

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (UKE)
Zentrum für Innere Medizin
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. med. Ansgar Lohse)

**Regulation und Funktion des extrazellulären Glykoproteins Osteopontin in
menschlichen Nebennierenrindenkarzinomzellen: Vergleich mit dem
invasiven Trophoblasten**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
Der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Hamburg

vorgelegt von
Joscha Niemann
aus Osnabrück

Hamburg 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 04.06.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. C. Bamberger

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. med. F. Jänicke

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Amling

Tag der mündlichen Prüfung: 04.06.2012

Note : Magan cum Laude

Gewidmet denen,
die mir immer vertraut haben:

Meinen Eltern.

Sie hätten sich sehr gefreut:

Meine Großmutter und mein Großvater.

Zitat

Der Weg ist das Ziel

Konfuzius (um 551-479 v. Chr.)

I. Inhaltsverzeichnis

1	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG.....	1
2	EINLEITUNG	2
2.1	FUNKTIONALE ANATOMIE UND HISTOLOGIE DER NEBENNIEREN	2
2.2	NEBENNIERENRINDENTUMOREN	4
2.3	DER TROPHOBLAST UND DESSEN DIFFERENZIERUNG	6
2.4	OSTEOPONTIN UND DESSEN INTERAKTIONEN	9
2.4.1	FUNKTION VON OSTEOPONTIN.....	11
2.4.2	EXPRESSION VON OPN IN TUMOREN UND DESSEN BEDEUTUNG BEI DER TUMORGENESE.....	12
2.4.3	OPN IN DER IMMUNABWEHR.....	13
2.4.4	BEDEUTUNG VON OPN IN BEZUG AUF APOPTOSE UND WUNDHEILUNG.....	14
2.4.5	REGULATION VON OSTEOPONTIN	15
3	MATERIAL.....	16
3.1	GEWEBE	16
3.2	ANTIKÖRPER	16
3.2.1	PRIMÄRE ANTIKÖRPER.....	16
3.2.2	ENZYMGEKOPPELTE SEKUNDÄRE UND TERTIÄRE ANTIKÖRPER.....	18
3.3	FÄRBEKITS	18
3.4	PUFFER UND STAMMLÖSUNGEN	19
3.5	DAKO MATERIALEN	19
3.6	WESTERN-BLOT MATERIALIEN	20
3.7	ZELLKULTUR	21
3.8	INVASIONSASSAY	22
3.9	LUZIFERASE-ASSAY UND BCA-PROTEIN ASSAY	23
3.10	SONSTIGE CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN IN ALPHABETISCHER REIHENFOLGE	23
4	METHODEN.....	25
4.1	IMMUNHISTOCHEMIE	25
4.1.1	VORBEHANDLUNG.....	25
4.1.2	FÄRBEMETHODE	25
4.1.3	AUTOMATISCHE FÄRBUNG MITTELS DAKO-AUTOSTAINER.....	28
4.1.4	MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG	29
4.2	ZELLKULTUR	29
4.2.1	AUSPLATTIEREN DER ZELLEN	30
4.3	TRANSIENTE TRANSFEKTION MIT EXPRESSIONSVEKTOREN	31
4.3.1	TRANSFEKTIONSVORGANG.....	31
4.3.2	GEWINNUNG DER PROTEINEXTRAKTE NACH TRANSFEKTION	33
4.3.3	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION.....	33
4.4	WESTERN BLOT-ANALYSE	33
4.4.1	PROTEINPROBENVORBEREITUNG	34

4.4.2	AUFTRENNUNG DER PROTEINPROBEN MITTELS SDS-POLYACRYLAMIDGEL-ELEKTROPHORESE.....	34
4.4.3	BLOTTEN	37
4.4.4	INKUBATION MIT PRIMÄR- UND SEKUNDÄRANTIKÖRPERN	37
4.4.5	DETEKTION	38
4.5	INVASIONSASSAY NACH TRANSFEKTION MIT EXPRESSIONSVEKTOREN	39
4.5.1	TRANSFEKTION	40
4.5.2	REHYDRATISIEREN DER MATRIGEL-INSERTS.....	40
4.5.3	HERSTELLEN DER ZELLSUSPENSIONEN	41
4.5.4	ÜBERTRAGEN DER ZELLEN	41
4.5.4	BEENDEN DES INVASIONSASSAYS	42
4.6	LUCIFERASE-REPORTERASSAY	43
4.6.1	COTRANSFEKTION MIT REPORTERPLASMID UND OPN-EXPRESSIONSVEKTOR	44
4.6.2	STIMULATION MIT TPA, DEXAMETHASON UND ACTH NACH COTRANSFEKTION	45
4.6.3	ERNTE DER ZELLEN.....	46
4.6.4	LUCIFERASE ASSAY.....	46
5	ERGEBNISSE	47
5.1	IMMUNHISTOCHEMISCHE ERGEBNISSE	47
5.1.1	EXPRESSION VON OPN IN DER IMMUNHISTOCHEMIE IM NEBENNIERENGeweBE	47
5.1.2	EXPRESSION VON INTEGRIN BETA 3 IN DER IMMUNHISTOCHEMIE IM NEBENNIERENGeweBE.....	53
5.1.3	GEGENÜBERSTELLUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN ERGEBNISSE	57
5.1.4	HE-IMMUNFÄRBUNG DER NEBENNIERE	59
5.2	AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN	60
5.3	WESTERN BLOT- ANALYSEN	64
5.3.1	OSTEOPONTIN IM WESTERN BLOT.....	64
5.3.2	INTEGRIN BETA 3 IM WESTERN BLOT	68
5.4	INVASIONSASSAY	69
5.4.1	PROTEINBESTIMMUNG IM BCA PROTEINASSAY	72
5.5	LUCIFERASE ASSAY	73
6	DISKUSSION.....	76
6.1	NEBENNIERENRINDENKARZINOM	76
6.2	OPN EXPRESSION IM UTERO-PLAZENTAREM SYSTEM	78
6.3	OSTEOPONTIN EXPRESSION UND REGULATION	79
6.3	COLOKALISATION VON OPN UND INTEGRIN BETA3 MIT WEITEREN ADHÄSIONSMOLEKÜLEN	80
6.4	REGULATION VON OPN UND INVASIVITÄT	81
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	84
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	86
9	LEBENS LAUF	93
10	DANKSAGUNG.....	93
11	ERKLÄRUNG	94

II. Abkürzungsverzeichnis

°C	Celsius
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Aq. dest.	Aqua destillata
Bp	Basenpaare
Co ₂	Kohlendioxid
DNA	Desoxyribonucleid acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Et. al.	Et alter
FCS	Foetal calf serum
g/l	Gramm pro Liter
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
Lsg.	Lösung
Min	Minute(n)
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
NN	Nebenniere
NNR	Nebennierenrinde
NS	Normalserum
OPN	Osteopontin
OT	Objekträger
PBS	Phosphate buffered saline
RLU	Relative Light Units
Rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s.u.	siehe unten
ST	Synzitiotrophoblast
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline- Tween

U

Umdrehungen

z.T.

zum Teil

$\mu\text{l}/\mu\text{g}$

Mikroliter/Mikrogramm

III. **Abbildungsverzeichnis**

<i>Abb. 2.1: Histologischer Ausschnitt einer Nebenniere</i>	<i>2</i>
<i>Abb. 2.2: Histologische und funktionale Einteilung der Nebenniere</i>	<i>3</i>
<i>Abb. 2.3: Histologische Gliederung der Nebennierenrinde</i>	<i>3</i>
<i>Abb. 2.4: Differenzierung des villösen Trophoblasteng</i>	<i>7</i>
<i>Abb. 2.5: Interaktion zwischen zellulären Rezeptoren und extrazellulärer Matrix.....</i>	<i>10</i>
<i>Abb. 2.6: Zusammenfassung möglicher Funktionen von Osteopontin.....</i>	<i>11</i>
<i>Abb.4.1: Schematische Darstellung der (Strept-) Avidin-Biotin-Enzymkomplex-Methode.....</i>	<i>27</i>
<i>Abb. 4.2: Darstellung einer SDS-Polacrylamidelektrophorese.....</i>	<i>36</i>
<i>Abb. 4.3: Schematischer Aufbau des Matrigelinvasionassays.</i>	<i>39</i>
<i>Abb. 4.4: Luciferase-Reaktion, katalysiert durch Firefly Luciferase.....</i>	<i>44</i>
<i>Abb. 5.1: Immunhistochemische Darstellung von OPN in normalen Nebennierengewebe</i>	<i>49</i>
<i>Abb. 5.2: Immunhistochemische Darstellung von OPN im Nebennierenhyperplasiegewebe.....</i>	<i>50</i>
<i>Abb. 5.3: Immunhistochemische Darstellung von OPN in Adenomgewebe der Nebenniere.....</i>	<i>51</i>
<i>Abb. 5.4: Immunhistochemische Darstellung von OPN in Karzinomgewebe der Nebenniere.....</i>	<i>53</i>
<i>Abb. 5.5 : Immunhistochemische Darstellung von Integrin beta 3 im Normalgewebe der Nebenniere.....</i>	<i>54</i>
<i>Abb. 5.6: Immunhistochemische Darstellung von Integrin beta 3 im Nebennierenkarzinom</i>	<i>56</i>
<i>Abb. 5.7: Immunhistochemische Darstellung von OPN und Integrin beta 3 in der normalen Nebenniere</i>	<i>58</i>
<i>Abb. 5.8: HE- (Hämalaun-Eosin) Färbung der Nebenniere</i>	<i>59</i>
<i>Abb. 5.9 : Western Blot- Analyse von OPN in der Nebenniere</i>	<i>65</i>
<i>Abb. 5.10 : Western Blot- Analyse von OPN in der Nebenniere.....</i>	<i>66</i>
<i>Abb. 5.11 : Western Blot-Analyse von OPN in der Nebenniere.....</i>	<i>67</i>
<i>Abb. 5.12 : Western Blot- Analyse von OPN von Lysaten der Zelllinie NCI 295 R und in der normalen Nebenniere.....</i>	<i>67</i>
<i>Abb. 5.13 : Western Blot –Analyse von Integrin beta 3 und Actin in der Nebenniere.....</i>	<i>68</i>
<i>Abb. 5.14 : Auswertung des Matrigelinvasionassays für Karzinomzellen NCI 295 ohne und mit Stimulation mit OPN ohne Transfektion eines Plasmidvektors.....</i>	<i>70</i>
<i>Abb. 5.15 : Auswertung des Matrigelinvasionassays für Karzinomzellen NCI 295 ohne und mit Stimulation und ohne und mit Transfektion des Integrin beta 3 Plasmidvektors.</i>	<i>71</i>
<i>Abb. 5.16 : BCA Protein-Assay von OPN der Zellreihe NCI 295 nach Stimulation</i>	<i>72</i>

Abb. 5.17 : Ergebnisse der Luciferasemessung für das Reporterplasmid OPN-Promotorfragment s(short) mit 300 bp in der Karzinomzelllinie NCI 295 nach Stimulation mit Dexamethason 10^{-7} M und ACTH 10^{-9} M..... 74

Abb. 5.18 : Ergebnisse der Luciferasemessung für das Reporterplasmid OPN-Promotorfragment l (long) mit 880 bp in der Karzinomzelllinie NCI 295 nach Stimulation mit Dexamethason 10^{-7} M und ACTH 10^{-9} M..... 74

IV. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 4.1: Zusammensetzung des Trenngels.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 4.2: Zusammensetzung des Sammelgels.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 4.3: Darstellung eines möglichen Invasionsassays.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 4.4: Reporterplasmide und OPN-Expressionsvektoren</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 5.1: OPN – Expression in Nebennierenhyperplasien</i>	<i>60</i>
<i>Tabelle 5.2 : OPN-Expression in Nebennierenadenomen.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabelle 5.3: OPN-Expression in Nebennierenkarzinomen</i>	<i>62</i>

1 Fragestellung und Zielsetzung

Das Nebennierenrindenzarzinom ist ein sehr seltener und zugleich hochmaligner Tumor.

Die Entstehung dieses Tumors ist bis dato weitgehend unverstanden.

Osteopontin ist ein Glykophosphoprotein, welches in diversen humanen Tumoren eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese und der Invasivität zu spielen scheint. Als Beispiel seien hier das Endometriumkarzinom und die Trophoblasttumoren genannt. Auch in Nebennierentumoren scheint Osteopontin eine bedeutende Rolle in Bezug auf die Invasivität zu spielen.

In Vorarbeiten auf dem Gebiet der Plazenta konnte bereits gezeigt werden, dass eine starke Expression von Osteopontin (OPN) eine ausgeprägte Expression von Adhäsionsmolekülen wie CEACAM 1 und Integrin beta 3 im invasiven extravillösen Trophoblasten nach sich zieht. Osteopontin führt dort durch Zell-Matrix-Interaktionen mit den entsprechenden Rezeptormolekülen zu einer Steigerung des invasiven Potenzials. Hier konnte der Nachweis einer positiven Korrelation von OPN-Expression und zusätzlicher Transfektion mit Integrin beta 3 in Bezug auf die Invasivität der Zellen mittels eines Matrigelinvasionsassays erbracht werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, dieses „physiologische Tumormodell“ in Trophoblastzellen auf das Tumormodell des Nebennierenrindenzarzinoms zu übertragen und die Funktion und Regulation von Osteopontin und dessen Rezeptors Integrin beta 3 zu untersuchen.

Es sollen auf molekularer Ebene die Mechanismen der Invasion und Progression, welche Osteopontin-vermittelt ablaufen, beleuchtet werden. Es soll ein zu quantifizierender Zusammenhang zwischen der Invasivität der Nebennierenrindenzarzinomzellen und entsprechender Osteopontin-Expression in Matrigelinvasionsassays aufgezeigt werden. Hierbei sollen auch die Zusammenhänge mit dem möglichen Interaktionspartnermolekül Integrin beta 3 untersucht werden.

Ein weiterer Bestandteil dieser Untersuchungen war die Regulation der Expression von OPN und dessen Rezeptor in Nebennierenrindenzarzinomzellen. Es werden verschiedene Hormone und Zytokine als Stimulatoren getestet und ferner spezifisch markierte Konstrukte eines OPN-Promotors in die zu untersuchende Zelllinie transfiziert und deren Effekte auf die Promotoraktivität untersucht.

2 Einleitung

2.1 Funktionale Anatomie und Histologie der Nebennieren

Die Nebenniere als endokrines Organ ist nach folgendem Prinzip aufgebaut. Das Mark füllt die Nebenniere zentral aus und ist umgeben von der Nebennierenrinde (siehe Abbildung 2.1). Beide Strukturanteile haben aus entwicklungsgeschichtlicher Sicht eine unterschiedliche Herkunft. Die Zellen der Rinde entspringen den Zellen des intermediären Mesoderms und die Zellen des Marks lassen sich auf die Neuralleisten der mesenchymalen Drüsenanlage zurückführen (Bland et al., 2003). Ferner haben beide Anteile der Nebenniere ganz unterschiedliche Funktionen.

Die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes sezernieren Katecholamine (hauptsächlich Adrenalin und Noradrenalin), wohingegen die Zellen der Nebennierenrinde Steroidhormone synthetisieren. Sie wird in drei unterschiedliche Schichten aus morphologisch-anatomischer, sowie aus funktionaler Sicht eingeteilt.



Abb. 2.1: Histologischer Ausschnitt einer Nebenniere . Aufteilung in Nebennierenrinde und das zentral gelegene dunkler gefärbte Mark.

Aus Hammersen, F: *Histology. Color Atlas of Microscopic Anatomy. 3rd ed., Urban & Schwarzenberg, München, 1985.*

Von der die Nebenniere umschließenden Kapsel aus gesehen bildet die äußerste Schicht die Zona glomerulosa. Die darin enthaltenen Zellen bilden vorwiegend Aldosteron, welches den

Natrium- und Kaliumspiegel reguliert und ein entscheidender Teil des RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) ist.

Als mittlere Schicht folgt die Zona fasciculata, deren endokrinologische Hauptfunktion die Produktion von Glukokortikoiden und Androgenen darstellt.

Die auf die Zona fasciculata folgende Schicht bildet die Zona reticularis. Die Zellen dieser Schicht synthetisieren vorrangig Androgene (s. Abbildung 2.2 und 2.3.) (Young et al., 2003).

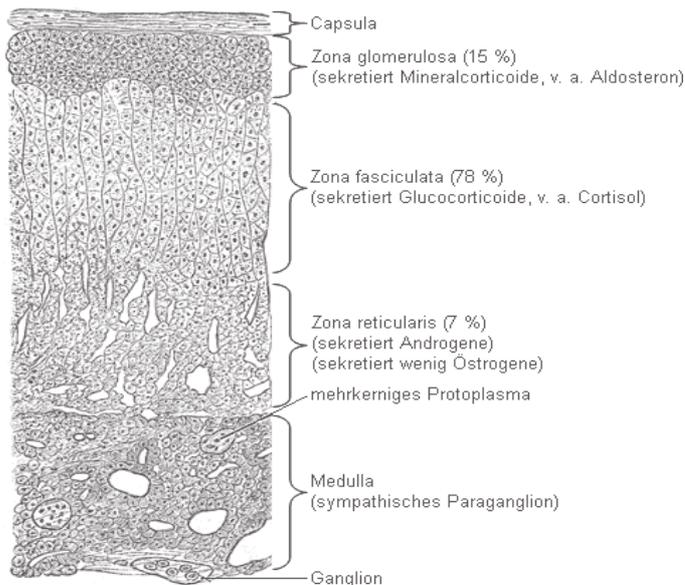


Abb. 2.2: Histologische und funktionale Einteilung der Nebenniere. Aufteilung in Medulla, Zona reticularis, Zona fasciculata und Zona glomerulosa.

