Analyse der Kohlenhydratstrukturen wies stattdessen auf die Existenz unterschiedlich posttranslational-modifizierter EMMPRIN-Proteine hin. So konnte gezeigt werden, dass EMMPRIN-Moleküle zwar immer ausschließlich N-Glykosyliert sind und grundsätzlich β 1,6 verzweigte

Polylaktosamine tragen, darüber hinaus aber differenziell mit Lewis^X-Gruppen dekoriert sein können. Erstmals konnte in dieser Arbeit somit humanes EMMPRIN als Träger der biologisch und funktionell wichtigen Lewis^X-Kohlenhydratstruktur identifiziert werden.

Obwohl EMMPRIN als membranständiges und auch als sezerniertes Protein exprimiert wird, waren bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen unbekannt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass nur die reifen EMMPRIN-Moleküle, nicht aber das unvollständig-prozessierte EMMPRIN sezerniert wird. Die Hypothese, dass alternatives Spleißen der EMMPRIN-Primärtranskripte oder die Anwesenheit einer hydrophilen Aminosäure in der Transmembrandomäne von EMMPRIN in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein könnten, konnte u.a. durch zielgerichtete Mutagenese nicht bestätigt werden, so dass die molekularen Ursachen für die Sekretion von EMMPRIN an dieser Stelle nicht geklärt werden konnten.

Für die funktionelle Untersuchung von EMMPRIN musste zunächst die RNAi-Technologie etabliert werden. Mit dieser Methode gelang es anschließend, die EMMPRIN-Expression in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 stabil auf unter 10% zu reduzieren. Es konnte mit Hilfe dieses Modellsystems in ersten *in vitro* Untersuchungen kein Einfluss von EMMPRIN auf Proliferation, Zellaggregation und Migration in einer Kollagen I Matrix nachgewiesen werden. In Stimulations-Versuchen von primären Fibroblasten mit den MDA-MB-231 Transfektanten konnte allerdings ein schwacher positiver Einfluss von EMMPRIN auf die MMP-2- und MMP-9-Expression der Fibroblasten nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der histologischen Studie zeigten die Bedeutung von EMMPRIN für die Progression des Mammakarzinoms. Da in ersten *in vitro* Untersuchungen EMMPRIN nicht mit erhöhten Proliferation, veränderten Aggregation oder Migration assoziiert werden konnte, scheint für die verschiedenen Funktion von EMMPRIN eine Interaktion mit tumorassoziierten Zellen wie Fibroblasten oder tumor-infiltrierenden Immunzellen wichtig zu sein. Eine im Rahmen dieser Arbeit bereits initiierte Transplantation von MDA-MB-231 Transfektanden in immundefiziente Mäuse könnte zu einem besseren Verständnis der möglichen Funktion von EMMPRIN bei Zell-Zell-Interaktionen im Mammakarzinoms beitragen.

6. Literatur

1. Feinberg, A., *Breast Cancer Answers*, ed. C. Davis. 2005, Sudbury: Jones and Bartlett Publisher.
2. Hellman, S.H., JR, *Diseases of the breast*, ed. J.R.L. Harris, M.E.; Morrow, M.; Osborn, C.K. 2000, Philadelphia: Lippicott William and Willkins. 407-423.
3. Weigelt, B., J.L. Peterse, and L.J. van 't Veer, *Breast cancer metastasis: markers and models*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(8): p. 591-602.
4. Hutter, R.V., *At last--worldwide agreement on the staging of cancer*. Arch Surg, 1987. **122**(11): p. 1235-9.
5. Bloom, H.J.G. and W.W. Richardson, *Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases in which 359 have been followed for 15 years*. Brit.J.Cancer, 1957. **11**: p. 359.
6. Elston, C.W. and I.O. Ellis, *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*. Histopathology, 1991. **19**(5): p. 403-10.
7. Ali, S.M. and R.C. Coombes, *Endocrine-Responsive Breast Cancer And Strategies For Combating Resistance*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**: p. 101-112.
8. Page, D.L., *Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types*. Am J Surg Pathol, 1991. **15**(4): p. 334-49.
9. Koscielny, S., M. Tubiana, M.G. Le, A.J. Valleron, H. Mouriesse, G. Contesso, and D. Sarrazin, *Breast cancer: relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination*. Br J Cancer, 1984. **49**(6): p. 709-15.
10. Rosen, P.P., S. Groshen, P.E. Saigo, D.W. Kinne, and S. Hellman, *Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years*. J Clin Oncol, 1989. **7**(9): p. 1239-51.
11. Carter, C.L., C. Allen, and D.E. Henson, *Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases*. Cancer, 1989. **63**(1): p. 181-7.
12. de Mascarel, I., F. Bonichon, M. Durand, L. Mauriac, G. MacGrogan, I. Soubeyran, V. Picot, A. Avril, J.M. Coindre, and M. Trojani, *Obvious peritumoral emboli: an elusive prognostic factor reappraised. Multivariate analysis of 1320 node-negative breast cancers*. Eur J Cancer, 1998. **34**(1): p. 58-65.

13. Janicke, F., A. Prechtel, C. Thomssen, N. Harbeck, C. Meisner, M. Untch, C.G. Sweep, H.K. Selbmann, H. Graeff, and M. Schmitt, *Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1*. J.Natl.Cancer Inst., 2001. **93**: p. 913-920.
14. Yamauchi, H., V. Stearns, and D.F. Hayes, *The Role of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer*. Breast Cancer, 2001. **8**: p. 171-183.
15. Urruticoechea, A., I.E. Smith, and M. Dowsett, *Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(28): p. 7212-20.
16. Zaczek, A., B. Brandt, and K.P. Bielowski, *The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors and the consequences for therapeutic approaches*. Histol Histopathol, 2005. **20**(3): p. 1005-15.
17. Carter, P., L. Presta, C.M. Gorman, J.B. Ridgway, D. Henner, W.L. Wong, A.M. Rowland, C. Kotts, M.E. Carver, and H.M. Shepard, *Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(10): p. 4285-9.
18. Slamon, D. and M. Pegram, *Rationale for trastuzumab (Herceptin) in adjuvant breast cancer trials*. Semin.Oncol., 2001. **28**: p. 13-19.
19. Woelfle, U., J. Cloos, G. Sauter, L. Riethdorf, F. Janicke, P. van Diest, R. Brakenhoff, and K. Pantel, *Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5679-84.
20. van 't Veer, L.J., H. Dai, M.J. van de Vijver, Y.D. He, A.A. Hart, M. Mao, H.L. Peterse, K. van der Kooy, M.J. Marton, A. T. Witteveen, G.J. Schreiber, R.M. Kerkhoven, C. Roberts, P.S. Linsley, R. Bernards, and S.H. Friend, *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*. Nature, 2002. **415**(6871): p. 530-6.
21. Beckmann, M.W., D. Niederacher, H.G. Schnurch, B.A. Gusterson, and H.G. Bender, *Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity*. J Mol Med, 1997. **75**(6): p. 429-39.
22. Ponten, J., L. Holmberg, D. Trichopoulos, O.P. Kallioniemi, G. Kvale, A. Wallgren, and J. Taylor-Papadimitriou, *Biology and natural history of breast cancer*. Int J Cancer Suppl, 1990. **5**: p. 5-21.
23. Abba, M.C., J.A. Drake, K.A. Hawkins, Y. Hu, H. Sun, C. Notcovich, S. Gaddis, A. Sahin, K. Baggerly, and C.M. Aldaz, *Transcriptomic changes in human breast cancer progression as determined by serial analysis of gene expression*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(5): p. R499-513.
24. Aubele, M., M. Werner, and H. Hofler, *Genetic alterations in presumptive precursor lesions of breast carcinomas*. Anal Cell Pathol, 2002. **24**(2-3): p. 69-76.

25. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing.* N Engl J Med, 1986. **315**(26): p. 1650-9.
26. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer.* Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
27. Frixen, U.H., J. Behrens, M. Sachs, G. Eberle, B. Voss, A. Warda, D. Lochner, and W. Birchmeier, *E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells.* J Cell Biol, 1991. **113**(1): p. 173-85.
28. Pierceall, W.E., A.S. Woodard, J.S. Morrow, D. Rimm, and E.R. Fearon, *Frequent alterations in E-cadherin and alpha- and beta-catenin expression in human breast cancer cell lines.* Oncogene., 1995. **11**: p. 1319-1326.
29. Birkedal-Hansen, H., *Proteolytic remodeling of extracellular matrix.* Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(5): p. 728-35.
30. Frisch, S.M. and H. Francis, *Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis.* J Cell Biol, 1994. **124**(4): p. 619-26.
31. Orr, F.W. and H.H. Wang, *Tumor cell interactions with the microvasculature: a rate-limiting step in metastasis.* Surg Oncol Clin N Am, 2001. **10**(2): p. 357-81, ix-x.
32. Pauli, B.U. and C.L. Lee, *Organ preference of metastasis. The role of organ-specifically modulated endothelial cells.* Lab Invest, 1988. **58**(4): p. 379-87.
33. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 563-72.
34. Muller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M.E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S.N. Wagner, J.L. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui, and A. Zlotnik, *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis.* Nature, 2001. **410**(6824): p. 50-6.
35. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.* Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.
36. Kannagi, R., *Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer.* Glycoconj J, 1997. **14**(5): p. 577-84.
37. Matrisian, L.M., *The matrix-degrading metalloproteinases.* Bioessays, 1992. **14**(7): p. 455-63.
38. Egeblad, M. and Z. Werb, *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(3): p. 161-74.
39. Dano, K., J. Romer, B.S. Nielsen, S. Bjorn, C. Pyke, J. Rygaard, and L.R. Lund, *Cancer invasion and tissue remodeling--cooperation of protease systems and cell types.* Apmis, 1999. **107**(1): p. 120-7.

40. Overall, C.M. and C. Lopez-Otin, *Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(9): p. 657-72.
41. Xu, J., D. Rodriguez, E. Petitclerc, J.J. Kim, M. Hangai, Y.S. Moon, G.E. Davis, and P.C. Brooks, *Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo*. J Cell Biol, 2001. **154**(5): p. 1069-79.
42. Bergers, G., R. Brekken, G. McMahon, T.H. Vu, T. Itoh, K. Tamaki, K. Tanzawa, P. Thorpe, S. Itohara, Z. Werb, and D. Hanahan, *Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(10): p. 737-44.
43. Murphy, G. and V. Knauper, *Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain?* Matrix Biol, 1997. **15**(8-9): p. 511-8.
44. Johansson, N. and V.M. Kahari, *Matrix metalloproteinases in squamous cell carcinoma*. Histol Histopathol, 2000. **15**(1): p. 225-37.
45. McCawley, L.J. and L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!* Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(5): p. 534-40.
46. Fidler, I.J., *Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine*. J Natl Cancer Inst, 1970. **45**(4): p. 773-82.
47. Liotta, L.A. and E. Kohn, *Cancer invasion and metastases*. Jama, 1990. **263**(8): p. 1123-6.
48. Ewing, J., *A treatise on tumours*. 3rd edn. ed. 1928, Philadesphia: Saunders, W.B.
49. Weiss, L., K. Haydock, J.W. Pickren, and W.W. Lane, *Organ vascularity and metastatic frequency*. Am J Pathol, 1980. **101**(1): p. 101-14.
50. Paget, S., *the distribution of secondary growths in cancer of the breast*. Lancet, 1889. **1**: p. 99-101.
51. Hauschka, P.V., T.L. Chen, and A.E. Mavrakos, *Polypeptide growth factors in bone matrix*. Ciba Found Symp, 1988. **136**: p. 207-25.
52. Lindemann, F., G. Schlimok, P. Dirschedl, J. Witte, and G. Riethmuller, *Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients*. Lancet, 1992. **340**(8821): p. 685-9.
53. Liotta, L.A., J. Kleinerman, and G.M. Saidel, *Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation*. Cancer Res, 1974. **34**(5): p. 997-1004.
54. Uhr, J.W., R.H. Scheuermann, N.E. Street, and E.S. Vitetta, *Cancer dormancy: opportunities for new therapeutic approaches*. Nat Med, 1997. **3**(5): p. 505-9.