Modifiziert nach <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1006721>

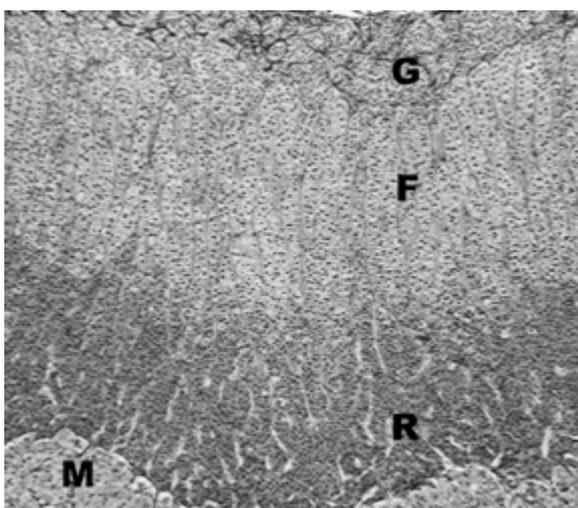


Abb. 2.3: Histologische Gliederung der Nebennierenrinde . Im oberen Bildteil mit Zona glomerulosa (G), darunter Zona fasciculata (F) und Zona reticularis (R) . Im unteren Bildteil ist das Nebennierenmark

angeschnitten (M). Aus Hammersen, F: Histology. Color Atlas of Microscopic Anatomy. 3rd. edition. Urban & Schwarzenberg, München, 1985

2.2 Nebennierenrindentumoren

In der Nebennierenrinde können folgende Tumore auftreten: Adenome, Karzinome, die sehr seltenen mesenchymalen Tumoren und Metastasen.

Das Nebennierenrindenadenom ist ein meist solitär auftretender gutartiger Tumor. Dieser kann alle drei Schichten der Nebenniere betreffen und ähnelt meist phänotypisch den Zellen der Nebennierenrinde. Das NNR-Adenom kann sowohl hormoninaktiv als auch hormonaktiv in Erscheinung treten. Je früher das Adenom auftritt, desto häufiger kann eine endokrine Beteiligung beobachtet werden. Diese Tumoren sind relativ häufig und treten vorwiegend im mittleren Lebensalter auf.

Die hormonaktiven Tumoren können klinisch als Conn-Syndrom, wenn es ein Aldosteron-sezernierender Tumor ist, oder als Cushing-Syndrom, wenn es zur Überproduktion von Glukokortikoiden kommt, in Erscheinung treten. Je nach dominierendem Zelltyp unterscheidet man kompakt-, glomerulosa- und klarzellige Adenome.

Das Nebennierenrindenkarzinom ist ein maligner, epithelialer und insgesamt sehr seltener Tumor mit einer Inzidenz von 0,5- 2,0 auf 1 Millionen Einwohner. Dieser Tumortyp ist nur sehr selten endokrin aktiv und wird aus diesem Grund meistens erst in einem sehr fortgeschrittenem Stadium entdeckt. Daraus resultiert eine ungünstige Prognose bei Diagnosestellung und eine 5-Jahres-Überlebensrate von unter 20 %.

Die seltenen hormonaktiven NNR-Karzinome treten in Form einer autonomen Glukokortikoidsekretion mit Ausbildung eines Cushing-Syndroms in Erscheinung. In wenigen Fällen wird hierbei eine Überproduktion von Androgenen und Östrogenen oder ein Conn-Syndrom beobachtet (Allolio et al., 2004).

Makroskopisch zeigt der Tumor ein gemischtes Bild mit Nekrosen und Einblutungen. Histologisch findet man ein lipidarmes, mitosenreiches Gewebe. Eine Differenzierung nach der Ursprungszone ist nicht mehr möglich. (Witt, 2004). Das NNR-Karzinom metastasiert zuerst lymphogen und später hämatogen in die Leber und die Lunge. Die biologischen Abläufe des hochmalignen endokrinen Nebennierenrindenkarzinoms sind weitestgehend ungeklärt. Die Prozesse der Tumorinvasion und Metastasierung desselben sind Bestandteil intensiver Forschung. Metastasierungsvorgänge gehen häufig einher mit einer Expression von

zellulären Proteinen, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, Proteasen und Transkriptionsfaktoren. Vor allem beim NNR- Karzinom gibt es noch keine eindeutigen Parameter. Auch gelingt oft die Abgrenzung zwischen atypischer Hyperplasie, Adenom und mikroinvasivem Karzinom aus pathologischer Sicht nicht in aller Klarheit. Das Verständnis dieser Prozesse ist u.a. auch Bestandteil dieser Arbeit. Möglicherweise könnten daraus neue Wege einer schnelleren und/oder eindeutigeren Diagnosestellung und anschließenden Therapie hervorgehen.

Einzelne Gene wurden dargestellt, die eine diagnostische Relevanz für NN-Tumore haben. Hier wurden Inhibin, Ki-67 und Topoisomerase II beschrieben. Diese waren aber nicht spezifisch für NNR-Tumore.

Weiter konnte das Tumorsuppressorgen p53 von einer anderen Arbeitsgruppe als Marker für maligne Nebennierentumoren im Vergleich zu benignen NN-Tumoren herausgearbeitet werden (Gupta et al., 2000; Iino et al., 1997; Terzolo et al., 2001).

Die Pathogenese auf Molekularebene ist noch immer nicht eindeutig geklärt. In einer Arbeit konnten Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 in einigen Fällen mit NNR- Tumoren und dem Li-Fraumeni-Syndrom in Verbindung gebracht werden (Reincke et al., 1996). Es wurden Genexpressionsanalysen anhand eines Kollektivs von NNR-Tumoren und korrelierendem Normalgewebe durchgeführt, um ein entsprechendes Genexpressionsverhalten beider Gewebe nachzuweisen. Die Analyse zeigte, dass 91 Gene in ihrem Expressionsverhalten einen mindestens dreifachen Unterschied zwischen der malignen und benignen Gruppe der NNR-Tumoren aufwiesen. Hierbei fanden sich bekannte Gene wie Insulin-like growth factor 2 Gen(IGF2), Topoisomerase II und Cyclin E1. Osteopontin konnte in dieser Expressionsanalyse ein Fold change von 16,6 bzw. 20,9 nachgewiesen werden (Giordano et al., 2001).

Die durch diese Analyse nahegelegten Zusammenhänge von Osteopontin und der Pathogenese und Tumorprogression bei Nebennierenrindenzarzinomen sollten in dieser Arbeit weiter beleuchtet werden. Der immunhistochemische Nachweis und ferner die Funktion und mögliche Regulation von Osteopontin in Nebennierenrindentumoren ist bis dato noch unerforscht.

2.3 Der Trophoblast und dessen Differenzierung

Im Rahmen der Entstehung einer intrauterinen Schwangerschaft kommt es während der Phase der Plazentation zur Implantation der Blastozyste in das uterine Epithel. Hierbei kommt es zur Differenzierung zwischen embryonalem und extra-embryonalem Gewebe (Chaddha et al., 2004). Die sich anschließende Nidation ist gekennzeichnet durch die Entstehung verschiedener Trophoblaststrukturen. Aus der Zytotrophoblastpopulation entwickelt sich im Verlauf der Synzytiotrophoblast (ST). Ferner differenzieren sich Subpopulationen des Zytotrophoblasten, die als extravillöse Trophoblasten bezeichnet werden und ein invasives Potential aufweisen, indem sie den ST durchdringen und dann das uterine Stroma invadieren (Cross et al., 1994); (siehe Abb 2.4). Die sich dann abtrennenden interstitiellen extravillösen Trophoblastzellen haben die Eigenschaft nicht mehr zu proliferieren, sondern im Vergleich zu malignen Tumorzellen „nur“ noch zu invadieren. Sie invadieren das uterine Interstitium der Dezidua und das innere Drittel des Myometriums (Kaufmann et al., 2003).

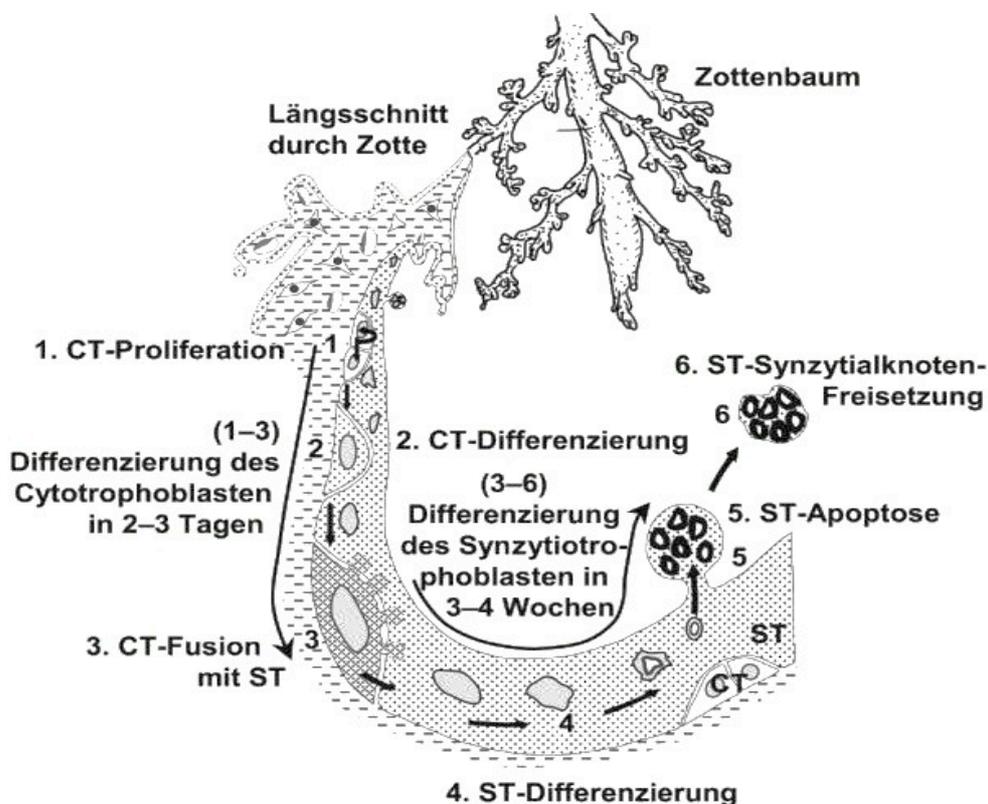


Abb. 2.4: Differenzierung des villösen Trophoblasten . Der Zottenbaum im oberen Teil der Abbildung stellt einen Teil des Zottengewebes der Plazenta dar. Im linken Teil der Abbildung ist ein Längsschnitt durch eine dieser Zotten dargestellt. Das Zottenepithel wird im unteren Abbildungsteil dargestellt. Durch Zahlen und Pfeile werden die Differenzierungsschritte des Trophoblasten dargestellt. Aus dem Zytotrophlasten (CT) bilden sich unter anderem Tochterzellen, die im Rahmen ihrer Differenzierung mit dem Synzytiotrophoblasten(ST) fusionieren. Innerhalb des ST kommt es zu weiteren Differenzierungsvorgängen. Letztendlich altern die Kerne des ST und werden in sogenannten Synzytialknoten abgeschnürt und nach Kontaktaufnahme (mittels „physiologischer Invasion“) mit der maternalen Zirkulation in das Blut der Mutter abgegeben.

Modifiziert nach www.kup.at/kup/images/browser/4553.jpg

Das invasive Wachstum und die Migration des Trophoblasten werden durch Interaktionen auf molekularer und zellulärer Ebene vermittelt. Eine erfolgreiche Implantation des Trophoblasten wird entscheidend beeinflusst durch parakrine und endokrine Regulationsprozesse auf molekularer Ebene (Cross et al., 1994). Der menschliche Trophoblast besitzt ein ausgeprägtes invasives Potential, in dem er das Epithel des Uterus und die Dezidua invadiert und im Anschluss daran durch Teile des Myometriums bis in die mütterlichen Arterien vordringt (Cross et al., 1994). Die Invasion des Trophoblasten in das uterine Gewebe wird dabei an mehreren Stellen in seiner Ausbreitung gebremst. So kommt es zum Beispiel in der Dezidua zur Ausbildung einer Mikroumgebung aus Cytokinen, die das Anhaften des Trophoblasten begünstigen und gleichzeitig die fortschreitende Invasion beschränken (Fazoleabas et al., 2004). Der Trophoblast produziert während der Uterusinvasion verschiedene Proteinasen, die als Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) bezeichnet werden. Deren entscheidende Mitbeteiligung an Tumorwachstum und Metastasenbildung konnte nachgewiesen werden (Dey, 2005). Ferner wird den MMPs eine bedeutende Rolle bei Zell-Interaktionen, Zell-Regulationen und Aktivierung bestimmter parakriner oder endokriner Signalwege zugesprochen (Sternlicht and Werb, 2001). Die Umstrukturierung der Dezidua während der Trophoblastinvasion wird durch Plasmin getriggert. Hierbei beeinflusst die Bindung von Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA) an den spezifischen Rezeptor (uPAR) die Plasmin-Aktivierung. Über die Plasminogen-Aktivierung wird die Serin-Protease Plasmin gebildet. Ein Inhibitor dieses System stellt der Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 (PAI-1) dar (Vassalli et al., 1991). Beide Komponenten konnten im Trophoblasten nachgewiesen werden (Floridon et al., 1999).

Die Steroidhormone Östrogen und Progesteron beeinflussen ebenfalls die Trophoblastinvasion. Hierbei trägt Progesteron einen entscheidenden Anteil an der Ovulation,

Implantation und Aufrechterhaltung einer physiologischen Schwangerschaft. Zudem werden der Menstruationszyklus und die zyklischen Veränderungen der Uterusschleimhäute entscheidend durch den Einfluss des Progesterons gelenkt. Abhängig von dem physiologischen Schwangerschaftsalter scheint Progesteron sowohl inhibierende als auch stimulierende Effekte auf die Invasion des entsprechend frühen oder späten Trophoblasten innezuhaben (Shimonovitz et al., 1998; Goldman and Shalev, 2006). Östrogen scheint einen inhibitorischen Effekt auf die fortschreitende Invasion des Trophoblasten auszuüben. Es konnte gezeigt werden, dass die vaskuläre Invasion der Spiralarterien im Primat durch Östradiolproduktion reduziert wird (Albrecht et al., 2006).

Der invasive Trophoblast kann also als physiologisch invadierendes Gewebe verstanden werden. Die Invasion ist u.a. sowohl zeitlich und räumlich selbst-limitierend durch oben genannte Mechanismen. In sehr seltenen Fällen kommt es zur Entstehung von trophoblastären Tumoren. Hier ist das Chorionkarzinom zu nennen. Dieses ist diagnostisch sehr schwer von dem physiologischen placentaren Gewebe zu unterscheiden.

Der invasive Trophoblast stellt somit ein sehr gutes Vergleichsmodell dar, um die physiologische Invasion mit der pathologischen Invasion zu vergleichen. Ferner eignet sich dieser Vergleich sehr gut, da das Gewebe des invasiven Trophoblasten eine spezifische Expression von Osteopontin aufweist (Briese et al., 2005b).

Es konnte im Rahmen von Voruntersuchungen gezeigt werden, dass OPN im villösen Synzitiotrophoblasten der Plazenta, welcher nicht invasiv ist, weniger stark oder nicht exprimiert wird, wohingegen im Zytotrophoblasten und im extravillösen, also invasiven, Trophoblasten eine starke Expression von OPN nachgewiesen wurde (Briese et al., 2005b).

2.4 Osteopontin und dessen Interaktionen

Osteopontin (OPN) ist ein Glykophosphoprotein der extrazellulären Matrix mit multifunktionaler Bedeutung. Es existieren diverse weitere Namen für dieses Protein. So ist es auch unter dem Namen sekretorisches Phosphoprotein I oder T-lymphocyte-activation-1 (Eta-1) bekannt (Giachelli et al., 1991; Ashkar et al., 2000). OPN wird in verschiedenen Organen des Körpers exprimiert; so konnte es u.a. im Knochengewebe, in Makrophagen-, Endothel-, und glatten Muskelzellen und verschiedenen Epithelien, z.B. Mammagewebe, Pankreas, Plazenta, Endometrium, Gastrointestinaltrakt und Gallenblase nachgewiesen werden (Brown et al., 1992).

OPN zählt zu der Familie der „small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLING)“. Das entsprechende Gen für die Expression von OPN ist auf dem Chromosom 4 lokalisiert. OPN setzt sich aus 264 bis 301 Aminosäuresequenzen zusammen und erfährt während der posttranslationalen Prozessierung Modifikationen durch z.B. Serin- und Threonin-Phosphorylierung (Prince et al., 1987) und N- und O-Glykosylierung (Sorensen et al., 1995). OPN zeichnet sich durch eine zelluläre Arginin-Glycin-Aspartinsäure (RGD) Bindungssequenz aus, welche identisch ist mit der zellulären Bindungsstelle des Fibronektins. Über diese scheint die zelluläre Bindung von OPN stattzufinden. Sie interagiert mit verschiedensten Integrin-Rezeptoren und ermöglicht hierdurch diverse Adhäsions-, Migrations-, Differenzierungs- und Immunabwehrprozesse (Miyachi et al., 1991; Bautista et al., 1995). Auch besitzt OPN eine Kalzium- und eine Thrombinbindungsstelle (Senger et al., 1989). Die oben genannten Integrine gehören zur Familie der heterodimeren transmembranösen Glykoproteinrezeptoren und spielen eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion. Die zelluläre Interaktion von OPN findet insbesondere über den Integrin (Vitronectin) Rezeptor $\alpha_v\beta_3$ statt (Giancotti and Ruoslahti, 1999). Ebenso ist bekannt, dass Integrin beta 3 – in Form von $\alpha_v\beta_3$ – eine wichtige Funktion im utero-plazentaren System für die Invasion des Trophoblasten und gleichzeitig für dessen Implantation bildet (Frank HG, 2000). Ferner konnte ebenfalls eine zelluläre Bindung über die Integrin-Rezeptoren $\alpha_v\beta_1$ und $\alpha_v\beta_5$ nachgewiesen werden (Denda et al., 1998). Das Oberflächenmolekül CD 44 und dessen Varianten interagieren mit OPN in Bezug auf Migration von Leukozyten, Fibroblasten und Tumorzellen. OPN wird in diesem Zusammenhang als Aktivator verstanden (Katagiri et al., 1999; Zohar et al., 2000).

Abbildung 2.5 gibt einen Überblick über die Interaktion von OPN als Bestandteil der extrazellulären Matrix und den entsprechenden zellulären Rezeptoren.

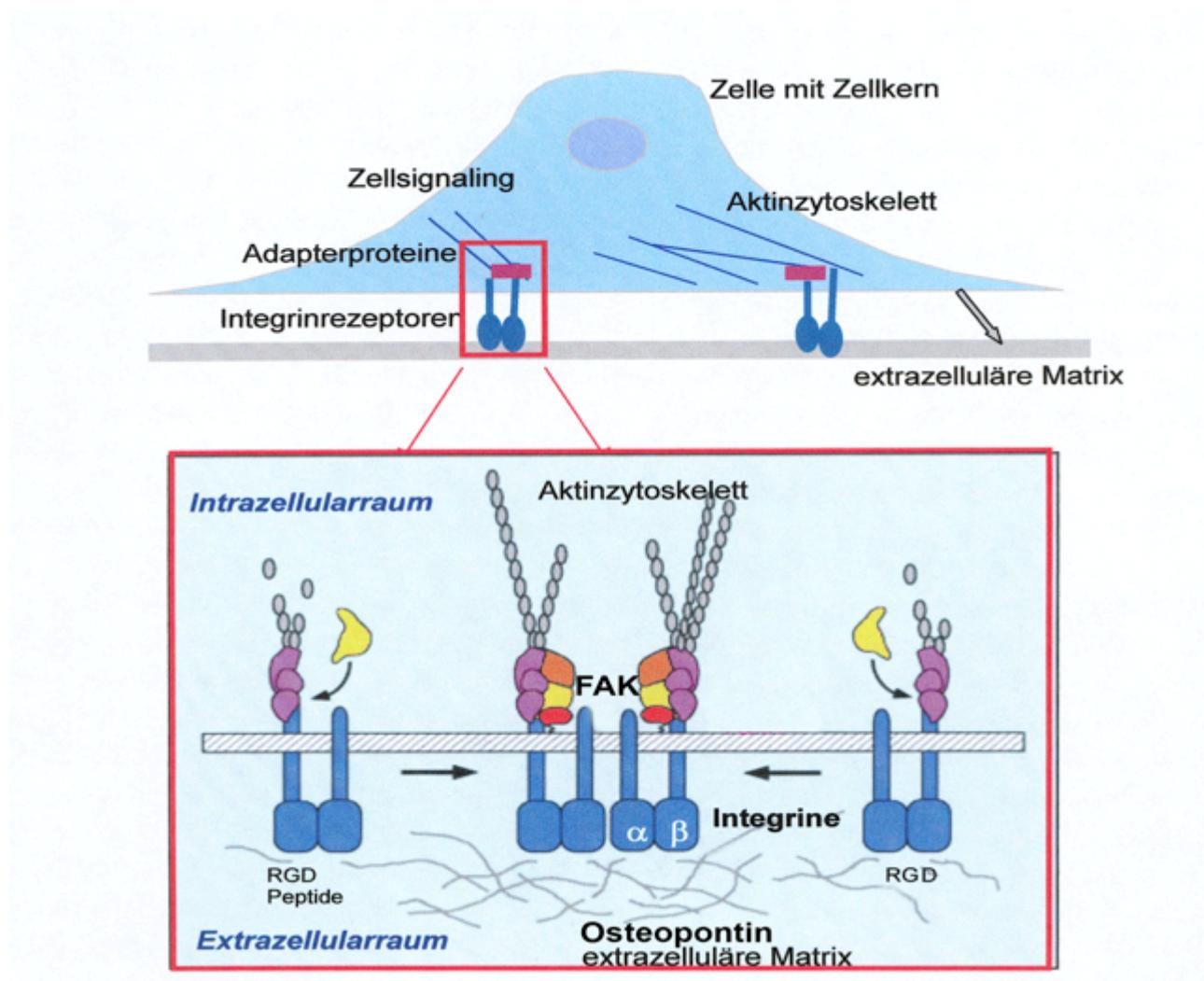


Abb. 2.5: Interaktion zwischen zellulären Rezeptoren und extrazellulärer Matrix.

Schematische Darstellung eines Adhäsionsprozesses einer Zelle an die extrazelluläre Matrix (Sequenz der sezernierten Proteine RGD: Arg-Gly-Asp) über entsprechende transmembrane Integrinrezeptoren, die jeweils aus einer alpha- und beta-Subeinheit bestehen. Die Integrinrezeptoren sind über Adapterproteine (z.B. Talin) mit dem Aktinzytoskelett assoziiert und übertragen dadurch intrazelluläre Signale zum Zellkern über die Fokale Adhäsionskinase (FAK). Untere Darstellung z.T. aus: Giancotti and Ruoslahti, Science 1999

2.4.1 Funktion von Osteopontin

Eine eindeutige Funktion für Osteopontin bei Zellen, in denen OPN nachgewiesen werden konnte, konnte bis jetzt nicht nachgewiesen werden. Vielmehr konnte für diverse zellbiologische Vorgänge eine wichtige Beteiligung von OPN aufgezeigt werden.

Bei einer möglichen Immunantwort nimmt OPN entscheidenden Einfluss auf die Leukozytenaktivierung und die Leukozytenfunktion. Ferner nimmt OPN bei regenerativen Prozessen, wie z.B. der Wundheilung oder Biomineralisation von Knochengewebe, eine bedeutungsvolle Aufgabe ein. Osteopontin konnte als Marker für die Aggressivität eines Tumors und als Überlebensmarker für Patienten, die von einer solchen Tumorerkrankung betroffen sind, identifiziert werden (Weber et al., 2010).

In Abb. 2.6 sind möglich Funktionen von Osteopontin dargestellt.

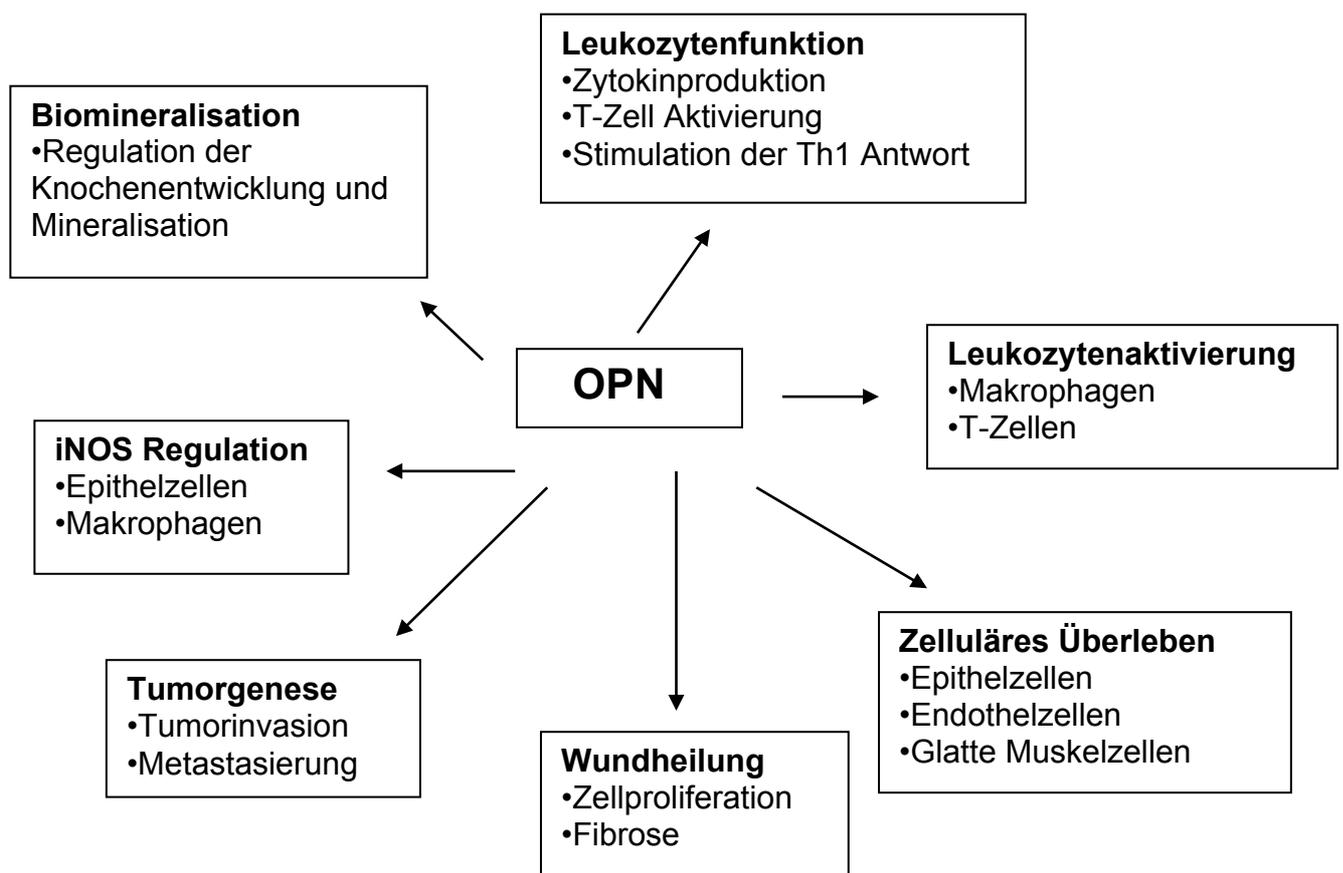


Abb. 2.6: Zusammenfassung möglicher Funktionen von Osteopontin.

2.4.2 Expression von OPN in Tumoren und dessen Bedeutung bei der Tumorgenese

In dem letzten Jahrzehnt wurden verstärkt Hinweise dafür gefunden, dass OPN eine wichtige Rolle für die Tumorgenese und Metastasierung innehaben könnte.

Eine Studie mit 154 Mammatumoren konnte OPN sowohl auf RNA-Ebene als auch immunhistochemisch in 70 % der Tumorzellen nachweisen. Wahrscheinlich zeigen unterschiedliche Zelltypen im Infiltrationsgebiet des Tumors eine OPN Expression. Deren genaue Funktion konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden (Tuck et al., 1998). Osteopontin-c, ein Splicing-Produkt von Osteopontin, konnte als selektiver Marker für invasive Mammakarzinome identifiziert werden (Mirza et al., 2008). OPN-c zeigt in Bezug auf neuroepitheliale Tumoren ein ähnliches Ergebnis. Beim Gliom konnte eine Invasivität in Abhängigkeit von OPN-c, vermittelt über die Expression von uPA und MMP-2 und MMP-9 bzw. deren Aktivitätssteigerung (über u.a. NF-kappaB) nachgewiesen werden (Yan et al., 2010). Auch eine Korrelation zwischen der OPN-Expression und dem histologischen Grad von Astrozytomen konnte aufgezeigt werden (Toy et al., 2009). Ähnliches brachte die Arbeitsgruppe um Song et al. in Bezug auf das Zervix-Karzinom hervor (Song et al., 2009).

Andere Studien an Bronchialtumoren, Prostata- und Ovarialkarzinomen konnten eine Steigerung des Expressionslevels von OPN im Vergleich zum Normalgewebe nachweisen (Coppola et al., 2004). Ein ähnlicher Nachweis konnte in Bezug auf bestimmte Mammakarzinome gefunden werden. Eine erhöhte OPN-Expression bei diesen Mammakarzinomen geht mit einer erhöhten Metastasierungsrate einher (Urquidi et al., 2002). Ferner konnte gezeigt werden, dass in den Fällen bei denen eine höhere Expression von OPN auftrat, die Rezidiv-freie Phase und das Langzeitüberleben der Patientinnen verkürzt war (Tuck et al., 1998). OPN wurde als potentieller Biomarker für das Langzeitüberleben beim Lungenkarzinom identifiziert. Durch eine Downregulation von OPN wurde sowohl das Zellwachstum als auch die Invasivität beteiligter Zellen reduziert (Zhao et al., 2011).

2.4.3 OPN in der Immunabwehr

Möglicherweise spielt OPN eine entscheidende Rolle während einer akuten oder chronischen Entzündungsreaktion im Körper. Einwandernde Makrophagen oder T-Zellen, aber auch präsentierende Epithel- und Endothelzellen exprimieren OPN im Falle einer solchen Entzündungsreaktion. Hierbei können sowohl pro-inflammatorische als auch anti-inflammatorische Immunantworten durch OPN hervorgerufen werden.

Eine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass in verschiedenen Tiermodellen bei einer Glomerulonephritis oder einer Cyclosporin-Nephropathie die Makrophageninfiltration mit einem erhöhten OPN-Spiegel korreliert (Hartner et al., 2001).

An einem dieser Modelle konnte gezeigt werden, dass die Makrophageninfiltration durch das Hinzufügen von OPN Antisenseoligonukleotiden reduziert wurde und die Tubulusepithelien dadurch weniger OPN exprimierten (Okada et al., 2000). Die Arbeitsgruppe um O'Regan et al. zeigt eine Eigenschaft von OPN auf, bei der es eine Chemotaxis und die Proliferation von T-Zellen hervorruft (O'Regan et al., 1999). Das Glykoprotein begünstigt eine TH1-Antwort mit IL-12 und IFN-gamma Ausschüttung und gleichzeitig eine verminderte TH2-Antwort mit IL-10-Produktion. Hierbei scheint ein Zusammenhang zu bestehen mit der Ligandierung von OPN an den Integrin beta3 und CD44-Rezeptor (Ashkar et al., 2000).

Auch eine Beziehung zwischen OPN und einer Immunglobulinproduktion durch B-Zellen als mögliche Ursache für Autoimmunprozesse wird vermutet (Iizuka et al., 1998). In einer Studie zeigte man, in Bezug auf Multiple Sklerose (MS) bzw. experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), das ist eine der multiplen Sklerose ähnlichen Erkrankung bei Versuchstieren, sowohl proinflammatorische als auch neuroprotektive Eigenschaften von OPN (Braithwaite and Constantinescu, 2010). Hong et al. diskutieren den Effekt von Interferon-beta und IL-17 auf OPN bei der MS und im Rahmen dessen die Verminderung beider Bestandteile, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen (Hong and Hutton, 2010). OPN scheint eine bedeutende Rolle bei der T-Zell-Antwort in dendritischen Zellen bei Autoimmunprozessen inne zu haben. Womöglich wird eine überschießende IL-17(T-Zell)-Antwort getriggert. IFN-gamma induziert IL-27 und inhibiert die OPN-Expression in dendritischen Zellen. Des Weiteren unterdrückt IFN-gamma auf diesem Wege in dendritischen eine IL-17 vermittelte überschießende Autoimmunantwort (Murugaiyan et al., 2010).

2.4.4 Bedeutung von OPN in Bezug auf Apoptose und Wundheilung

OPN wird in einigen Arbeitsgruppen eine zelluläre Schutzfunktion zugeschrieben und gleichzeitig die Inhibition der zellulären Apoptose. Durch die Bindung von OPN an den Integrinrezeptor $\alpha_v\beta_3$ von tubulären Epithelzellen wird eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF kappa B ausgelöst und somit zellulären Apoptose verhindert (Scatena et al., 1998). Vergleichbare Erkenntnisse konnte auch in hämatopoetischen und glatten Muskelzellen nachgewiesen werden (Weintraub et al., 2000).

Die Beteiligung von OPN an der Geweberegeneration und der Wundheilung wird von einigen Arbeitsgruppen postuliert. Bei OPN-Knockout-Mäusen wird das Entstehen einer Schnittwunde mit einer abnormen Kollagenfibrillogenese beantwortet. Der diesem Defekt zugrunde liegende pathophysiologische Zusammenhang ist aber bis dato nicht geklärt (Liaw et al., 1998). Ergänzende Untersuchungen zeigten eine direkte Verbindung zwischen OPN und der Entstehung einer Gewebefibrose. OPN vermittelt die Chemotaxis von Fibroblasten und die Produktion von fibroblastären Wachstumsfaktoren (Takahashi et al., 2001).

Nach einer Laminektomie kann es mitunter zu einem Failed-back-surgery-Syndrom (FBBS), also Rückenschmerzen im entsprechenden Wirbelsäulenbereich, kommen. OPN scheint in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle zuzukommen. Die Heilung des entsprechenden Gewebes, die Fibrosebildung und das Ansprechen des Nervengewebes stehen mit der entsprechenden OPN-Expression im Zusammenhang (Brzezicki et al., 2010).

2.4.5 Regulation von Osteopontin

Die eindeutigen Regulationsmechanismen der OPN-Expression sind Bestandteil intensiver Forschung. Bis dato lassen sich noch keine eindeutigen Zusammenhänge ableiten. Der OPN-Promotor scheint, so wie es einige Arbeitsgruppen postulieren, mehrere Bereiche für die Regulation der OPN Expression zu enthalten. Dieses können purinreiche Sequenzen, ets-like Sequenz, Glukokortikoid-, Vitamin D- und IFN- gesteuerte Sequenzen sein. Diese Sequenzen sollen entscheidend mitbeteiligt sein an der unterschiedlichen Regulation der Expression zwischen einzelnen Tumoren und entsprechendem Normalgewebe (Koszewski et al., 1996). Eine Arbeitsgruppe um Yu et al. zeigt mögliche Stimulatoren auf, wie z.B. TGF beta, TNF alpha, IL-1beta sowie Hormone wie Glukokortikoide und Vitamin D (Yu et al., 1999). Einige andere Arbeitsgruppen zeigten auf, dass insbesondere Glukokortikoide bei Glioblastomzellen die Expression von Osteopontin stimulieren und auf diesem Wege eventuell eine Aktivierung des Transkriptionsfaktrs SP1 im entsprechenden Promotorabschnitt auslösen können (Wang et al., 2000).