55. Pantel, K., R.J. Cote, and O. Fodstad, *Detection and clinical importance of micrometastatic disease*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(13): p. 1113-24.
56. Dearnaley, D.P., J.P. Sloane, M.G. Ormerod, K. Steele, R.C. Coombes, H.M. Clink, T.J. Powles, H.T. Ford, J.C. Gazet, and A.M. Neville, *Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen*. Br J Cancer, 1981. **44**(1): p. 85-90.
57. Coombes, R.C., D.P. Dearnaley, R. Buckman, J.M. Jones, M.G. Ormerod, J.P. Sloane, T.J. Powles, J.C. Gazet, H.T. Ford, and A.M. Neville, *Detection of bone metastases in patients with breast cancer*. Invasion Metastasis, 1982. **2**(3): p. 177-84.
58. Schlimok, G., I. Funke, B. Holzmann, G. Gottlinger, G. Schmidt, H. Hauser, S. Swierkot, H.H. Warnecke, B. Schneider, H. Koprowski, and et al., *Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(23): p. 8672-6.
59. Pantel, K., G. Schlimok, M. Angstwurm, D. Weckermann, W. Schmaus, H. Gath, B. Passlick, J.R. Izbicki, and G. Riethmuller, *Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow*. J Hematother, 1994. **3**(3): p. 165-73.
60. Pantel, K. and R.H. Brakenhoff, *Dissecting the metastatic cascade*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(6): p. 448-56.
61. Braun, S., K. Pantel, P. Muller, W. Janni, F. Hepp, C.R. Kentenich, S. Gastroph, A. Wischnik, T. Dimpfl, G. Kindermann, G. Riethmuller, and G. Schlimok, *Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer*. N Engl J Med, 2000. **342**(8): p. 525-33.
62. Wiedswang, G., E. Borgen, R. Karesen, G. Kvalheim, J.M. Nesland, H. Qvist, E. Schlichting, T. Sauer, J. Janbu, T. Harbitz, and B. Naume, *Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(18): p. 3469-78.
63. Gebauer, G., T. Fehm, E. Merkle, E.P. Beck, N. Lang, and W. Jager, *Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up*. J Clin Oncol, 2001. **19**(16): p. 3669-74.
64. Gerber, B., A. Krause, H. Muller, D. Richter, T. Reimer, J. Makovitzky, C. Herrnring, U. Jeschke, G. Kundt, and K. Friese, *Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors*. J Clin Oncol, 2001. **19**(4): p. 960-71.
65. Janni, W., B. Rack, C. Schindlbeck, B. Strobl, D. Rjosk, S. Braun, H. Sommer, K. Pantel, B. Gerber, and K. Friese, *The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence*. Cancer, 2005. **103**(5): p. 884-91.

66. Janni, W., F. Hepp, D. Rjosk, C. Kentenich, B. Strobl, C. Schindlbeck, P. Hantschmann, H. Sommer, K. Pantel, and S. Braun, *The fate and prognostic value of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with breast carcinoma between primary treatment and recurrence*. *Cancer*, 2001. **92**(1): p. 46-53.
67. Braun, S., C. Kentenich, W. Janni, F. Hepp, J. de Waal, F. Willgeroth, H. Sommer, and K. Pantel, *Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients*. *J Clin Oncol*, 2000. **18**(1): p. 80-6.
68. Braun, S., F.D. Vogl, B. Naume, W. Janni, M.P. Osborne, R.C. Coombes, G. Schlimok, I.J. Diel, B. Gerber, G. Gebauer, J.Y. Pierga, C. Marth, D. Oruzio, G. Wiedswang, E.F. Solomayer, G. Kundt, B. Strobl, T. Fehm, G.Y. Wong, J. Bliss, A. Vincent-Salomon, and K. Pantel, *A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(8): p. 793-802.
69. Cote, R.J., P.P. Rosen, M.L. Lesser, L.J. Old, and M.P. Osborne, *Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases*. *J Clin Oncol*, 1991. **9**(10): p. 1749-56.
70. Pantel, K., A. Dickmanns, A. Zippelius, C. Klein, J. Shi, W. Hoechtlen-Vollmar, G. Schlimok, D. Weckermann, R. Oberneder, E. Fanning, and et al., *Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel source of tumor cell vaccines*. *J Natl Cancer Inst*, 1995. **87**(15): p. 1162-8.
71. Putz, E., K. Witter, S. Offner, P. Stosiek, A. Zippelius, J. Johnson, R. Zahn, G. Riethmuller, and K. Pantel, *Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases*. *Cancer Res*, 1999. **59**(1): p. 241-8.
72. Willipinski-Stapelfeldt, B., S. Riethdorf, V. Assmann, U. Woelfle, T. Rau, G. Sauter, J. Heukeshoven, and K. Pantel, *Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(22): p. 8006-14.
73. Birchmeier, C., W. Birchmeier, and B. Brand-Saberi, *Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression*. *Acta Anat (Basel)*, 1996. **156**(3): p. 217-26.
74. Offner, S., W. Schmaus, K. Witter, G.B. Baretton, G. Schlimok, B. Passlick, G. Riethmuller, and K. Pantel, *p53 gene mutations are not required for early dissemination of cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(12): p. 6942-6.
75. Klein, C.A., T.J.F. Blankenstein, O. Schmidt-Kittler, M. Petronio, B. Polzer, N.H. Stoecklein, and R. G., *Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer*. *The Lancet*, 2002. **360**: p. 683-689.
76. Riesenberger, R., R. Oberneder, M. Kriegmair, M. Epp, U. Bitzer, A. Hofstetter, S. Braun, G. Riethmuller, and K. Pantel, *Immunocytochemical double staining of cytokeratin and prostate specific antigen in individual prostatic tumour cells*. *Histochemistry*, 1993. **99**(1): p. 61-6.

77. Pantel, K., G. Schlimok, S. Braun, D. Kutter, F. Lindemann, G. Schaller, I. Funke, J.R. Izbicki, and G. Riethmuller, *Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells*. J Natl Cancer Inst, 1993. **85**(17): p. 1419-24.
78. Braun, S. and K. Pantel, *Prognostic significance of micrometastatic bone marrow involvement*. Breast Cancer Res Treat, 1998. **52**(1-3): p. 201-16.
79. Pantel, K., G. Schlimok, D. Kutter, G. Schaller, T. Genz, B. Wiebecke, R. Backmann, I. Funke, and G. Riethmuller, *Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells*. Cancer Res, 1991. **51**(17): p. 4712-5.
80. Braun, S., F. Hepp, H.L. Sommer, and K. Pantel, *Tumor-antigen heterogeneity of disseminated breast cancer cells: implications for immunotherapy of minimal residual disease*. Int J Cancer, 1999. **84**(1): p. 1-5.
81. Thurm, H., S. Ebel, C. Kentenich, A. Hensen, S. Riethdorf, C. Coith, D. Wallwiener, S. Braun, C. Oberhoff, F. Janicke, and K. Pantel, *Rare expression of epithelial cell adhesion molecule on residual micrometastatic breast cancer cells after adjuvant chemotherapy*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(7): p. 2598-604.
82. Braun, S., B.S. Cevatli, C. Assemi, W. Janni, C.R. Kentenich, C. Schindlbeck, D. Rjosk, and F. Hepp, *Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy*. J Clin Oncol, 2001. **19**(5): p. 1468-75.
83. Reimers, N., K. Zafrakas, V. Assmann, C. Egen, L. Riethdorf, S. Riethdorf, J. Berger, S. Ebel, F. Janicke, G. Sauter, and K. Pantel, *Expression of extracellular matrix metalloproteases inducer on micrometastatic and primary mammary carcinoma cells*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(10): p. 3422-8.
84. Hensen, A., L. Riethdorf, N. Brunner, J. Berger, S. Ebel, C. Thomssen, F. Janicke, and K. Pantel, *Comparative evaluation of urokinase-type plasminogen activator receptor expression in primary breast carcinomas and on metastatic tumor cells*. Int J Cancer, 2003. **107**(6): p. 903-9.
85. Muramatsu, T. and T. Miyauchi, *Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion*. Histol Histopathol, 2003. **18**(3): p. 981-7.
86. Koch, C., G. Staffler, R. Huttinger, I. Hilgert, E. Prager, J. Cerny, P. Steinlein, O. Majdic, V. Horejsi, and H. Stockinger, *T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density*. Int Immunol, 1999. **11**(5): p. 777-86.
87. Miyauchi, T., T. Kanekura, A. Yamaoka, M. Ozawa, S. Miyazawa, and T. Muramatsu, *Basigin, a new, broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homology with both the immunoglobulin V domain and the beta-chain of major histocompatibility complex class II antigen*. J Biochem (Tokyo), 1990. **107**(2): p. 316-23.