Häufig führt jedoch der Weg der Stimulation einer Expression von OPN über die Expression des Onkogens Ras. Dessen Expression und Aktivierung über einen der genannten Stimulatoren ist also der eigentliche Aktivierungsweg einer Expression von OPN (Chambers and Tuck, 1993) (Denhardt et al., 2001). Dieses Schema konnte auch auf Mammakarzinomzellen übertragen werden. Ein Ras-Response-Factor (RRF) bindet an einen spezifischen Sequenzabschnitt im OPN-Promotor, löst auf diesem Wege die OPN-Transkription aus und verleiht den Tumorzellen möglicherweise metastatische Eigenschaften (Denhardt et al., 2003). Die Arbeitsgruppe um Tuck et al. postulieren allerdings, dass eine zunehmende OPN Expression über eigens gesteuerte Signale anderer Onkogene beschleunigt wird (Tuck et al., 1998).

Die eindeutigen Zusammenhänge der Regulation von OPN und der auf diesem Wege entstehenden Tumorzellmigration und möglicherweise gleichzeitiger Metastasierung, ist noch immer zu großen Teilen unbekannt und bedarf weiterer Forschung.

3 Material

Alle nicht bereits im Text erwähnten Materialien und Konzentrationen sind unter 3.10 in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet oder im Methoden-Teil unter 4 aufgeführt.

3.1 Gewebe

Für diese Arbeit wurden nach histologischen Gesichtspunkten Gewebeschnitte der Nebennierenrinde aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zusammengestellt. Untersucht wurden 29 Gewebeproben von normalen Nebennieren, 16 hyperplastische Nebennieren, 18 Nebennierenadenome und 13 Nebennierenkarzinome. Die Studie wurde bei der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg vorgelegt und genehmigt.

3.2 Antikörper

3.2.1 Primäre Antikörper

Anti-Osteopontin,
NCL-O-PONTIN

mouse monoclonal antibody
Clone OP3N, Ig Class Ig G1
Novocastra Laboratories Ltd, UK

Dieser Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1: 800 bei der Immunhistochemie (IHC) eingesetzt und bindet das zugehörige Antigen Osteopontin.

Anti-Osteopontin

mouse monoclonal antibody
OPN (AK m2A1):sc-21742
Santa Cruz Biotechnology, INC., Europe
Dieser Antikörper (AK) wurde in einer

	<p>Verdünnung von 1:200 in der (IHC) eingesetzt und bindet spezifisch das zugehörige Antigen Osteopontin.</p> <p>Dieser AK wurde zudem im Western-Blot in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt.</p>
Anti-Osteopontin	<p>rabbit monoclonal antibody Cat. #RB-9097-P1 and P (0,5ml at 200µg/ml) Lab Vision Corporation, Thermo Scientific Neo Markers, UK Dieser Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:50 in der IHC eingesetzt und bindet spezifisch das zugehörige Antigen Osteopontin.</p>
Anti-Osteopontin	<p>rabbit monoclonal antibody Cat. #RB-9097-PCL (0,1ml) Lab Vision Corporation, Thermo Scientific Neo Markers, UK Die Konzentration im Western-Blot als Positiv-Kontrolle betrug 2 µg/ml.</p>
Anti-Integrin alpha V beta-3	<p>mouse monoclonal antibody Ma1-23050, Clone 23C6, IgG1 Affinity Bio Reagents, USA Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1: 200 in der ICH eingesetzt, um den Rezeptor Integrin beta 3 zu markieren.</p>
Anti-Integrin beta 3 Anti-Human CD 61	<p>mouse monoclonal antibody CBL 479, Clone PM6/13 Chemicon International, USA</p>
Anti-Integrin beta3	<p>Biotin-conjugated monoclonal antibody</p>

(GPIIIa,CD61)

MAB 1957B, Clone 25E11, IgM

Chemicon International, CA

Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von

1: 200 in der IHC eingesetzt, um den Rezeptor

Integrin beta 3 zu markieren.

Alle hier angegeben primären Antikörper wurden nicht vorbehandelt und in angegebener Verdünnung angewandt.

3.2.2 Enzymgekoppelte sekundäre und tertiäre Antikörper

Vectastain Elite ABC- Kit

#PK 6200

Peroxidase

Universal

Enthält:

3ml Normalserum

1ml biotinylierter Zweitantikörper

2ml ReagenzA (AvidinDH)

2ml ReagenzB (biotinylierte Meerrettich-Peroxidase)

anti-mouse monoclonal

Western-Blot Verdünnung 1:8000

3.3 Färbekits

Vectastain

DAB Substrat Kit for Peroxidase

SK- 4100

Enthält:

10ml Puffer-Lösung

10ml DAB-Lösung

10ml Peroxid-Lösung

10ml Nickel-Lösung

Die Gebrauchslösung wurde mit *Aqua dest.* angesetzt.

3.4 Puffer und Stammlösungen

BSA 2%

Herstellung: 1g BSA + 50ml PBS

Abfüllen in Aliquotes zu 1ml,

Lagerung bei -18°C.

Citrat-Puffer

Herstellung: 9ml Stammlösung B (siehe unten) mit 450ml *Aqua dest.* mischen,

langsam Stammlösung A (s.u.) hinzu pipettieren (bis pH 6.0),

mit *Aqua dest.* auf 500ml Volumen auffüllen.

Methanolblockade

5ml H₂O₂ + 200ml Methanol

PBS

Herstellung: 10-fach-konzentriertes PBS:

14,3 g K₂HPO₄ + 2,5 g KH₂HPO₄ + 85g NaCl

auf 1000ml mit A.d. auffüllen; pH =7,2-7,4

Aufbewahrung bei 4°C

Stammlösung A

10,5 g Citronensäuremonohydrat + 500ml *Aqua dest.*

TEC

Herstellung: 5g Tris (hydroxymethyl)-

Aminopenthan + 10 g EDTA+ 3,2g Tri-Natrium-

Citrat. Mit *Aqua dest.* auf 1 Liter auffüllen

und pH- Einstellung auf 7,8.

3.5 Dako Materialien

Dako Autostainer

Dako Autostainer (Serial no.3400-9010-03)

Färbeautomat für Immunhistochemie

Dako REAL™ Biotinylated Secondary	Dako, Deutschland Antibodies (AB2)
Dako Chem Mate L.St.Av/HRP	# K5001 , Dako Deutschland
Dako REAL™	
Peroxidase/DAB+ detection kit	# K 5001, Dako Deutschland
Rabbit/Mouse	
Dako REAL™ Peroxidase Blocking	Code S2023, Dako Deutschland
Solution	
Dako ChemMate™ HRP Substrate Buffer	Code K5001, Dako Deutschland
Dako ChemMate™ Antibody Diluent	Code S2022
Hematoxylin	Code S2020
Blueing Buffer	Code S3006
Target Retrieval Solution (10x)	Code S2031
Dako Wash Buffer 10x	Code S3006

3.6 Western-Blot Materialien

Probenpuffer	Nu-Page LDS Sample Buffer (4x), 10 ml Invitrogen Carlsbad, CA 92008
Reduktionspuffer	Nu-Page Sampling Reducing Agent (10x), 250 µl, Invitrogen Carlsbad, CA 92008
Laufpuffer	Nu-Page ME SDS Running Buffer (20x) 500ml, Invitrogen Carlsbad, CA 92008
Transferpuffer	Nu-Page Transfer Buffer (20x), 125 ml Invitrogen Carlsbad, CA 92008
SDS Polyacrylamidgel	Nu-Page Novex 4-12 % Bis-Tris Gel 1.0 mm, 10 well Invitrogen Carlsbad, CA 92008 Gel-Zusammensetzung: siehe Tabelle 4.1 und 4.2
Standardmarker	See Blue Plus 2 Prestained Standard, 500 µl Invitrogen Carlsbad, CA 92008
Spatel	
Methanol	J.T. Baker, Holland
Western-Blot Polster	

Papierblätter	Schleicher und Schuell, Dassel
Nitrozellulosemembran	
PBST	Herstellung: PBS+ TWEEN 20 + 5 % Magermilchpulver
Antikörper	siehe unter 3.2.1 und 3.2.2
ECL Western Blotting detection reagents	GE Healthcare Amersham Biosciences United States
Wset Pico Supersignal-Kit	Pierce, USA
Klarsichthüllen	
Röntgenfilm „Hyperfilm ECL“	Amersham Biosciences, England
Röntgenkassette	Amersham Biosciences, England
Mikropipettenspitzen	Becton Dickinson Labware, France

3.7 Zellkultur

Zelllinie NCI295	Labor Prof. Bamberger, Universität Hamburg
Nebennierenrindenzellkarzinomzellen	
Adhärent wachsend	
Sterile Werkbank	Labor Prof. Bamberger, Universität Hamburg
Brutschrank	Labor Prof. Bamberger, Universität Hamburg
Zellmedium NCI-H295R	500 ml, MG-17, CLS Eppelheim, Deutschland
Cell Growth Medium	
RPMI Medium	Gibco, Paisley, UK
DMEM	Cambrex, Bio Science, Belgien
Hams F12	
Einfriermedium	Herstellung: RPMI 1640, 10 %DMSO, 20 %FCS Ansetzen, steril filtrieren, portionieren a´5 ml, a´10ml und bei -20°C einfrieren
Mykoplasmen-Nachweis Kit	VenorGeM Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland
Zellkulturflaschen 25 cm ³ Nunc	Sarstedt, Nürnberg

Zellkulturflaschen 75 cm ³ Nunc	Sarstedt, Nürnberg
Falcon	Becton Dickinson Labware, France
Zellschaber	
Trypsin	Gibco, Paisley, UK
PBS	Gibco, Paisley, UK
Pipetten 2, 5, 10, 25 ml	Becton Dickinson Labware, France
Trytanblau 0,5 %	Gibco, Paisley, UK

3.8 Invasionsassay

6-Well-Plates, 12-Well- Plates	Sarstedt, Nürnberg und Nunc, Denmark
BD BioCoat™Matrigel™	BD Biosciences
Invasion Chamber	
Basalmedien DMEM und F-12 Ham	Cambrex, Bio Science, Belgien
FCS	Gibco, Paisley, UK
Steriler Spatel	
Multipipettus	Becton Dickinson Labware, France
PBS	Gibco, Paisley, UK
Trypsin-EDTA	Gibco, Paisley, UK
Sterile Pipettenspitzen	Becton Dickinson Labware, France
Glaspipetten	Becton Dickinson Labware, France
Zellmedium NCI-H295R	500 ml, MG-17, CLS Eppelheim, Deutschland
Cell Growth Medium	
50ml Falcon Röhrchen	Becton Dickinson Labware, France
PLUS™ Reagent	Invitrogen
LIPOFECTAMINE™ Reagent	Invitrogen
Eppendorfgefäße	Becton Dickinson Labware, France

Plasmide:

Leerplasmid (mock)

pcDNA3.1(+)

β3-Plasmid

Labor Prof. Bamberger, Universität Hamburg

OPN-s-luc Reporterplasmid

Labor Prof. Bamberger, Universität Hamburg

OPN-l-luc Reporterplasmid

Labor Prof. Bamberger, Universität Hamburg

3.9 Luziferase-Assay und BCA-Protein Assay

Luminometer

Promega, USA

Luminometer-Röhrchen

Promega, USA

Luziferase-Assay Reagent

Promega, USA

TPA

Labor Prof. Bamberger, Universität Hamburg

ACTH

Labor Prof. Bamberger, Universität Hamburg

Dexamethason

Labor Prof. Bamberger, Universität Hamburg

BCA Protein Assay

Pierce, USA

BSA Standardreihe

Pierce, USA

3.10 Sonstige Chemikalien und Materialien in alphabetischer Reihenfolge

Produkt

0,5 % Trypanblau

Alkohol zum Reinigen

Autoklave

Brutschrank

Edding fein steril und unsteril

Eppendorfküvetten

Eppendorfgefäße

feuchte Kammer

Gefrierschränke

Glasabwurf
Inkubator
Kamera
Kühlschränke
Mac Pro
Magnetrührer
Mikroskop
Mikrowelle
Osmometer
pH-Meter
Pipettenspitzen
Pipetus
Rosenthal-Zählkammer
Schüttler
Spülmaschine
Styropor für die Bench
Tiefkühlbehälter -280 °C
Tiefkühlschrank
Tischzentrifuge
Vortexer
Wasserbad
Zentrifuge
Zählkammer nach Neubauer
Zellscraper
Safe-Lock-Tubes
Küvette
Photometer
Diff-Quick-staining kit
Wattestäbchen
Skalpell
Deckgläschen
Eukitt
Absaugpumpe
Zentrifuge

4 Methoden

4.1 Immunhistochemie

4.1.1 Vorbehandlung

Die Gewebeblöcke wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurden am Mikrotom Serienschnitte von ca. 5 µm Dicke angefertigt und diese dann im Wasserbad auf Super Frost Plus Objektträger (OT) aufgebracht.

Am Tag vor den immunhistochemischen Färbesequenzen wurden die Schnitte über Nacht im Wärmeschrank bei 58°C aufbewahrt. Am Tag darauf erfolgte dann die Entparaffinierung in Xylol für 2 x 10 min und die Rehydrierung mittels absteigender Alkoholreihe von 100 % (2x 5 min), über 96 % (1x 5 min) und 80 % Ethanol bis Aqua dest. .

Die Schnitte wurden dann für 10 min mit 200 ml Methanol + 10 ml H₂O₂ bei Raumtemperatur (RT) behandelt, um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren.

Einige Gewebeschnitte wurden zusätzlich, nach Spülung der OT in Aqua dest., zur Demaskierung in der Mikrowelle (MW) für 2x 10 min mit Citrat- bzw. TEC-Puffer vorbehandelt.

4.1.2 Färbemethode

Die Avidin-Biotin-Enzym-Komplexmethode (ABC) ist eine dreischichtige indirekte immunhistochemische Färbetechnik, die sowohl für monoklonale als auch für polyklonale Antikörper geeignet ist. Der verwendete Primärantikörper richtet sich spezifisch gegen das zu determinierende Antigen. Als Bindeglied zwischen spezifischem Primärantikörper und ABC-Komplex fungiert ein biotinylierter Zweitantikörper. Dieser erkennt spezifisch die entsprechende Immunkette des Primär-AK. Dieser Zweit-Antikörper wird auch „Brücken-Antikörper“ genannt, da er die Verbindung von Primär-AK und der Tertiärreagenz herstellt.

Ein Komplex aus Avidin und biotinylierter Peroxidase, welches als Enzym fungiert, bindet an den Brückenantikörper. Die freien Stellen des Avidinmoleküls binden an das Biotin des Sekundärantikörpers und dessen zwei Bindungsstellen binden an den Primärantikörper.

Das Peroxidase-Substrat DAB ermöglicht dann das Sichtbarwerden des Enzyms des ABC-Komplexes. Die DAB-Färbung stellte sich braun dar.

Eine weitere angewandte Färbemethode war die Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung. Die ausgewählten Schnitte wurden wie oben beschrieben vorbehandelt und im Anschluss daran mit Hämalaun für 4 min gefärbt. Nach dem Bläuen in Leitungswasser für 10 min schloss sich die Gegenfärbung mit Eosinlösung (1%) für 30 Sekunden an. Darauf folgte wie im weiteren Text beschrieben die aufsteigende Alkoholreihe, das Spülen in Xylol und das Eindeckeln mit Eukitt (siehe Kapitel 5.1.4).

Nach der Vorbehandlung wie in 4.1.1 angegeben schloss sich, falls eine Mikrowellenvorbehandlung erfolgte, eine Abkühlung von etwa 15 min auf RT an.

Dann wurden die Schnitte in Aqua dest. und für 2x 5 min mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Es folgte die Inkubation mit Normalserum für 20 min in der feuchten Kammer. 10 µl Normalserum wurden mit jeweils 1 ml PBS verdünnt. Die Schnitte wurden mit jeweils 100 µl verdünnten Normalserum (NS) benetzt. Anschließend wurde das überschüssige NS abgekippt und die OT mit je 100 µl Primärantikörper benetzt (Verdünnung s. Kapitel 3.2.1) und über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die OT für ca. 15 min auf RT gebracht, für 3x 5 min in PBS gespült und mit 100µl des verdünnten Sekundärantikörpers (s. Kapitel 3.2.2) beschichtet und für 30 min in die feuchte Kammer gebracht. 20 µl des Sekundärantikörpers wurden mit 1 ml PBS und 20 µl des NS aus dem Universal Kit verdünnt.

Danach wurde erneut für 3x 5 min mit PBS gespült. Während der Inkubationszeit wurde der ABC-Komplex angesetzt. Zu 5 ml PBS-Puffer wurden jeweils 2 Tropfen der Lösung A und B aus dem Färbekit gegeben (s. Kapitel 3.2.2). Die OT wurden mit jeweils 100 µl des ABC – Komplexes beschichtet und für weitere 30 min in der feuchten Kammer belassen.

Anschließend erneutes Spülen für 3x 5 min in PBS bei RT und Aufbringen von jeweils 100 µl der angesetzten DAB-Lösung (s. Kapitel 3.3) auf die OT. Die DAB-Lösung wurde mit 5 ml Aqua dest., 2 Tropfen Puffer-Lsg., 4 Tropfen DAB und 2 Tropfen H₂O₂ angesetzt. Die OT wurden dann für etwa 10 min in die feuchte Kammer gelegt, darauf hin in Aqua dest. gespült

und kurz gegengefärbt mit Hämalaun. Im Anschluss daran wurden die Schnitte 5 min fließend mit Leitungswasser gewässert. Es schloss sich daran die aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydration an und ein jeweils 2-minütiges Spülen in Xylol. Am Ende wurden die OT mit Eukitt eingedeckelt.