88. Seulberger, H., F. Lottspeich, and W. Risau, *The inducible blood--brain barrier specific molecule HT7 is a novel immunoglobulin-like cell surface glycoprotein*. *Embo J*, 1990. **9**(7): p. 2151-8.
89. Miyauchi, T., Y. Masuzawa, and T. Muramatsu, *The basigin group of the immunoglobulin superfamily: complete conservation of a segment in and around transmembrane domains of human and mouse basigin and chicken HT7 antigen*. *J Biochem (Tokyo)*, 1991. **110**(5): p. 770-4.
90. Fossum, S., S. Mallett, and A.N. Barclay, *The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence*. *Eur J Immunol*, 1991. **21**(3): p. 671-9.
91. Biswas, C., *Tumor cell stimulation of collagenase production by fibroblasts*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982. **109**(3): p. 1026-34.
92. Biswas, C., *Collagenase stimulation in cocultures of human fibroblasts and human tumor cells*. *Cancer Lett*, 1984. **24**(2): p. 201-7.
93. Ellis, S.M., K. Nabeshima, and C. Biswas, *Monoclonal antibody preparation and purification of a tumor cell collagenase-stimulatory factor*. *Cancer Res*, 1989. **49**(12): p. 3385-91.
94. Basset, P., J.P. Bellocq, C. Wolf, I. Stoll, P. Hutin, J.M. Limacher, O.L. Podhajcer, M.P. Chenard, M.C. Rio, and P. Chambon, *A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas*. *Nature*, 1990. **348**(6303): p. 699-704.
95. Hewitt, R. and K. Dano, *Stromal cell expression of components of matrix-degrading protease systems in human cancer*. *Enzyme Protein*, 1996. **49**(1-3): p. 163-73.
96. Yan, L., S. Zucker, and B.P. Toole, *Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression*. *Thromb Haemost*, 2005. **93**(2): p. 199-204.
97. Biswas, C., Y. Zhang, R. DeCastro, H. Guo, T. Nakamura, H. Kataoka, and K. Nabeshima, *The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily*. *Cancer Res*, 1995. **55**(2): p. 434-9.
98. Seulberger, H., C.M. Unger, and W. Risau, *HT7, Neurothelin, Basigin, gp42 and OX-47--many names for one developmentally regulated immuno-globulin-like surface glycoprotein on blood-brain barrier endothelium, epithelial tissue barriers and neurons*. *Neurosci Lett*, 1992. **140**(1): p. 93-7.
99. Reed, B.H., R. Wilk, F. Schock, and H.D. Lipshitz, *Integrin-dependent apposition of Drosophila extraembryonic membranes promotes morphogenesis and prevents anoikis*. *Curr Biol*, 2004. **14**(5): p. 372-80.

100. Sun, J. and M.E. Hemler, *Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions*. *Cancer Res*, 2001. **61**(5): p. 2276-81.
101. Nabeshima, K., J. Suzumiya, M. Nagano, K. Ohshima, B.P. Toole, K. Tamura, H. Iwasaki, and M. Kikuchi, *Emmprin, a cell surface inducer of matrix metalloproteinases (MMPs), is expressed in T-cell lymphomas*. *J Pathol*, 2004. **202**(3): p. 341-51.
102. Li, R., L. Huang, H. Guo, and B.P. Toole, *Basigin (murine EMMPRIN) stimulates matrix metalloproteinase production by fibroblasts*. *J Cell Physiol*, 2001. **186**(3): p. 371-9.
103. Yoshida, S., M. Shibata, S. Yamamoto, M. Hagihara, N. Asai, M. Takahashi, S. Mizutani, T. Muramatsu, and K. Kadomatsu, *Homo-oligomer formation by basigin, an immunoglobulin superfamily member, via its N-terminal immunoglobulin domain*. *Eur J Biochem*, 2000. **267**(14): p. 4372-80.
104. Berditchevski, F., S. Chang, J. Bodorova, and M.E. Hemler, *Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that alpha3beta1 complexes with EMMPRIN/basigin/OX47/M6*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(46): p. 29174-80.
105. Tang, W. and M.E. Hemler, *Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(12): p. 11112-8.
106. Anderson, R.G., *The caveolae membrane system*. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 199-225.
107. Williams, T.M. and M.P. Lisanti, *Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005. **288**(3): p. C494-506.
108. Tang, W., S.B. Chang, and M.E. Hemler, *Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(9): p. 4043-50.
109. Guo, H., R. Li, S. Zucker, and B.P. Toole, *EMMPRIN (CD147), an inducer of matrix metalloproteinase synthesis, also binds interstitial collagenase to the tumor cell surface*. *Cancer Res*, 2000. **60**(4): p. 888-91.
110. Guo, H., G. Majmudar, T.C. Jensen, C. Biswas, B.P. Toole, and M.K. Gordon, *Characterization of the gene for human EMMPRIN, a tumor cell surface inducer of matrix metalloproteinases*. *Gene*, 1998. **220**(1-2): p. 99-108.
111. Miyauchi, T., F. Jimma, T. Igakura, S. Yu, M. Ozawa, and T. Muramatsu, *Structure of the mouse basigin gene, a unique member of the immunoglobulin superfamily*. *J Biochem (Tokyo)*, 1995. **118**(4): p. 717-24.
112. Liang, L., T. Major, and T. Bocan, *Characterization of the promoter of human extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN)*. *Gene*, 2002. **282**(1-2): p. 75-86.