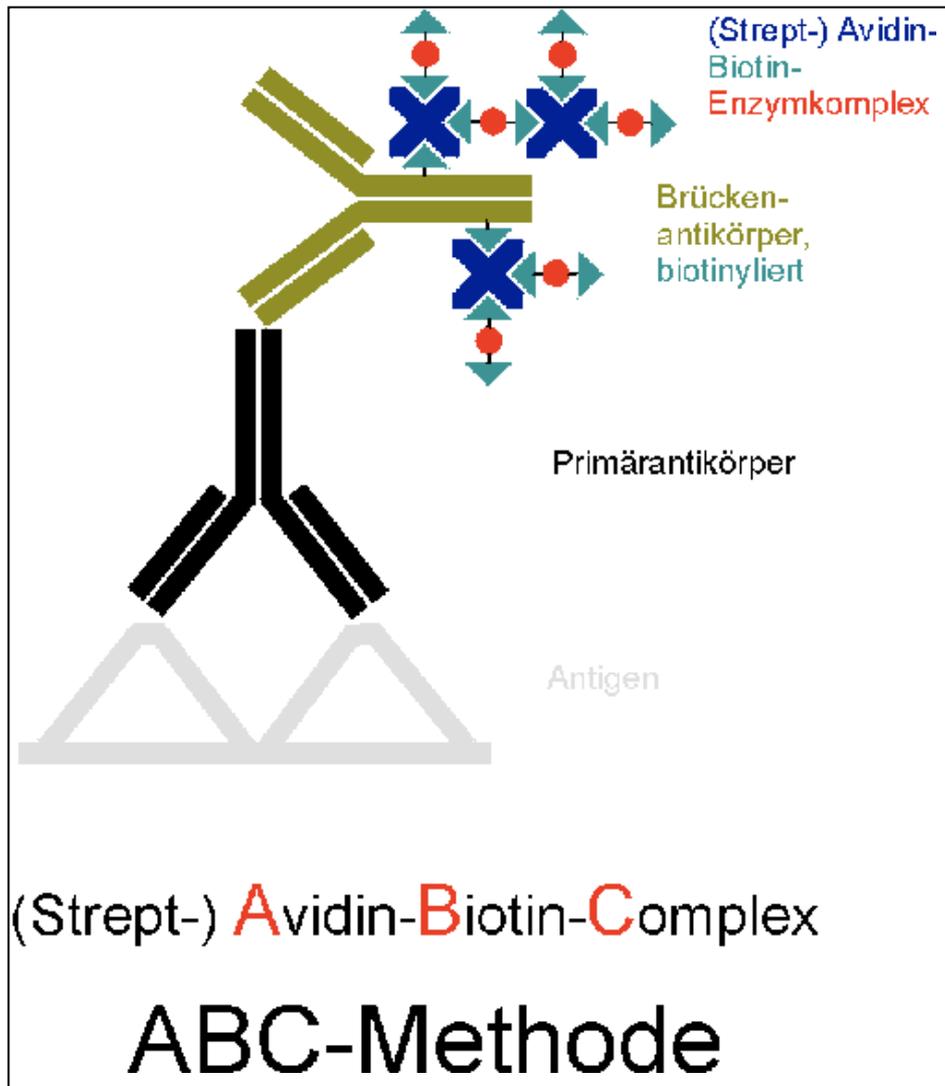


Abb.4.1: Schematische Darstellung der (Strept-) Avidin-Biotin-Enzymkomplex-Methode.

Modifiziert nach www.pathologie-online.de/meth/pop-ih_6.htm

Der spezifische Primärantikörper (mono- bzw. polyklonal) verbindet sich mit dem entsprechenden spezifischen Antigen. Daran wiederum bindet sich der biotinylierte Zweitantikörper als Brückenantikörper. Dieser bindet mit seinen zwei Bindungsstellen den Primärantikörper. An den Brückenantikörper bindet schließlich der ABC-Komplex, bestehend

aus Avidin und vier enzymkonjugierten Biotinmolekülen. Dieses Enzym wird dann mit dem entsprechenden Chromogen (DAB) sichtbar gemacht, welches hier nicht dargestellt ist.

4.1.3 Automatische Färbung mittels Dako-Autostainer

Der Dako-Autostainer ist ein vollautomatischer Färbeautomat für die Immunhistochemie. Einige ausgewählte Gewebeschnitte wurden mit diesem Automaten gefärbt. Abhängig vom Detektionssystem werden verschiedene immunhistologische Färbesequenzen angewendet.

In diesem Fall wurde das DAB Detection Kit angewandt (s. Kapitel 3.5). Das immunhistochemische Verfahren ist das ABC-Prinzip oder auch indirektes Streptavidin-Biotin-Verfahren (s. Kapitel 4.1.2 und Abbildung 4.1).

In einigen Fällen wurde eine Mikrowellen-Vorbehandlung mit TEC (s. Kapitel 4.1.1) angewendet. Nach dem Abkühlen auf RT und Waschen der OT in Aqua dest. (verwendete Materialien s. Kapitel 3.5) wurden die nächsten Schritte im Färbeautomaten vorgenommen (Dako Materialien s. Kapitel 3.5). Der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:800 angesetzt (s. Kapitel 3.2.1). Zur Reduzierung eventuell vorhandener endogener Peroxidase wurde H₂O₂ für 5 min. hinzugegeben (Peroxidase Blocking Solution s. Kapitel 3.5). Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem entsprechend verdünnten primären Antikörper für 30 min (Verdünnung s. Kapitel 3.2.1). Daran schließt sich die Behandlung mit dem biotinylierten Sekundärantikörper für 10 min an (Dako REAL™ Biotinylated Secondary Antibodies s. Kapitel 3.5). Dieser reagiert gleich gut mit den Immunoglobulinen von Kaninchen und Maus. Die Reaktion erfolgt dann mit dem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat für 10 min (Dako Chem Mate L.St.Av/HRP). Die Konjugation findet nach dem Zweischnitt-Glutaraldehydverfahren statt und es kommt hier zu nicht unspezifischen Wechselwirkungen. Die Farbreaktion wird dann ermöglicht durch die Verwendung des Dako REAL™ Peroxidase/DAB+ detection kit Rabbit/Mouse (s. Kapitel 3.5). Die Inkubationszeit beträgt 15 min. Die Gegenfärbung erfolgt dann mittels Hematoxylin und Blueing Buffer (Dako, s. Kapitel 3.5). Die aufgeführten Reaktionsschritte erfolgen bei 32°C. Auf die Färbung im Automaten folgt die Spülung in Leitungswasser und die Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe. Nach zweimaligem Spülen in Xylol werden die OT mit Eukitt eingedeckelt.

4.1.4 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung erfolgt an einem Lichtmikroskop der Firma Leitz (Wetzlar, Deutschland).

Dabei wurde folgendes Auswertungsschema zugrunde gelegt. Es wurde die Farbpositivität des im Schnitt vorhandenen Gewebes in Bezug auf Osteopontin und Integrin beta 3 untersucht und der Ausprägungsgrad wie folgt klassifiziert.

0	=	negative Anfärbung der Präparate
1	=	schwache Anfärbung der Präparate
2	=	mittlere Anfärbung der Präparate
3	=	starke Anfärbung der Präparate

4.2 Zellkultur

Alle Arbeiten mit der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Zellkulturen wurden regelmäßig auf Mykoplasmen untersucht. Die Zelllinie NCI 295 wurde in Kulturflaschen im Wärmeschrank bei 37°C und bei 5 % CO₂ kultiviert.

Es wurde alle 3 bis 4 Tage ein Mediumwechsel mit dem gebrauchsfertigen Medium NCI-H295R Cell Growth Medium (siehe Kapitel 3.7) durchgeführt.

Die Zellen wuchsen semiadhärent. Bei dem jeweiligen Splitvorgang wurden die Zellen mittels Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, in Falcons mit RPMI-Vollmedium mit FCS resuspendiert und nach Zentrifugation bei 1300 Umdrehungen (U)/min wurde der Überstand abgesaugt. Mittels eines neuen gebrauchsfertigen Mediums wurden die abzentrifugierten Zellen erneut in Suspension gebracht und in neue 75 cm³ Kulturflaschen überführt. In diese Kulturflaschen wurden jeweils 25 ml gebrauchsfertiges Medium vorgelegt und mit 10 ml Zellsuspension aus dem Falcon gemischt. Hierbei wurde die Zellmenge regelmäßig variiert, um ein gutes Wachstum der semiadhärenten Zellen zu gewährleisten.

In regelmäßigen Abständen wurde ein Teil der Zellpopulation eingefroren. Dafür wurde ein Einfriermedium angesetzt, welches aus dem Grundmedium RPMI 1640, 10 % DMSO und 20 % FCS besteht. Dieses wurde steril filtriert, zu jeweils 10ml portioniert und bei -20°C aufbewahrt (s. Kapitel 3.7).

Die jeweiligen einzufrierenden Zellen werden abgeerntet. Das gebildete Zellpellet wird dann sofort in das Einfriermedium aufgenommen, um die toxische Wirkung von DMSO bei Wärmeentstehung zu verhindern und auf Eis gestellt. Es wurden etwa 10⁶ Zellen/ml Einfriermedium und jeweils 1ml Einfriermedium/Einfrierröhrchen angesetzt (Zellzählung siehe weiter unten).

Diese Röhrchen wurden dann in Zellstoff eingewickelt, in einen Pappkarton gestellt und langsam auf -70°C gekühlt. Dann wurden diese in die Stickstoffkühlung überführt.

Das Auftauen der Zellen wurde im Wasserbad bei 37 °C durchgeführt. Nach zügigem Auftauen wurde die Zellsuspension unter sterilen Bedingungen mit dem gebrauchsfertigen Medium tropfenweise unter stetigem Schütteln verdünnt. Nach der Zentrifugation bei 1100 Umdrehungen/min und Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in ein frisches Medium überführt.

Die Ermittlung der Zellzahl wurde mit Hilfe der Zählkammer nach Neubauer durchgeführt.

Die gezählten Zellen in 16 Quadraten $\times 10^4$ entspricht der Zellzahl/ml. Als Verdünnungslösung wurde 0,5% Trytanblau eingesetzt (Materialien s. Kapitel 3.7).

Um genügend Zellen für die einzelnen Zellversuche zu gewinnen, wurde ein Teil der Zellen drei bis vier Tage vor Versuchsbeginn in separate 75 cm³ Zellkulturflaschen überführt. Dieser Vorgang ist bereits im oberen Teil des Kapitels beschrieben.

4.2.1 Ausplattieren der Zellen

Bei den Versuchen, bei denen zunächst eine Transfektion mit einem Plasmid durchgeführt wurde, erfolgte ein Ausplattieren der Zellen auf Zellkulturplatten (6-Well bzw. 12-Well-Plates).

Die in den mittleren (75 cm³) Zellkulturflaschen heran gezüchteten Zellen wurden bei einer ungefähren Konfluenz von 80-90 % mit PBS gewaschen, jeweils mit 2 ml Trypsin beschichtet und in ein neues Zellkulturmedium aufgenommen. Die Menge des Mediums wird hierbei reduziert, um eine Konzentration der Zellen in der Suspension zu erreichen. Dann erfolgte eine Auszählung in der Rosenthal-Zählkammer und es wurde im Anschluss daran eine bestimmte Menge Zellsuspension entnommen und mit frischem Medium verdünnt, um so die gewünschte Zellmenge in dem gewünschten Volumen zu erhalten.

In jedes Well in dem 6-Well-Plate wurden dann jeweils 2 ml Zellsuspension mit ca. 500.000 Zellen pipettiert und diese dann für 24h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

4.3 Transiente Transfektion mit Expressionsvektoren

Durch diesen Vorgang werden geeignete Vektoren (Plasmide) in eukaryote Zellen eingebracht, um eine in der DNA gespeicherte Information in Form von Proteinen in den Zellen zu exprimieren.

Hierfür wurden Vektoren transferiert, die die jeweils kodierenden Regionen für Integrin beta 3 enthielten. Diese wurden zuvor in pcDNA3.1 (+)-Expressionsvektoren kloniert.

Als Negativkontrolle wurden bei allen Versuchen Zellen mit dem Leerplasmid (mock) pcDNA3.1 (+) transfiziert (Materialien s. Kapitel 3.8).

Die Transfektion wurde dann mittels eines Western-Blot kontrolliert (siehe unten).

In Invasionsassay-Versuchen wurden diese Zellen dann mit Osteopontin stimuliert und deren Invasivität kontrolliert (siehe unten).

4.3.1 Transfektionsvorgang

Für den Einbau der Plasmide in die Zellen wurden PlusTM Reagent und LIPOFECTAMINETM (Invitrogen) verwendet (s. Kapitel 3.8).

Um das größtmögliche Zellwachstum und bessere Transfektionsergebnisse zu erreichen, wurde während der ersten 3 Stunden der Transfektion Basalmedium ohne FCS und Antibiotika eingesetzt (Basalmedium: DMEM und F-12 HAM im Verhältnis 1:1).

Im Verlauf wurden dann jeweils zwei Zellkulturplatten parallel verwendet, um das unterschiedliche Wachstum der Zellen in Bezug auf das Medium zu untersuchen. Zum einen wurde das oben beschriebene Basalmedium weiter verwendet und zum anderen wurde gebrauchsfertiges NCI-Medium eingesetzt.

Vor der Transfektion wurden die Zellen, wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, auf Zellkulturplatten ausplattiert und für einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert.

Die Plasmidansätze für die Transfektion wurden vor dem Auftragen auf die Zellen in sterilen Eppendorfgläsern nach folgendem Schema angesetzt.

Einer Vertiefung in einem 6-Well Plate werden folgende Menge zugeführt:

Plasmid-Ansatz:	100 µl	Basalmedium/ NCI-Medium
	1 µl	DNA (entspricht 1 µg)
	6 µl	PLUS TM Reagent
Lipofectamine-Ansatz:	100 µl	Basalmedium/ NCI-Medium
	4 µl	LIPOFECTAMINE TM Reagent

Der Plasmidansatz wurde auf dem Whirlmix gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Lipofectamine-Ansatz hinzugegeben, erneut auf dem Whirlmix gemischt und für weitere 15 min bei RT inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde das Medium der Zellen in dem 6-Well-Plate abgesaugt und jedes Well mit 2 ml PBS und 1 ml Basalmedium / NCI-Medium gewaschen. Pro Well wurden dann 0,8 ml Basalmedium bzw. 1,8 ml NCI-Medium vorgelegt und nach Ablauf der 15 min die DNA-Komplexe dazu pipettiert.

Die 6-Well-Plates wurden dann für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und dem Ansatz mit dem Basalmedium 1 ml serumhaltiges Medium pro Well hinzugefügt, um das identische Arbeitsvolumen herzustellen (Medium: Basalmedium mit 20 %FCS).

Die sich daran anschließende Transfektion dauert 24 Stunden.

4.3.2 Gewinnung der Proteinextrakte nach Transfektion

Die durch die Transfektion produzierten Proteine sollen in einer Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Hierfür wurden die Zellen 24 Stunden nach dem Start der Transfektion von ihrem Untergrund mittels eines Zellscrapers gelöst, lysiert und dann eingefroren. Zunächst wurde das Medium von den Zellen vorsichtig abgesaugt und diese dann mit 2 ml PBS pro Well gewaschen. Zur Zelllyse wurde dann pro Well 100 µl Lysispuffer (PCSB 1:50 mM Tris (pH 6,8), 1 % SDS, 10 % Saccharose) hinzugegeben und die Plates sofort auf Eis gestellt, um die Proteine vor Abbau durch die Proteasen zu schützen. Mittels eines Zellscrapers wurden die Zellen vollständig vom Boden der Zellkulturplatten gelöst und in der Zentrifuge bei 5000 Umdrehungen/Minute für 5 min. kräftig resuspendiert. Die Proteinextrakte wurden dann in sterile Safe-Lock-Tubes überführt und bei -80°C eingefroren.

4.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits erfolgte die Konzentrationsbestimmung der nach Transfektion gewonnenen Proteinextrakte.

Zunächst wurden Eichlösungen bestimmter Konzentration aus der BSA-Stammlösung angesetzt. Anschließend wurden von jeder Proteinprobe und von jeder Eichlösung je zwei Eppendorfgefäße mit jeweils 50µl Inhalt auf Eis vorbereitet und mit je 1ml Arbeitslösung aufgefüllt. Die Arbeitslösung wird aus Reagent A und B im Verhältnis 50:1 angesetzt. Dann wurden die Eppendorfgefäße für 30 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Es schließt sich die Messung im Photometer bei 562 nm an. An der aus den Extinktionswerten der Eichlösungen erstellten Eichkurve lassen sich die Konzentrationen der Proteinextrakte messen.

4.4 Western Blot-Analyse

In der Western Blot-Analyse wurde zum einen der Nachweis und zum anderen die Quantifizierung der gewonnenen Proteine vorgenommen. Es fand zunächst eine SDS-

Polyacrylamid-Elektrophorese statt, um die Proteingemische in ihre Einzelbestandteile aufzutrennen. Für die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Bestandteile im elektrischen Feld sind sowohl die Größe und das Molekulargewicht der Proteinbestandteile als auch die Gelkonzentration und damit die Porengröße, durch die die Proteine „durchwandern“, entscheidend.

Daran schloss sich das eigentliche „Blotten“, das Übertragen der aufgetrennten Antigene auf eine haltbare Membran, an.

Darauf hin wurde diese Blottingmembran, mit für die Antigene spezifischen Antikörpern überschichtet, hinzugefügt und die entstehenden Antigen-Antikörper-Komplexe werden mittels eines Sekundärantikörpers sichtbar gemacht.

Die verwendeten Materialien werden im Kapitel 3.6 aufgeführt.

4.4.1 Proteinprobenvorbereitung

Der Probenansatz wurde wie folgt vorbereitet: Es wurden 13 µg des aufgetauten Proteinextraktes mit jeweils 5 µl Probenpuffer und 2 µl Reduktionspuffer angesetzt, um das Zielvolumen von 20 µl zu erreichen (s. Kapitel 3.6). Das Volumen variiert je nach Anzahl der Taschen (Bei einem Zielvolumen von 30 µl entsprechend 19,5 µl Proteinextrakt, 7,5 µl Probenpuffer und 3 µl Reduktionspuffer). Zeitgleich erfolgte die Aufbereitung des Markers (See Blue Plus 2 Prestained Standard, Invitrogen Kanada, siehe Kapitel 3.6).

Die Proben wurden auf dem Vortexer gemischt, 10 Minuten bei 70°C in dem Thermoblock inkubiert und nach dem Abkühlen auf RT für 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert.

Das Einpipettieren der Probengemische in die Sammelgeltaschen erfolgte mittels langen Pipettenspitzen.