113. Shi, Y., M.N. Simmons, T. Seki, S.P. Oh, and S.P. Sugrue, *Change in gene expression subsequent to induction of Pnn/DRS/memA: increase in p21(cip1/waf1)*. *Oncogene*, 2001. **20**(30): p. 4007-18.
114. Shi, Y., P. Ouyang, and S.P. Sugrue, *Characterization of the gene encoding pinin/DRS/memA and evidence for its potential tumor suppressor function*. *Oncogene*, 2000. **19**(2): p. 289-97.
115. Igakura, T., K. Kadomatsu, O. Taguchi, H. Muramatsu, T. Kaname, T. Miyauchi, K. Yamamura, K. Arimura, and T. Muramatsu, *Roles of basigin, a member of the immunoglobulin superfamily, in behavior as to an irritating odor, lymphocyte response, and blood-brain barrier*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **224**(1): p. 33-6.
116. Igakura, T., K. Kadomatsu, T. Kaname, H. Muramatsu, Q.W. Fan, T. Miyauchi, Y. Toyama, N. Kuno, S. Yuasa, M. Takahashi, T. Senda, O. Taguchi, K. Yamamura, K. Arimura, and T. Muramatsu, *A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis*. *Dev Biol*, 1998. **194**(2): p. 152-65.
117. Kirk, P., M.C. Wilson, C. Heddle, M.H. Brown, A.N. Barclay, and A.P. Halestrap, *CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression*. *Embo J*, 2000. **19**(15): p. 3896-904.
118. Wilson, M.C., D. Meredith, and A.P. Halestrap, *Fluorescence resonance energy transfer studies on the interaction between the lactate transporter MCT1 and CD147 provide information on the topology and stoichiometry of the complex in situ*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(5): p. 3666-72.
119. Spinale, F.G., M.L. Coker, L.J. Heung, B.R. Bond, H.R. Gunasinghe, T. Etoh, A.T. Goldberg, J.L. Zellner, and A.J. Crumbley, *A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure*. *Circulation*, 2000. **102**(16): p. 1944-9.
120. Li, Y.Y., C.F. McTiernan, and A.M. Feldman, *Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling*. *Cardiovasc Res*, 2000. **46**(2): p. 214-24.
121. Choi, E.Y., D. Kim, B.K. Hong, H.M. Kwon, Y.G. Song, K.H. Byun, H.Y. Park, K.C. Whang, and H.S. Kim, *Upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and gelatinases in human atherosclerosis infected with Chlamydia pneumoniae: the potential role of Chlamydia pneumoniae infection in the progression of atherosclerosis*. *Exp Mol Med*, 2002. **34**(6): p. 391-400.
122. Konttinen, Y.T., T.F. Li, J. Mandelin, M. Liljestrom, T. Sorsa, S. Santavirta, and I. Virtanen, *Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in rheumatoid synovium*. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(2): p. 275-80.

123. Tomita, T., T. Nakase, M. Kaneko, K. Shi, K. Takahi, T. Ochi, and H. Yoshikawa, *Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(2): p. 373-8.
124. Foda, H.D., E.E. Rollo, M. Drews, C. Conner, K. Appelt, D.R. Shalinsky, and S. Zucker, *Ventilator-induced lung injury upregulates and activates gelatinases and EMMPRIN: attenuation by the synthetic matrix metalloproteinase inhibitor, Prinomastat (AG3340)*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. **25**(6): p. 717-24.
125. Haseneen, N.A., G.G. Vaday, S. Zucker, and H.D. Foda, *Mechanical stretch induces MMP-2 release and activation in lung endothelium: role of EMMPRIN*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003. **284**(3): p. L541-7.
126. Basset, P., C. Wolf, and P. Chambon, *Expression of the stromelysin-3 gene in fibroblastic cells of invasive carcinomas of the breast and other human tissues: a review*. *Breast Cancer Res Treat*, 1993. **24**(3): p. 185-93.
127. Okada, A., J.P. Bellocq, N. Rouyer, M.P. Chenard, M.C. Rio, P. Chambon, and P. Basset, *Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(7): p. 2730-4.
128. Majmudar, G., B.R. Nelson, T.C. Jensen, J.J. Voorhees, and T.M. Johnson, *Increased expression of stromelysin-3 in basal cell carcinomas*. *Mol Carcinog*, 1994. **9**(1): p. 17-23.
129. Polette, M., C. Gilles, V. Marchand, M. Lorenzato, B. Toole, J.M. Tournier, S. Zucker, and P. Birembaut, *Tumor collagenase stimulatory factor (TCSF) expression and localization in human lung and breast cancers*. *J Histochem Cytochem*, 1997. **45**(5): p. 703-9.
130. Muraoka, K., K. Nabeshima, T. Murayama, C. Biswas, and M. Koono, *Enhanced expression of a tumor-cell-derived collagenase-stimulatory factor in urothelial carcinoma: its usefulness as a tumor marker for bladder cancers*. *Int J Cancer*, 1993. **55**(1): p. 19-26.
131. Davidson, B., I. Goldberg, A. Berner, G.B. Kristensen, and R. Reich, *EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) is a novel marker of poor outcome in serous ovarian carcinoma*. *Clin Exp Metastasis*, 2003. **20**(2): p. 161-9.
132. Sameshima, T., K. Nabeshima, B.P. Toole, K. Yokogami, Y. Okada, T. Goya, M. Koono, and S. Wakisaka, *Expression of emmprin (CD147), a cell surface inducer of matrix metalloproteinases, in normal human brain and gliomas*. *Int J Cancer*, 2000. **88**(1): p. 21-7.
133. Dalberg, K., E. Eriksson, U. Enberg, M. Kjellman, and M. Backdahl, *Gelatinase A, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and extracellular matrix metalloproteinase inducer mRNA expression: correlation with invasive growth of breast cancer*. *World J Surg*, 2000. **24**(3): p. 334-40.

134. Kataoka, H., R. DeCastro, S. Zucker, and C. Biswas, *Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase*. *Cancer Res*, 1993. **53**(13): p. 3154-8.
135. Guo, H., S. Zucker, M.K. Gordon, B.P. Toole, and C. Biswas, *Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(1): p. 24-7.
136. Tang, Y., P. Kesavan, M.T. Nakada, and L. Yan, *Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN*. *Mol Cancer Res*, 2004. **2**(2): p. 73-80.
137. Menashi, S., M. Serova, L. Ma, S. Vignot, S. Mourah, and F. Calvo, *Regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase expression by amphiregulin in transformed human breast epithelial cells*. *Cancer Res*, 2003. **63**(22): p. 7575-80.
138. Lim, M., T. Martinez, D. Jablons, R. Cameron, H. Guo, B. Toole, J.D. Li, and C. Basbaum, *Tumor-derived EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates collagenase transcription through MAPK p38*. *FEBS Lett*, 1998. **441**(1): p. 88-92.
139. Taylor, P.M., R.J. Woodfield, M.N. Hodgkin, T.R. Pettitt, A. Martin, D.J. Kerr, and M.J. Wakelam, *Breast cancer cell-derived EMMPRIN stimulates fibroblast MMP2 release through a phospholipase A(2) and 5-lipoxygenase catalyzed pathway*. *Oncogene*, 2002. **21**(37): p. 5765-72.
140. Marieb, E.A., A. Zoltan-Jones, R. Li, S. Misra, S. Ghatak, J. Cao, S. Zucker, and B.P. Toole, *Emmprin promotes anchorage-independent growth in human mammary carcinoma cells by stimulating hyaluronan production*. *Cancer Res*, 2004. **64**(4): p. 1229-32.
141. Ghatak, S., S. Misra, and B.P. Toole, *Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(41): p. 38013-20.
142. Ghatak, S., S. Misra, and B.P. Toole, *Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(10): p. 8875-83.
143. Yang, J.M., Z. Xu, H. Wu, H. Zhu, X. Wu, and W.N. Hait, *Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistant cancer cells*. *Mol Cancer Res*, 2003. **1**(6): p. 420-7.
144. Jiang, J.L., Q. Zhou, M.K. Yu, L.S. Ho, Z.N. Chen, and H.C. Chan, *The involvement of HAb18G/CD147 in regulation of store-operated calcium entry and metastasis of human hepatoma cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(50): p. 46870-7.

145. Streit, A., C.T. Yuen, R.W. Loveless, A.M. Lawson, J. Finne, B. Schmitz, T. Feizi, and C.D. Stern, *The Le(x) carbohydrate sequence is recognized by antibody to L5, a functional antigen in early neural development*. J Neurochem, 1996. **66**(2): p. 834-44.
146. Kruse, J., R. Mailhammer, H. Wernecke, A. Faissner, I. Sommer, C. Goridis, and M. Schachner, *Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1*. Nature, 1984. **311**(5982): p. 153-5.
147. Kucherer, A., A. Faissner, and M. Schachner, *The novel carbohydrate epitope L3 is shared by some neural cell adhesion molecules*. J Cell Biol, 1987. **104**(6): p. 1597-602.
148. Hobbs, S., S. Jitrapakdee, and J.C. Wallace, *Development of a bicistronic vector driven by the human polypeptide chain elongation factor 1alpha promoter for creation of stable mammalian cell lines that express very high levels of recombinant proteins*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **252**(2): p. 368-72.
149. Winnacker, E.L., *Gene und Klone: Einführung in die Gentechnologie*. 1985, Weinheim, Germany: VCH.
150. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
151. Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello, *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
152. Elbashir, S.M., J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel, and T. Tuschl, *Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate*. Embo J, 2001. **20**(23): p. 6877-88.
153. Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl, *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs*. Genes Dev, 2001. **15**(2): p. 188-200.
154. Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami, *A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells*. Science, 2002. **296**(5567): p. 550-3.
155. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
156. Wessel, D. and U.I. Flugge, *A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids*. Anal Biochem, 1984. **138**(1): p. 141-3.
157. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

158. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
159. Burnette, W.N., "*Western blotting*": *electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal Biochem, 1981. **112**(2): p. 195-203.
160. Birkedal-Hansen, H., *Current Protocols in Cell Biology*. 2003.
161. Simon, R. and G. Sauter, *Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors*. Exp Hematol, 2002. **30**(12): p. 1365-72.
162. Kaplan, E.L. and P. Meier, *Nonparametric Estimation from Incomplete Observations*. American Statistical Association Journal, 1958. **53**: p. 457-481.
163. Wagener, C., *Molekulare Onkologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart. New York. 1999.
164. Zucker, S., M. Hymowitz, E.E. Rollo, R. Mann, C.E. Conner, J. Cao, H.D. Foda, D.C. Tompkins, and B.P. Toole, *Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer*. Am J Pathol, 2001. **158**(6): p. 1921-8.
165. Ingolia, T.D. and E.A. Craig, *Drosophila gene related to the major heat shock-induced gene is transcribed at normal temperatures and not induced by heat shock*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(2): p. 525-9.
166. Lacroix, M. and G. Leclercq, *Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update*. Breast Cancer Res Treat, 2004. **83**(3): p. 249-89.
167. Daoud, S.S., C.W. Leathers, and J.M. Hurst, *p53 expression, growth, and spontaneous metastasis of the human GI 101 breast carcinoma in athymic nude mice*. J Exp Ther Oncol, 2002. **2**(2): p. 121-7.
168. Fadool, J.M. and P.J. Linser, *Differential glycosylation of the 5A11/HT7 antigen by neural retina and epithelial tissues in the chicken*. J Neurochem, 1993. **60**(4): p. 1354-64.
169. Hanna, S.M., P. Kirk, O.J. Holt, M.J. Puklavek, M.H. Brown, and A.N. Barclay, *A novel form of the membrane protein CD147 that contains an extra Ig-like domain and interacts homophilically*. BMC Biochem, 2003. **4**: p. 17.
170. Dennis, J.W., M. Granovsky, and C.E. Warren, *Glycoprotein glycosylation and cancer progression*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1473**(1): p. 21-34.
171. Chakraborty, A.K. and J.M. Pawelek, *GnT-V, macrophage and cancer metastasis: a common link*. Clin Exp Metastasis, 2003. **20**(4): p. 365-73.

172. Cummings, R.D. and S. Kornfeld, *Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosaccharides with immobilized Phaseolus vulgaris leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins*. J Biol Chem, 1982. **257**(19): p. 11230-4.
173. Heller, M., M. von der Ohe, R. Kleene, M.H. Mohajeri, and M. Schachner, *The immunoglobulin-superfamily molecule basigin is a binding protein for oligomannosidic carbohydrates: an anti-idiotypic approach*. J Neurochem, 2003. **84**(3): p. 557-65.
174. Hino, M., H. Doihara, K. Kobayashi, M. Aoe, and N. Shimizu, *Caveolin-1 as tumor suppressor gene in breast cancer*. Surg Today, 2003. **33**(7): p. 486-90.
175. Wiechen, K., L. Diatchenko, A. Agoulnik, K.M. Scharff, H. Schober, K. Arlt, B. Zhumabayeva, P.D. Siebert, M. Dietel, R. Schafer, and C. Sers, *Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene*. Am J Pathol, 2001. **159**(5): p. 1635-43.
176. Ellis, G., M. Ferguson, E. Yamanaka, R.B. Livingston, and A.M. Gown, *Monoclonal antibodies for detection of occult carcinoma cells in bone marrow of breast cancer patients*. Cancer, 1989. **63**(12): p. 2509-14.
177. Caudroy, S., M. Polette, J.M. Tournier, H. Burlet, B. Toole, S. Zucker, and P. Birembaut, *Expression of the extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and the matrix metalloproteinase-2 in bronchopulmonary and breast lesions*. J Histochem Cytochem, 1999. **47**(12): p. 1575-80.
178. Noguchi, Y., T. Sato, M. Hirata, T. Hara, K. Ohama, and A. Ito, *Identification and characterization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human endometrium during the menstrual cycle in vivo and in vitro*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(12): p. 6063-72.
179. Xiao, L.J., H. Chang, N.Z. Ding, H. Ni, K. Kadomatsu, and Z.M. Yang, *Basigin expression and hormonal regulation in mouse uterus during the peri-implantation period*. Mol Reprod Dev, 2002. **63**(1): p. 47-54.
180. Xiao, L.J., H.L. Diao, X.H. Ma, N.Z. Ding, K. Kadomatsu, T. Muramatsu, and Z.M. Yang, *Basigin expression and hormonal regulation in the rat uterus during the peri-implantation period*. Reproduction, 2002. **124**(2): p. 219-25.
181. Smart, E.J., G.A. Graf, M.A. McNiven, W.C. Sessa, J.A. Engelman, P.E. Scherer, T. Okamoto, and M.P. Lisanti, *Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(11): p. 7289-304.
182. Kanekura, T., T. Miyauchi, M. Tashiro, and T. Muramatsu, *Basigin, a new member of the immunoglobulin superfamily: genes in different mammalian species, glycosylation changes in the molecule from adult organs and possible variation in the N-terminal sequences*. Cell Struct Funct, 1991. **16**(1): p. 23-30.