4.4.2 Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

In der Elektrophorese werden die Proteingemische aufgrund der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Proteine im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist sowohl von der Ladung als auch von der Masse der SDS-

Protein-Komplexe anhängig. Ferner spielt die Größe der Gelporen eine entscheidende Rolle bei der Auftrennung der Proteingemische. Kleinere Proteine wandern schneller in Richtung der Anode, wohin gegen größere Proteine langsamer wandern bzw. in den Taschen „hängenbleiben“.

Zur Anwendung kam das NuPage Novex 4-12 % Bis-Tris Gel 1.0 mm von Invitrogen. Die Zusammensetzung des Trenngels fällt entsprechend der Proteingröße unterschiedlich aus:

Tabelle 4.1: Zusammensetzung des Trenngels

Bestandteile	8%	12%
Aqua dest.	4,6 ml	3,3 ml
30% acrylamide mix	2,7 ml	4,0 ml
1,5 M Tris (pH8,8)	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml
10% Ammonium persulfat	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,006 ml	0,004 ml

Die Zusammensetzung des Sammelgels variiert nicht aufgrund der Proteingröße. Es stehen 10 Geltaschen zur Verfügung, die durch des Entfernen des Kammes befüllt werden können.

Tabelle 4.2: Zusammensetzung des Sammelgels

<i>Bestandteile</i>	<i>Volumen in ml</i>
Aqua dest.	6,8
30% acrylamide mix	1,7
1,0 M Tris (pH 6,8)	1,25
10% SDS	0,1
10% Ammonium persulfat	0,1
TEMED	0,001

In die erste Geltasche wurde, wie oben bereits beschrieben, der Marker einpipettiert.

Die Elektrophoresekammern wurden mit dem vorbereiteten Laufpuffer (s. Kapitel 3.6) gefüllt und an das System wurde eine elektrische Spannung angeschlossen. Es wurde zunächst für 10 min eine Spannung von 80 V angelegt und dann die Spannung stufenweise heraufgesetzt auf bis zu 200 V. Die Zeit und die angelegte Spannung variieren durch die unterschiedlich nachzuweisenden Proteine.

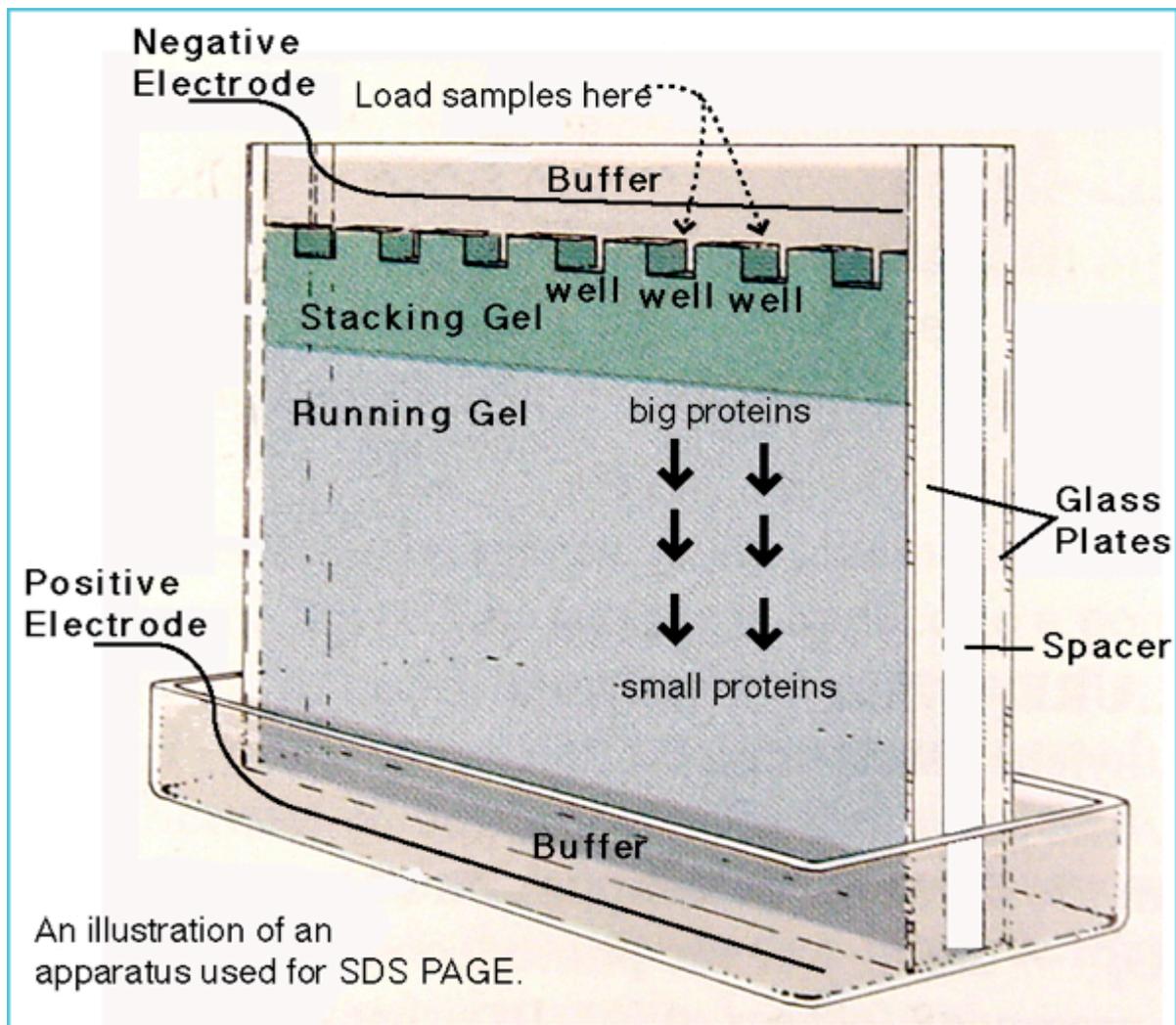


Abb. 4.2: Darstellung einer SDS-Polacrylamidelektrophorese

Modifiziert nach web.chemistry.gatech.edu/.../page_protein.html

4.4.3 Blotten

Es folgt das Überführen der aufgetrennten Proteine auf eine haltbare Membran. Dieser Vorgang wird als „Blotten“ bezeichnet.

Die Nitrozellulosemembran wird entsprechend der Größe des Gels zurechtgeschnitten und zur Hydrophilisierung in Methanol 10 %, dann in Aqua dest. und Transferpuffer geschwenkt (Materialien siehe Kapitel 3.6).

Zudem wurden 4 Lagen Gel-Blotting-Papier zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt.

Dann wurde das Gel mittels eines Spatels von den Schutzhüllen gelöst, auf die Membran aufgelegt und Gel und Membran zwischen je zwei Lagen Blottingpapier und je 3 bis 4 Polster eingelegt. Hierbei wird darauf geachtet, dass dieses „Sandwich“ mit Transferpuffer feucht gehalten wird. Dann wurde dieses in eine Blottingkammer eingespannt, die darauf ebenfalls mit Transferpuffer befüllt wird. Dabei kommt die Seite des Gel auf die Kathodenseite (-) und die Seite der Membran auf die Anodenseite (+).

Der Blottingvorgang dauert etwa 2-3 Stunden bei RT und einer Spannung von 40 V.

Nach dem Blotten wurde die Membran kurz mit Methanol 10 % überschichtet, dann mit Aqua dest. abgespült und für 30 min bei RT getrocknet. Dann wurde die Membran entweder für spätere Versuchsreihen bei -20°C eingefroren oder über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt, um am darauf folgenden Tag die Detektion durchzuführen.

Das Gel wird am nächsten Tag ebenfalls weiterbehandelt, um den Erfolg der SDS-Polyacrylamidelektrophorese zu kontrollieren und bis dahin bei 4°C im Kühlschrank über Nacht aufbewahrt.

4.4.4 Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern

Die Membran wurde vor dem Gebrauch erneut kurz mit Methanol 10 % überschichtet und mit Aqua dest. abgespült. Dann wurde die Membran für 60 min bei RT auf dem Schüttler mit PBST + 5 % Magermilchpulver geblockt. Im Anschluss daran wurde die Membran für 10 min mit PBST gewaschen.

Dann wurde die Membran für 60 min bei RT mit dem primären Antikörper auf dem Schüttler inkubiert. Der primäre Antikörper ist dabei spezifisch für das jeweilig nachzuweisende Protein und wird in der in Kapitel 3.2.1 angegebenen Verdünnung angewendet.

Es schließt sich ein Waschvorgang mit PBST für 5 und für 10 min an.

Dann folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der spezifisch für den verwendeten Primärantikörper ist (Sekundärantikörper und entsprechende Verdünnung siehe Kap. 3.2.2).

Die Inkubationszeit für den Sekundärantikörper betrug 90 min. Es folgte ein erneuter Waschvorgang mit PBST für jeweils 5 und 10 min.

4.4.5 Detektion

Die Detektion erfolgte mit einer Detektionslösung, deren Luminol durch das Ankoppeln an den Sekundärantikörper bzw. dessen Peroxidase oxidiert wird (ECL Western Blotting detection reagents Amersham Biosciences s. Kapitel 3.6). Das dadurch entstandene Reaktionsprodukt strebt aufgrund des energetisch ungünstigeren Zustandes in die Ausgangslage zurück. Abhängig von der Proteinmenge wird dabei Energie in Form von Licht freigesetzt, die dann zu einer entsprechenden Schwärzung bei dem verwendeten Röntgenfilm kommt.

Hierfür wurden jeweils 20 ml von den Reagenzien A und B des Detektionskits im Verhältnis 1:1 gemischt und dann für 1 min bei RT mit der Membran auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Membran in eine Klarsichthülle eingeschweißt. Die Belichtung wurde mit Hilfe einer Röntgenkassette in einer Dunkelkammer vorgenommen. Die Belichtungszeiten variierten aufgrund der nachzuweisenden Proteinmenge zwischen 30 Sekunden und 10 Minuten (s. Kapitel 3.6).

Im Anschluss wurden alle Membranen zusätzlich mit dem Antikörper gegen beta-Actin gefärbt und detektiert, um eine Qualitätskontrolle zu gewährleisten, dass alle Banden initial mit der gleichen Menge Protein benetzt wurden. Beta-Actin ist ein Strukturprotein, welches in ausreichender Menge in allen Zellen vorkommt.

4.5 Invasionsassay nach Transfektion mit Expressionsvektoren

Der Invasionsassay dient dem Nachweis von invasivem Wachstum von Zellen, insbesondere von Tumorzellen.

Das sich im Well befindende Insert enthält die Zellen. Der Boden des Inserts ist ausgestattet mit Membranporen, die durch Matrigel-Matrix verschlossen sind.

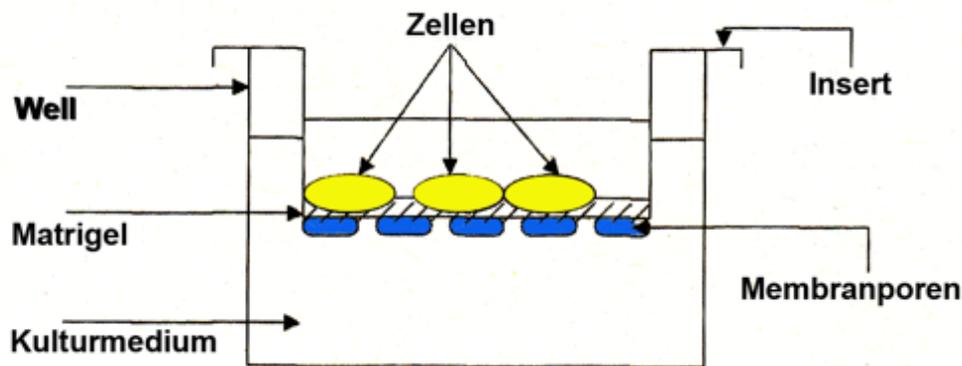


Abb. 4.3: Schematischer Aufbau des Matrigelinvasionassays.

Es wurden die NCI-Zellen in so genannte „Matrigel-Inserts“ (BD BioCoatTM MatrigelTM Invasion Chamber, s. Kapitel 3.8) eingebracht. Diese bestehen aus einer porenreichen Membran (PET-Membran) und einer Matrigel-Matrix, die als Basalmembran fungiert. Die Poren der PET-Membran sind von der Matrigel-Matrix verschlossen und das Durchwandern der Zellen gelingt somit nur solchen Zellen, die ein invasives Wachstum aufweisen. Auf diesem Weg gelingt also die Differenzierung von invasiv wachsenden Zellen, die die künstliche Basalmembran durchwandern können, und nicht-invasiven Zellen.

In den nachfolgend beschriebenen Versuchen wurde das unterschiedlich invasive Wachstum der NCI-Zelllinie nach transients Transfektion mit Expressionsvektoren für Integrin beta 3-

Proteine und dem Kontrollplasmid (mock) und anschließender Zugabe von Osteopontin zur Stimulation untersucht.

4.5.1 Transfektion

Die Zellen wurden wie in 4.2.1 erläutert 48h vor dem Beginn des Invasionsassays auf 6-Well-Plates ausplattiert. Im Anschluss daran wurde, wie in 4.3.1 beschrieben, 24 h die Transfektion mit dem Plasmid für Integrin beta 3 durchgeführt. Je nach Versuchsansatz wurden dabei pro Plasmid zwei Wells vorgesehen. Es wurde dabei ebenfalls, wie oben bereits beschrieben, mit 2 unterschiedlichen Kulturmedien (fertiges NCI-Medium und DMEM+HF12+FCS, siehe Kapitel 3.8 und 4.3.1) gearbeitet. Für ein Kulturmedium wurde jeweils eine 6-Well-Plate verwendet.

Um die erfolgreiche Transfektion zu kontrollieren, wurde, wie in 4.3.2 bereits beschrieben, im Anschluss an die Transfektion ein Teil der Zellen für eine Western-Blot-Analyse vorbereitet. Auf diesem Wege sollte der Nachweis erbracht werden, dass es durch die verwendeten Plasmide zu einer Expressierung der entsprechenden Proteine gekommen ist.

Es wurden entsprechende Proteinextrakte gewonnen und nach Bestimmung der Proteinkonzentration (s. Kapitel 4.3.3) eine Western-Blot-Analyse (s. Kapitel 4.2) durchgeführt.

4.5.2 Rehydratisieren der Matrigel-Inserts

Das Rehydratisieren der Matrigel-Inserts dient der Vorbereitung der Invasionskammern (BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber).

Die Invasionskammern, die bei -20°C aufbewahrt wurden, wurden 30 min vor Versuchsbeginn auf RT gebracht.

Auf der sterilen Werkbank wurden die Deckel der Invasionskammern zunächst mit dem vorgesehenen Invasionschema beschriftet und dann jeweils 500 µl Basalmedium (DMEM+HF 12, 37°C) in die Wells und in die Inserts pipettiert. Die Inserts wurden dabei

mit einer sterilen Pipette eingesetzt. Die Invasionskammern wurden dann für 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in dem Inkubator rehydratisiert (siehe Kapitel 3.8).

4.5.3 Herstellen der Zellsuspensionen

Während der Rehydratisierung wurden die Zellen gezählt und die entsprechend gewünschten Zellsuspensionen mit entsprechender Zellkonzentration angesetzt.

Das Medium der Zellen von den 6-Well-Plates wurde mittels einer sterilen Absaugpipette entfernt und in jedes Well 1 ml PBS einpipettiert und gewaschen. Anschließend wurde in jedes Well 400 µl Trypsin-EDTA zum Lösen der Zellen pipettiert. Nach 2 min Inkubation bei 37°C wurden die gelösten Zellen in jeweils 1 ml fertigem Medium (zum einen gebrauchsfertiges NCI-Medium und zum anderen Basalmedium DMEM + HF12) aufgenommen und in sterile Tubes überführt. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit Hilfe der Rosenthal-Zählkammer gezählt und die Ansätze in der gewünschten Zellkonzentration (125.000 Zellen pro Well) erstellt (Materialien s. Kapitel 3.8).

4.5.4 Übertragen der Zellen

Das Übertragen der Zellen von den 6-Well-Plates auf die Invasionskammern fand exakt 24 Stunden nach der Transfektion statt.

Die Kontroll-Inserts wurden ca. 15 min vor Versuchsbeginn auf RT gebracht. Nach 2h Rehydratation wurde das Medium vorsichtig von den Matrigel-Inserts und den darunter liegenden Wells abgesaugt. Das Umsetzen der Inserte erfolgte hier wieder mit einer sterilen Pinzette.

Dann wurde in jedes Well 750 µl Medium (eine Invasionsplatte mit fertigem NCI-Medium complete und eine mit Basalmedium DMEM + HF12 und der späteren Zugabe von FCS) vorgelegt und die Matrigel- und Kontroll-Inserts vorsichtig eingesetzt. Hierbei galt es, darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen unter den Inserten bildeten.

Dann wurden die vorbereiteten Zellsuspensionen kurz auf dem Whirlmix gemischt und anschließend in die entsprechend vorgesehenen Inserte einpipettiert. Pro Plasmid wurden je zwei Matrigel- und Kontroll-Inserte vorgesehen.

Im Anschluss daran wurde bei ausgewählten Invasionskammern Osteopontin zur Stimulation hinzu gegeben. Die Endkonzentration von Osteopontin sollte hierbei 5µg/Well betragen. Es wurde mit einer sterilen Pipette die entsprechende Menge Osteopontin hinzu gefügt, um die entsprechende Endkonzentration zu erreichen.

Darauf wurden die Invasionsplatten für 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Tabelle 4.3: Darstellung eines möglichen Invasionsassays

Kontrolle	Mock- Leervektor	Integrin- beta-3	Kontrolle+ OPN	Mock- Leervektor +OPN	Integrin- beta-3 +OPN
Kontrolle	Mock- Leervektor	Integrin- beta-3	Kontrolle+ OPN	Mock- Leervektor +OPN	Integrin- beta-3 +OPN

Als erstes wurden die NCI-Zellen als Positivkontrolle aufgetragen. Danach folgten die mit dem mock (pc DNA3.1+)-Leervektor transfizierten Zellen und abschließend die mit Integrin-beta-3 transfizierten Plasmide. In der Hälfte der Fälle wurde Osteopontin zur Stimulation hinzugegeben. Dieses Beispielschema wurde, wie im Text beschrieben, in zweifacher Ausfertigung, zum einen mit gebrauchsfertigem NCI-Vollmedium und zum anderen mit Basalmedium DMEM und HF 12 unter Zugabe von FCS durchgeführt.

4.5.4 Beenden des Invasionsassays

Nach 48 Stunden beginnt man mit der Entfernung der nicht invasiven Zellen von der Oberseite der Membran. Diese Reinigung muss vorsichtig durchgeführt werden, um die invasiven Zellen an der Unterseite zu erhalten. Mit einem Wattestäbchen wischt man

vorsichtig das Innere des Inserts aus. Im Anschluss daran wurden die Inserts in ein 12-Well Plate mit jeweils 500 µl fertigem NCI-Medium „zwischengelagert“, um ein Austrocknen der Zellen an der Unterseite der Membran zu vermeiden.

Das Anfärben der Zellen wurde gesondert auf einer Arbeitsplatte im Labor durchgeführt. Hierfür wurde das Diff-Quick-staining-kit (s. Kapitel 3.8) eingesetzt.

Um die nach Herstellerangaben empfohlenen Färbezeiten einzuhalten, wurden immer nur 2 Reihen der Inserts mit einer Färbelösung behandelt.

Die Inserts wurden nacheinander zuerst in 500µl der türkisenen Fixierlösung und anschließend in die gleiche Menge des roten und des blauen Farbstoffes getaucht. Die Färbezeit betrug jeweils 2:30 min. Dann erfolgte das Spülen für 5 min in Aqua dest.. Die Inserts wurden auf die zuvor beschrifteten Deckel gestellt und für etwa 30 min bei RT getrocknet. In dieser Zeit wurden Objektträger für jede einzelne Membran beschriftet.

Die einzelnen Membranen aus den Inserts wurden dann nach dem Trocknen mit Hilfe eines Skalpell und einer Pinzette kreisrund ausgeschnitten. Nach Auftragen eines Tropfens Eukitt auf die Objektträger wurden die Membranen mit der Unterseite nach unten mit Hilfe eines Deckgläschens fixiert.

Am nächsten Tag erfolgte die Auswertung unter dem Mikroskop unter 10-facher Vergrößerung und mit Hilfe eines speziellen Zähllokulars.

Durch ein festgelegtes Zählsystem wurde der Anteil an invasiven Zellen ermittelt. Hierbei wurde die unterschiedliche Verteilung der durchgewanderten Zellen auf den Membranen berücksichtigt.

4.6 Luciferase-Reporterassay

Der Luciferase Assay dient dazu, den Effekt unterschiedlicher Proteine auf die Regulation des Osteopontin-Promoters zu untersuchen. Es werden Vektoren für Osteopontin und so genannte Reporterplasmide cotransfiziert. Die Reporterplasmide enthalten die Promoterregion für Osteopontin, es entsteht jedoch als Genprodukt Luciferase. Diese kann dann quantitativ bestimmt werden.

Dies ermöglicht eine Katalysation durch die in den Zelllysaten enthaltene Firefly-Luciferase. Das Beetle-Luciferin wird in Anwesenheit von ATP und Mg^{2+} zu Oxyluciferin oxidiert. Bei dieser Reaktion frei werdende Energie kann quantitativ mittels eines Photometers gemessen werden. Die Lichtintensität entspricht hierbei der im Zelllysate enthaltenen Luciferase.

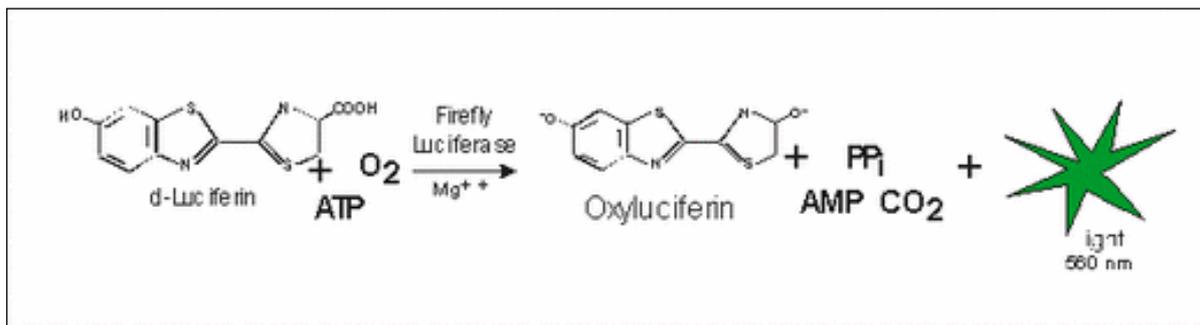


Abb. 4.4: Luciferase-Reaktion, katalysiert durch Firefly Luciferase.

Modifiziert nach <http://www.biotek.com/resources/articles/luminescent-atp-concentrations.html>

4.6.1 Cotransfektion mit Reporterplasmid und OPN-Expressionsvektor

Das Vorgehen bei der Cotransfektion wurde bereits in 4.2.1 beschrieben. Die Zellen wurden auf 6-Well-Plates ausplattiert und nach 24 Stunden transfiziert. Es standen 2 unterschiedliche Plasmide zur Verfügung. Zum einen OPN-l-Luc und zum anderen OPN-s-Luc (s. Tab. 4.4).

Pro Well wurden 5×10^5 NCI-Zellen vorgesehen. Es wurden jeweils 3 Tubes mit je 6×10^6 NCI-Zellen zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und mit jeweils 300 μ l RPMI-Medium aufgefüllt.

Pro 300 μ l Zellsuspension wurden 10 μ l Plasmid (1 μ g/ μ l) eingesetzt.

Die Plasmidansätze wurden gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Daran schloß sich eine weitere 15-minütige Inkubationszeit nach der Zugabe des Lipofectamin-Ansatzes an. Dann erfolgte das Waschen mit 1 ml PBS und 1ml Basalmedium pro Well. Pro well wurden 300 μ l Transfektionsmedium vorbereitet. Der Transfektionsvorgang wurde bereits in Kapitel 4.3.1 beschrieben.

Nach 3 Stunden Inkubationszeit bei 37 °C und 5% CO_2 wurde jedes Well mit 0,5 ml Basalmedium (mit FCS) aufgefüllt.

Tabelle 4.4: Reporterplasmide und OPN-Expressionsvektoren

OPN-l-Luc	<p>Reporterplasmid mit Osteopontin-Promoterfragment l (=long); Milde/Bamberger/ Rieck1/04.</p> <p>PCR-Produkt von käuflicher Plazenta-DNA (mit Primer OPN-pro-LF und OPN-pro-LR), kloniert in pGL3-basic-Vektor mit Luziferase (SstI-XhoI)- „Klon 6l“.</p> <p>Insert: ca. 880 bp (nt-767 bis +106 entsprechend Hijiya et al., Biochem. J. 303, 255-62, 1994)</p> <p>Vektor: 4800 bp</p> <p>Sequenzierung 1/04: 4 Basentausche an Position -66, -134, -319 und -616, davon 3 auch in anderen Klonen (Polymorphismen), nicht in Bindungstellen für Transkriptionsfaktoren.</p>
OPN-s-Luc	<p>Reporterplasmid mit Osteopontin-Promoterfragment s (=short); Milde/Bamberger/ Rieck1/04.</p> <p>PCR-Produkt von käuflicher Plazenta-DNA (mit Primer OPN-pro-LF und OPN-pro-LR), kloniert in pGL3-basic-Vektor mit Luciferase (SstI-XhoI)- „Klon 5s“.</p> <p>Insert: ca. 300 bp (nt-189 bis +106 entsprechend Hijiya et al., Biochem. J. 303, 255-62, 1994)</p> <p>Vektor: 4800 bp</p> <p>Sequenzierung 1/04: Wildtyp bis auf 1 Basentausch an Pos. -66 (in allen Klonen vorhanden, Polymorphismus)</p>

4.6.2 Stimulation mit TPA, Dexamethason und ACTH nach Cotransfektion

Parallel wurde die Veränderung der Expressionsrate durch die Stimulation der Zellen mit TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-aceat), Dexamethason (Adrenocorticotropin) und ACTH (9-Fluor-16 α -methylprednisolon) untersucht.

Es wurden, wie in Kapitel 4.6.1 bereits beschrieben die Ansätze hergestellt. Dann wurde das Transfektionsmedium nach 12 Stunden entfernt und durch jeweils 1 ml Basalmedium mit dem jeweiligen Stimulanz aufgefüllt.

Die Konzentrationen der Hormone variierten abhängig von der verwendeten Substanz.

TPA (10^{-6} M)

ACTH (10^{-9} M)

Dexamethason (10^{-6} M)

Des Weiteren wurde der Effekt durch die Kombination der einzelnen Hormone untersucht.

4.6.3 Ernte der Zellen

Exakt 24 h nach Transfektion wurden die Zellen nach einem Waschvorgang mit PBS mittels 100µl Trypsin pro Well vom Boden abgelöst. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension in je 1 ml NCI-Medium aufgenommen und in ein separates Eppendorfgesäß pipettiert. Dann wurden die Zellen in der Zentrifuge für 5 min bei 5000 U/min abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen erneut mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert. Der Restüberstand wurde vorsichtig abgesaugt und das verbleibende Pellet in 100µl Lysispuffer aufgenommen. Vor dem Einfrieren bei -80°C wurde die Lösung auf dem Vortexer kräftig für mindestens 10 min gemischt.

4.6.4 Luciferase Assay

Die Zelllysate wurden aufgetaut und etwa 10 min auf RT gebracht. Hierbei wurde darauf geachtet, dass immer nur eine bestimmte Anzahl von Eppendorfgesäßen aufgetaut wurde, da die gleichzeitige Handhabung und Messung im Luminometer die Messergebnisse verfälscht hätte. Die Zelllysate wurden im Anschluss daran für 5 s auf dem Vortexer gemischt und anschließend für 2 min bei 14000 U/min zentrifugiert.

Parallel wurde der Assay-Puffer im Luminometer-Röhrchen angesetzt. Hierbei wurden 100 µl Assay-Reagenz pro Luminometer-Röhrchen vorgelegt. Aus dem Überstand der Zelllysate wurden mit einer Mikropipette 20 µl abpipettiert und das Assay-Reagenz zugefügt.

Dann erfolgte die Messung im Luminometer nach zuvor erfolgter Programmierung des Gerätes (siehe Materialien Kapitel 3.8 und 3.9).

5 Ergebnisse

In diesem Teil der Arbeit werden die Versuchsauswertungen dargestellt. Die Reihenfolge der einzelnen Kapitel richtet sich nach dem Methodenteil (Methoden s. Kapitel 4).

In eigenen Vorarbeiten konnten sowohl verwendete laborchemische Methoden (IHC, Western Blot, Matrigelinvasionsassay, Luciferase Assay) als auch spezifische Antikörper (Osteopontin, Integrin beta3), entsprechende spezifische Plasmide und Primer ausführlich getestet werden. Ferner besteht eine langjährige Erfahrung in der Kultivierung und Auswertung von menschlichen Nebennierenkarzinomzellen.

Die statistischen Daten sind mittels Microsoft Excel 2011 für Mac erstellt worden.

5.1 *Immunhistochemische Ergebnisse*

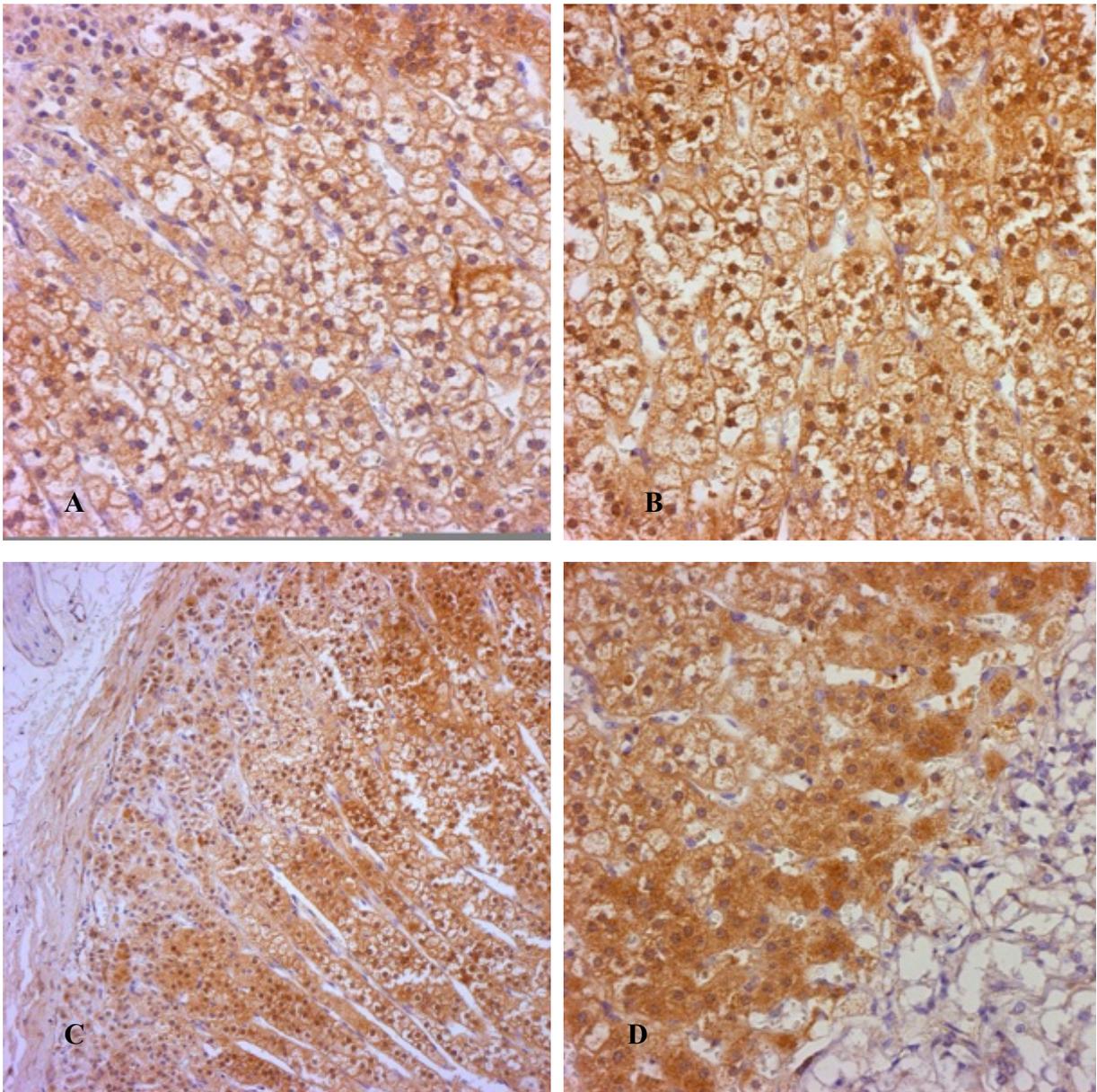
5.1.1 **Expression von OPN in der Immunhistochemie im Nebennierengewebe**

Die einzelnen Gewebeschnitte der Nebennieren wurden mit gut etablierten immunhistochemischen Markern (s. Kapitel 3.1) angefärbt um einen Nachweis von OPN zu erzielen.

Es konnte sowohl im normalen Nebennierengewebe, in Nebennierenhyperplasien als auch im Nebennierenkarzinom OPN nachgewiesen werden. Im Anschluss an die Färbung erfolgte eine Auswertung der Expressionsstärke der Antigene in qualitativen Intensitäten (s. Kapitel 4.1.4).

5.1.1.1 Expression von OPN im normalen Nebennierengewebe

Es wurden 29 Gewebeproben des normalen Nebennierengewebes immunhistochemisch untersucht. Hierbei fiel vor allem auf, dass die Zona fasciculata eine Anfärbung mit OPN zeigte.



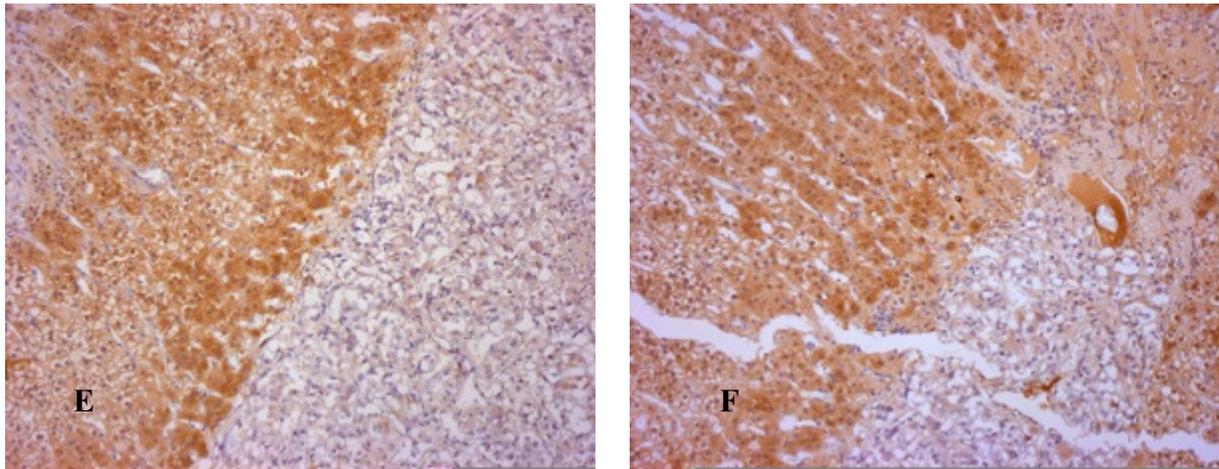


Abb. 5.1: Immunhistochemische Darstellung von OPN in normalen Nebennierengewebe. Der Nachweis der Antigene erfolgte hier mit der ABC-Methode (s. Kapitel 4.1 und Abb.4.1). Positive Zellen stellten sich braun dar.