183. Nehme, C.L., B.E. Fayos, and J.R. Bartles, *Distribution of the integral plasma membrane glycoprotein CE9 (MRC OX-47) among rat tissues and its induction by diverse stimuli of metabolic activation*. Biochem J, 1995. **310** (Pt 2): p. 693-8.
184. Matsusako, T., H. Muramatsu, T. Shirahama, T. Muramatsu, and Y. Ohi, *Expression of a carbohydrate signal, sialyl dimeric Le(x) antigen, is associated with metastatic potential of transitional cell carcinoma of the human urinary bladder*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **181**(3): p. 1218-22.
185. Shirahama, T., M. Ikoma, T. Muramatsu, and Y. Ohi, *Expression of SSEA-1 carbohydrate antigen correlates with stage, grade and metastatic potential of transitional cell carcinoma of the bladder*. J Urol, 1992. **148**(4): p. 1319-22.
186. Shirahama, T., M. Ikoma, H. Muramatsu, T. Muramatsu, and Y. Ohi, *Reactivity to fucose-binding proteins of Lotus tetragonolobus correlates with metastatic phenotype of transitional cell carcinoma of the bladder*. J Urol, 1992. **147**(6): p. 1659-64.
187. Muramatsu, T., *Protein-bound carbohydrates on cell-surface as targets of recognition: an odyssey in understanding them*. Glycoconj J, 2000. **17**(7-9): p. 577-95.
188. Zhang, Y., X.Y. Zhang, F. Liu, H.L. Qi, and H.L. Chen, *The roles of terminal sugar residues of surface glycans in the metastatic potential of human hepatocarcinoma*. J Cancer Res Clin Oncol, 2002. **128**(11): p. 617-20.
189. Ohyama, C., S. Tsuboi, and M. Fukuda, *Dual roles of sialyl Lewis X oligosaccharides in tumor metastasis and rejection by natural killer cells*. Embo J, 1999. **18**(6): p. 1516-25.
190. Ohyama, C., S. Kanto, K. Kato, O. Nakano, Y. Arai, T. Kato, S. Chen, M.N. Fukuda, and M. Fukuda, *Natural killer cells attack tumor cells expressing high levels of sialyl Lewis x oligosaccharides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(21): p. 13789-94.
191. Moretta, L., C. Bottino, D. Pende, M. Vitale, M.C. Mingari, and A. Moretta, *Human natural killer cells: Molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis*. Immunol Lett, 2005. **100**(1): p. 7-13.
192. Bird, J.M. and S.J. Kimber, *Oligosaccharides containing fucose linked alpha(1-3) and alpha(1-4) to N-acetylglucosamine cause decompaction of mouse morulae*. Dev Biol, 1984. **104**(2): p. 449-60.
193. Riethdorf, S., N. Reimers, V. Assmann, G. Sauter, and K. Pantel, *High incidence of EMMPRIN expression in human tumors*. Int J Cancer, 2005 (submitted).
194. Malissen, B. and M. Malissen, *Functions of TCR and pre-TCR subunits: lessons from gene ablation*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(3): p. 383-93.

195. Sidhu, S.S., A.T. Mengistab, A.N. Tauscher, J. LaVail, and C. Basbaum, *The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions*. *Oncogene*, 2004. **23**(4): p. 956-63.
196. Artelt, P., R. Grannemann, C. Stocking, J. Friel, J. Bartsch, and H. Hauser, *The prokaryotic neomycin-resistance-encoding gene acts as a transcriptional silencer in eukaryotic cells*. *Gene*, 1991. **99**(2): p. 249-54.
197. Xu, D. and M.E. Hemler, *Metabolic activation-related CD147-CD98 complex*. *Mol Cell Proteomics*, 2005. **4**(8): p. 1061-71.
198. Bass, B.L., *RNA interference. The short answer*. *Nature*, 2001. **411**(6836): p. 428-9.
199. Caplen, N.J., S. Parrish, F. Imani, A. Fire, and R.A. Morgan, *Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(17): p. 9742-7.
200. Scherr, M., M.A. Morgan, and M. Eder, *Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells*. *Curr Med Chem*, 2003. **10**(3): p. 245-56.
201. Li, Y., D. Dowbenko, and L.A. Lasky, *AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(13): p. 11352-61.
202. Holen, T., M. Amarzguioui, M.T. Wiiger, E. Babaie, and H. Prydz, *Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(8): p. 1757-66.
203. Tang, Y., M.T. Nakada, P. Kesavan, F. McCabe, H. Millar, P. Rafferty, P. Bugelski, and L. Yan, *Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases*. *Cancer Res*, 2005. **65**(8): p. 3193-9.
204. Prescott, J., N. Troccoli, and C. Biswas, *Coordinate increase in collagenase mRNA and enzyme levels in human fibroblasts treated with the tumor cell factor, TCSF*. *Biochem Int*, 1989. **19**(2): p. 257-66.
205. Curtin, K.D., I.A. Meinertzhagen, and R.J. Wyman, *Basigin (EMMPRIN/CD147) interacts with integrin to affect cellular architecture*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 12): p. 2649-60.
206. Ahmed, N., C. Riley, G. Rice, and M. Quinn, *Role of integrin receptors for fibronectin, collagen and laminin in the regulation of ovarian carcinoma functions in response to a matrix microenvironment*. *Clin Exp Metastasis*, 2005. **22**(5): p. 391-402.
207. Berman, A.E. and N.I. Kozlova, *Integrins: structure and functions*. *Membr Cell Biol*, 2000. **13**(2): p. 207-44.
208. Wozniak, M.A., K. Modzelewska, L. Kwong, and P.J. Keely, *Focal adhesion regulation of cell behavior*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1692**(2-3): p. 103-19.

209. Frisch, S.M., K. Vuori, E. Ruoslahti, and P.Y. Chan-Hui, *Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase*. J Cell Biol, 1996. **134**(3): p. 793-9.
210. Cho, J.Y., D.A. Fox, V. Horejsi, K. Sagawa, K.M. Skubitz, D.R. Katz, and B. Chain, *The functional interactions between CD98, beta1-integrins, and CD147 in the induction of U937 homotypic aggregation*. Blood, 2001. **98**(2): p. 374-82.
211. Roschke, A.V., G. Tonon, K.S. Gehlhaus, N. McTyre, K.J. Bussey, S. Lababidi, D.A. Scudiero, J.N. Weinstein, and I.R. Kirsch, *Karyotypic complexity of the NCI-60 drug-screening panel*. Cancer Res, 2003. **63**(24): p. 8634-47.
212. Buhler, H. and G. Schaller, *Transfection of keratin 18 gene in human breast cancer cells causes induction of adhesion proteins and dramatic regression of malignancy in vitro and in vivo*. Mol Cancer Res, 2005. **3**(7): p. 365-71.
213. Hardwick, M., J. Rone, Z. Han, B. Haddad, and V. Papadopoulos, *Peripheral-type benzodiazepine receptor levels correlate with the ability of human breast cancer MDA-MB-231 cell line to grow in SCID mice*. Int J Cancer, 2001. **94**(3): p. 322-7.
214. Wiseman, B.S. and Z. Werb, *Stromal effects on mammary gland development and breast cancer*. Science, 2002. **296**(5570): p. 1046-9.
215. Koldovsky, P., I. Haas, and U. Ganzer, *Promoting effects of fibroblasts on growth and progression of head and neck carcinoma cells*. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 1996. **58**(5): p. 248-52.
216. Renno, T., A. Wilson, C. Dunkel, I. Coste, K. Maisnier-Patin, A. Benoit de Coignac, J.P. Aubry, R.K. Lees, J.Y. Bonnefoy, H.R. MacDonald, and J.F. Gauchat, *A role for CD147 in thymic development*. J Immunol, 2002. **168**(10): p. 4946-50.
217. Woodhead, V.E., T.J. Stonehouse, M.H. Binks, K. Speidel, D.A. Fox, A. Gaya, D. Hardie, A.J. Henniker, V. Horejsi, K. Sagawa, K.M. Skubitz, H. Taskov, R.F. Todd, 3rd, A. van Agthoven, D.R. Katz, and B.M. Chain, *Novel molecular mechanisms of dendritic cell-induced T cell activation*. Int Immunol, 2000. **12**(7): p. 1051-61.
218. Staffler, G., A. Szekeres, G.J. Schutz, M.D. Saemann, E. Prager, M. Zeyda, K. Drbal, G.J. Zlabinger, T.M. Stulnig, and H. Stockinger, *Selective inhibition of T cell activation via CD147 through novel modulation of lipid rafts*. J Immunol, 2003. **171**(4): p. 1707-14.
219. Larue, L. and A. Bellacosa, *Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways*. Oncogene, 2005. **24**(50): p. 7443-54.
220. Nawshad, A., D. Lagamba, A. Polad, and E.D. Hay, *Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis*. Cells Tissues Organs, 2005. **179**(1-2): p. 11-23.

221. Muramatsu, T., *Developmentally regulated expression of cell surface carbohydrates during mouse embryogenesis*. J Cell Biochem, 1988. **36**(1): p. 1-14.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel möchte ich für die Überlassung des Promotionsthemas, die Möglichkeit in seinem Institut diese Arbeit durchzuführen, sowie für seine großzügige Unterstützung danken.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. Volker Aßmann für seine intensive und konstruktive Betreuung der Arbeit in Theorie und Praxis danken, die mit unerschöpflicher Fachkenntnis und Ideenreichtum erfolgte.

Herrn PD. Dr. James Okese danke ich für seine Bereitschaft diese Dissertation als Vertreter des Fachbereiches Biologie zu begutachten.

Frau Dr. Ute Wölfle danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft, Motivation bei Laborfrust und auch teilweise finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Guido Sauter vom Institut für Pathologie (UKE, Hamburg) möchte ich für die Überlassung der Prognosearrays danken.

Frau Dr. Katarina Wolf und Herrn Prof. Dr. Peter Friedl aus der Abteilung Dermatologie der Universität Würzburg möchte ich für die gute Kooperation und Durchführung der Migrationsassays danken.

Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher, Frau Kornelia Babista und Frau Susanne Feldhaus aus dem Institut für Anatomie (UKE, Hamburg) danke ich für die Möglichkeit die Tierversuche durchzuführen.

Herrn Dr. Ralf Kleene aus dem ZMNH möchte ich für die Überlassung der Zuckerspezifischen Antikörper und die wertvollen Anregungen danken.

Ich danke dem gesamten Team des ITBs für die nette Atmosphäre. Ein besonderer Dank gilt den fleißigen Korrekturlesern und Layout-Beratern Michaela, Birthe, Susann, Stefan und Imke.

Meinem Ehemann Michael Reimers danke ich für seine Geduld, Toleranz und dafür dass er für unsere Tochter Sarah zwei Jahre Elternzeit genommen hat.

Mein letzter Dank geht an meine Familie für die uneingeschränkte Unterstützung und vor allem für die ständige Bereitschaft als Babysitter einzuspringen.

Beruflicher Werdegang

1995 – 1996: Beginn des Studium der Biologie an der Universität Hamburg

1996 – 2000: Studium der Biochemie/Molekularbiologie an der Universität Hamburg. Diplomarbeit am Tropeninstitut: „Expression und funktionelle Charakterisierung eines Gp96-Immunglobulin Fusionsproteins“
Studienabschluss: November 2000

2001 -2002: Elternzeit

ab 2002: Promotion am Institut für Tumorbilogie, UKE, Hamburg bei Prof. Klaus Pantel. Thema: „Untersuchungen zur Rolle von EMMPRIN bei der Progression des humanen Mammakarzinoms.“

April 2006: voraussichtlicher Abschluss der Promotion

Praktika und Projekte:

10/11.98: Projektstudie: „Etablierung eines retroviralen Systems zur stabilen Genexpression in unterschiedlichen Zielzellen“ bei Dr. med. F. Haag, klinische Immunologie, UKE, Hamburg

08/94 – 02/95: Praktikum bei der GKSS in Geesthacht bestehend aus einem mechanisch-elektrischen Teil und einem analytischen Teil.

Publikationen

Reimers, N., K. Zafrakas, V. Assmann, C. Egen, L. Riethdorf, S. Riethdorf, J. Berger, S. Ebel, F. Janicke, G. Sauter, and K. Pantel, *Expression of extracellular matrix metalloproteases inducer on micrometastatic and primary mammary carcinoma cells*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(10): p. 3422-8.

Riethdorf, S., N. Reimers, V. Assmann, G. Sauter, and K. Pantel, *High incidence of EMMPRIN expression in human tumors*. Int J Cancer, 2006 (*in press*).