A und B: Deutliche Anfärbung einzelner Zellen im Bereich der Zona fasciculata. Die Zellkerne stellten sich lila bzw. dunkelbraun dar; (x400) **C:** Gesamtschnitt durch das Nebennierengewebe. Schichtweise stärker ausgeprägte Expression von OPN. Der Grad der Expression von OPN war in der Zona fasciculata am stärksten nachweisbar; (x200) **D, E und F:** Deutliche Abgrenzung der Expression von OPN in der Zona fasciculata zu der Zona reticularis bzw. zur Medulla der Nebenniere. Die histologische Gliederung ließ sich hier mittels Nachweis einer Expression von OPN nachweisen; (x400 und x 160).

In der Abbildung 5.1 ist die Expression von Osteopontin in der Nebenniere dargestellt.

Es konnte erstmals ein Nachweis erbracht werden, dass OPN in der Nebenniere exprimiert wird.

Die Expression von OPN fand sich ausschließlich in der Rinde. In dem Mark der NNR konnte keine OPN-Expression nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.1 E). Weiter fiel eine zentrumsnahe Anordnung der OPN-Expression auf. Die Zona fasciculata zeigte die stärkste Expression der 3 Schichten in der Rinde der NNR (Abb. 5.1 B-E).

Es konnte also mittels der OPN- Expression die histologische Gliederung nachvollzogen werden.

Die quantitative Auswertung der Expression erfolgte in Tabelle 5.1 in Kapitel 5.2 .

5.1.1.2 Expression von OPN im hyperplastischen Nebennierengewebe

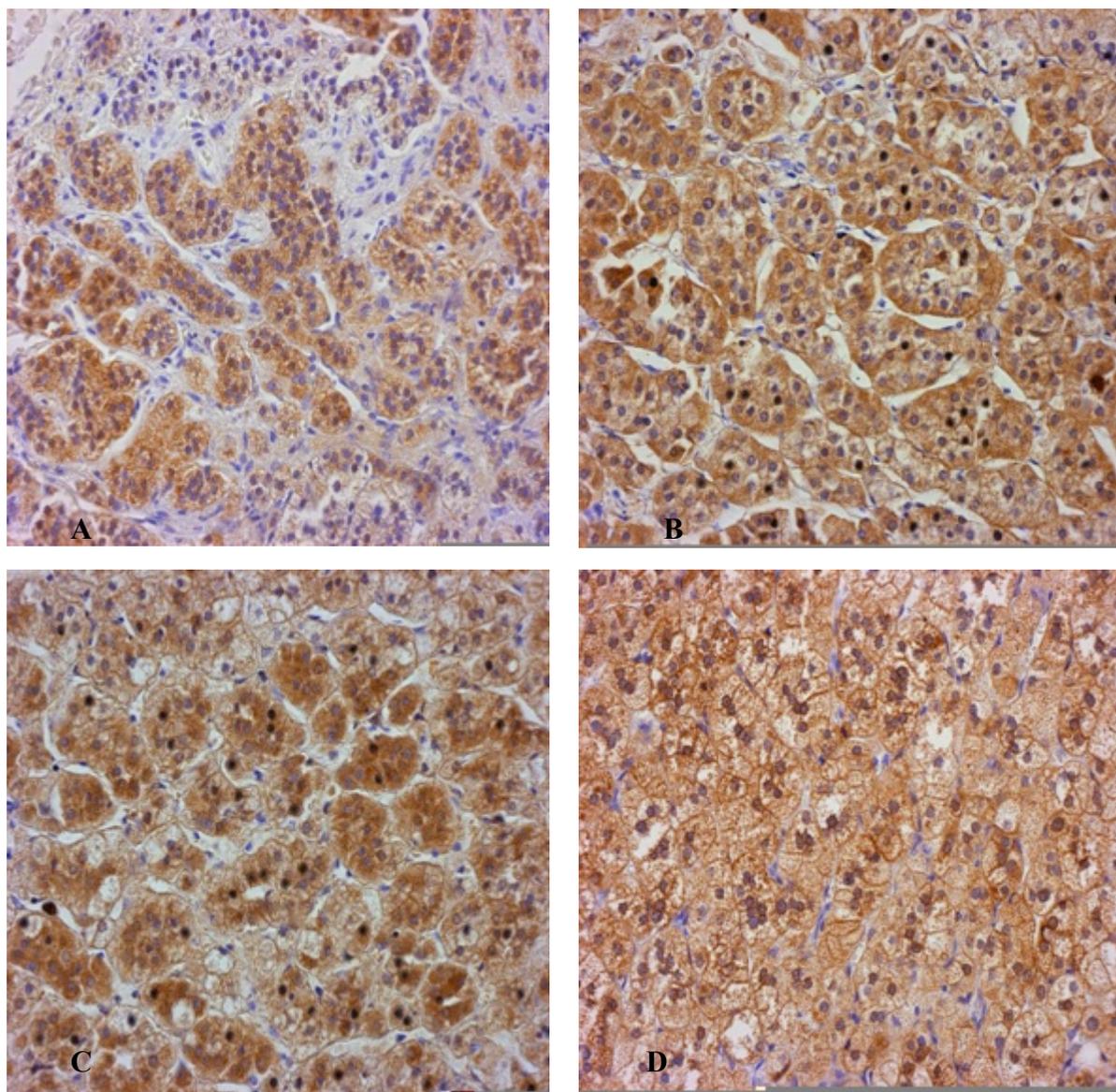


Abb.5.2: Immunhistochemische Darstellung von OPN im Nebennierenhyperplasiegewebe. Der Nachweis der Antigene erfolgte hier mit der ABC-Methode (s. Kapitel 4.1 und Abb.4.1). Positive Zellen stellten sich braun dar.

In der Abbildung 5.2 ist die Expression von OPN in der hyperplastischen NNR dargestellt. Es zeigte sich ebenfalls nur ein Nachweis von OPN in der Nebennierenrinde und nicht im Mark. Ferner konnte auch eine deutlich hervorgehobene Expression von OPN in der Zona fasciculata nachgewiesen werden. Diese Zone wirkte deutlich verbreitert im Vergleich zu den

anderen Zonen der Rinde. Die OPN-Expression zeigte eine homogenere Anordnung in der hyperplastischen NNR im Vergleich zu den normalen NNR.

5.1.1.3 Expression von OPN in Nebennierenadenomen

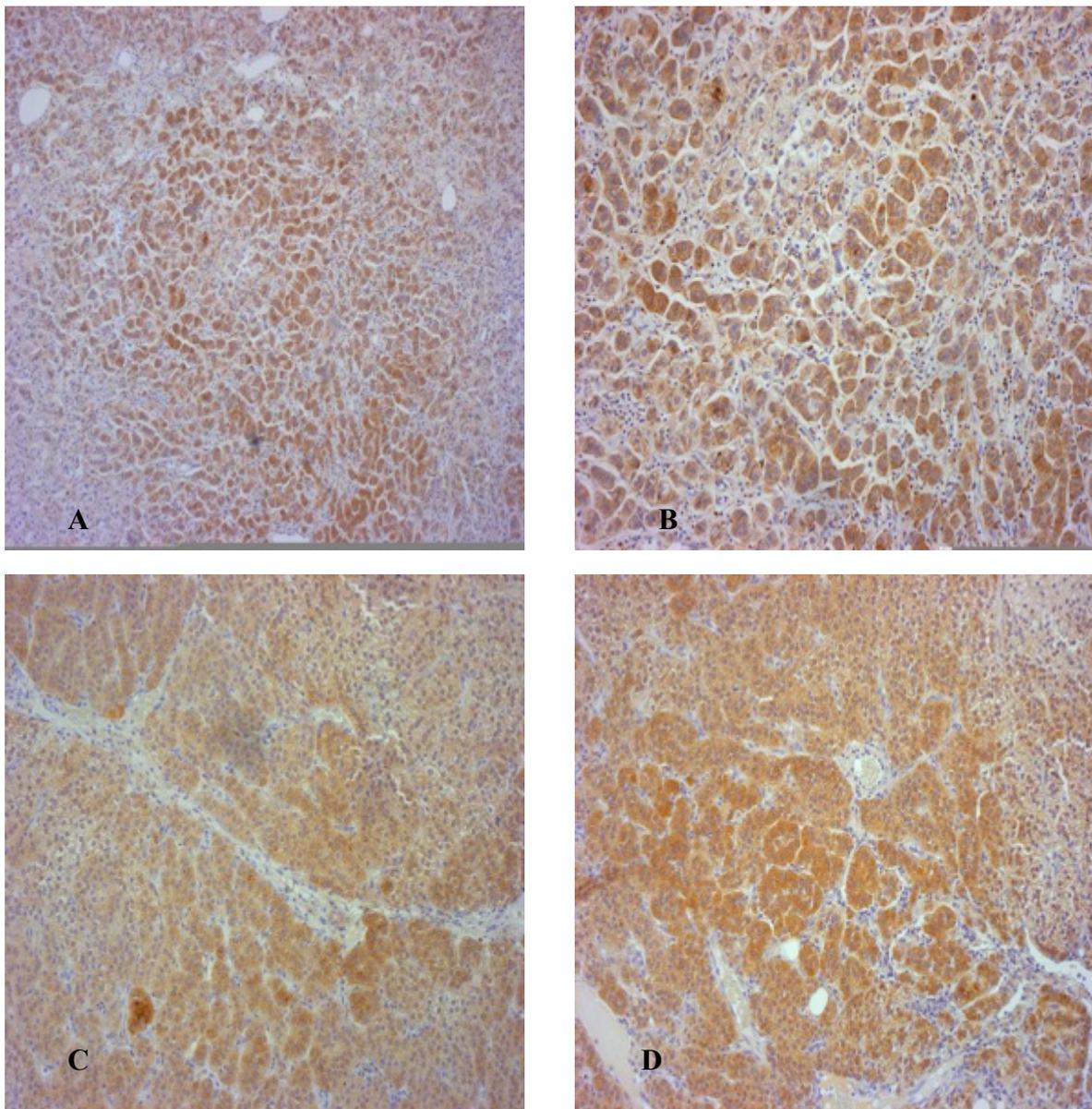
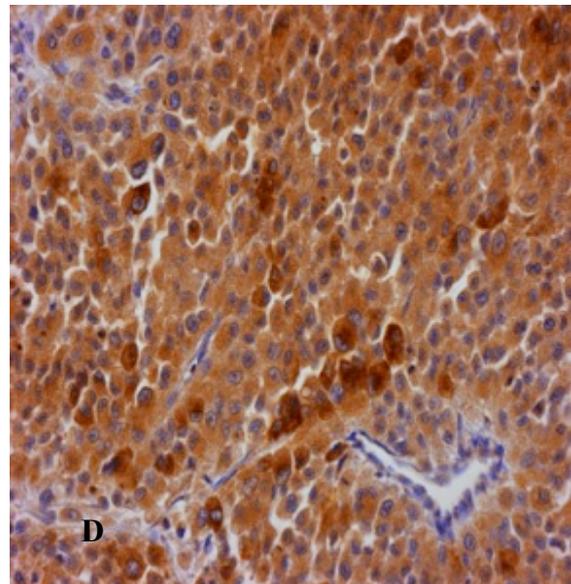
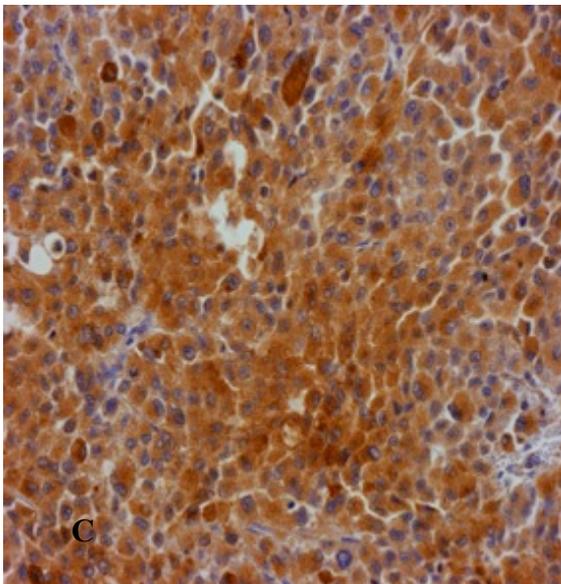
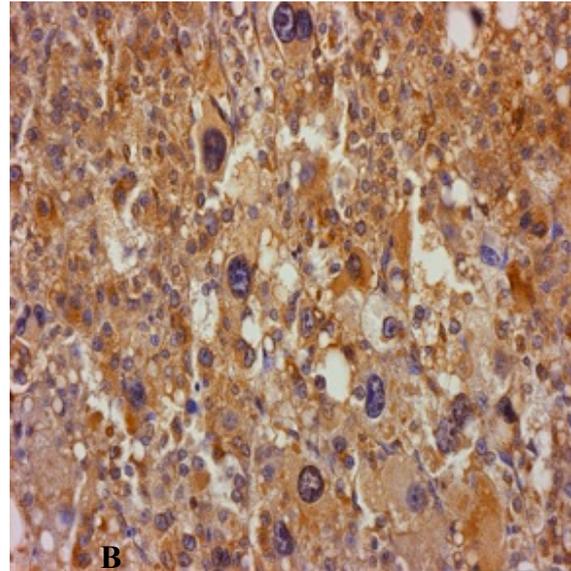
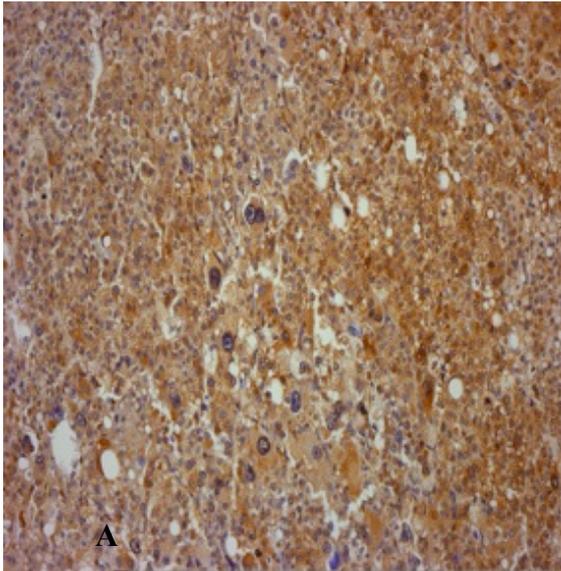


Abb.5.3: Immunhistochemische Darstellung von OPN in Adenomgewebe der Nebenniere. Der Nachweis der Antigene erfolgte hier mit der ABC-Methode (s. Kapitel 4.1 und Abb.4.1). Positive Zellen stellten sich braun dar.

Die OPN-Expression in Adenomen der NNR, in Abb. 5.3 dargestellt, wies eine heterogene Expression von OPN auf. Eine Färbung des Markes blieb aus.

Es konnte teilweise eine inselartige Anordnung der OPN- Expression beobachtet werden. Ferner fielen, wie bei den Karzinomen in 5.1.1.4 beschrieben, teilweise einzelne OPN-positive Zellen oder einzelne Zellcluster auf.

5.1.1.4 Expression von OPN Nebennierenkarzinomen



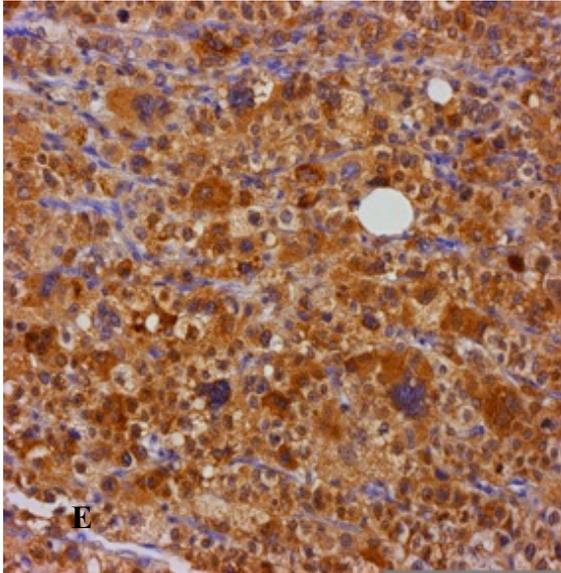


Abb. 5.4: : Immunhistochemische Darstellung von OPN in Karzinomgewebe der Nebenniere. Der Nachweis der Antigene erfolgte hier mit der ABC-Methode (s. Kapitel 4.1 und Abb.4.1). Positive Zellen stellten sich braun dar.

In den Karzinomen der Nebenniere konnte im Vergleich zu dem normalen NN Gewebe und zu den Hyperplasien die stärkste Expression von OPN in der IHC nachgewiesen werden (siehe auch 5.2 und Tabelle 5.3). Das Muster der OPN- Expression war, wie auch schon in 5.1.1.3 beschrieben, wesentlich aufgelockerter und inhomogener als z. B. bei Normalgeweben. Die Struktur der OPN Expression schien heterogen, nicht eindeutig einer Zone der NNR zuzuordnen und zeigte eindeutig einzelne Tumorzellen oder Tumorzellnester.

5.1.2 Expression von Integrin beta 3 in der Immunhistochemie im Nebennierengewebe

Die einzelnen Gewebeschnitte der Nebenniere wurden mit gut etablierten immunhistochemischen Markern (s. Kapitel 3.1 und 3.2) angefärbt um einen Nachweis von Integrin beta 3 aufzuzeigen.

Es konnte sowohl im normalen Nebennierengewebe, als auch in Nebennierenhyperplasien und auch im Nebennierenkarzinom Integrin beta 3 nachgewiesen werden. Im Anschluss an die Färbung erfolgte eine Auswertung der Expressionsstärke der Antigene in qualitativen Intensitäten (s. Kapitel 4.1.4).

5.1.2.1 Expression von Integrin beta 3 im normalen Nebennierengewebe

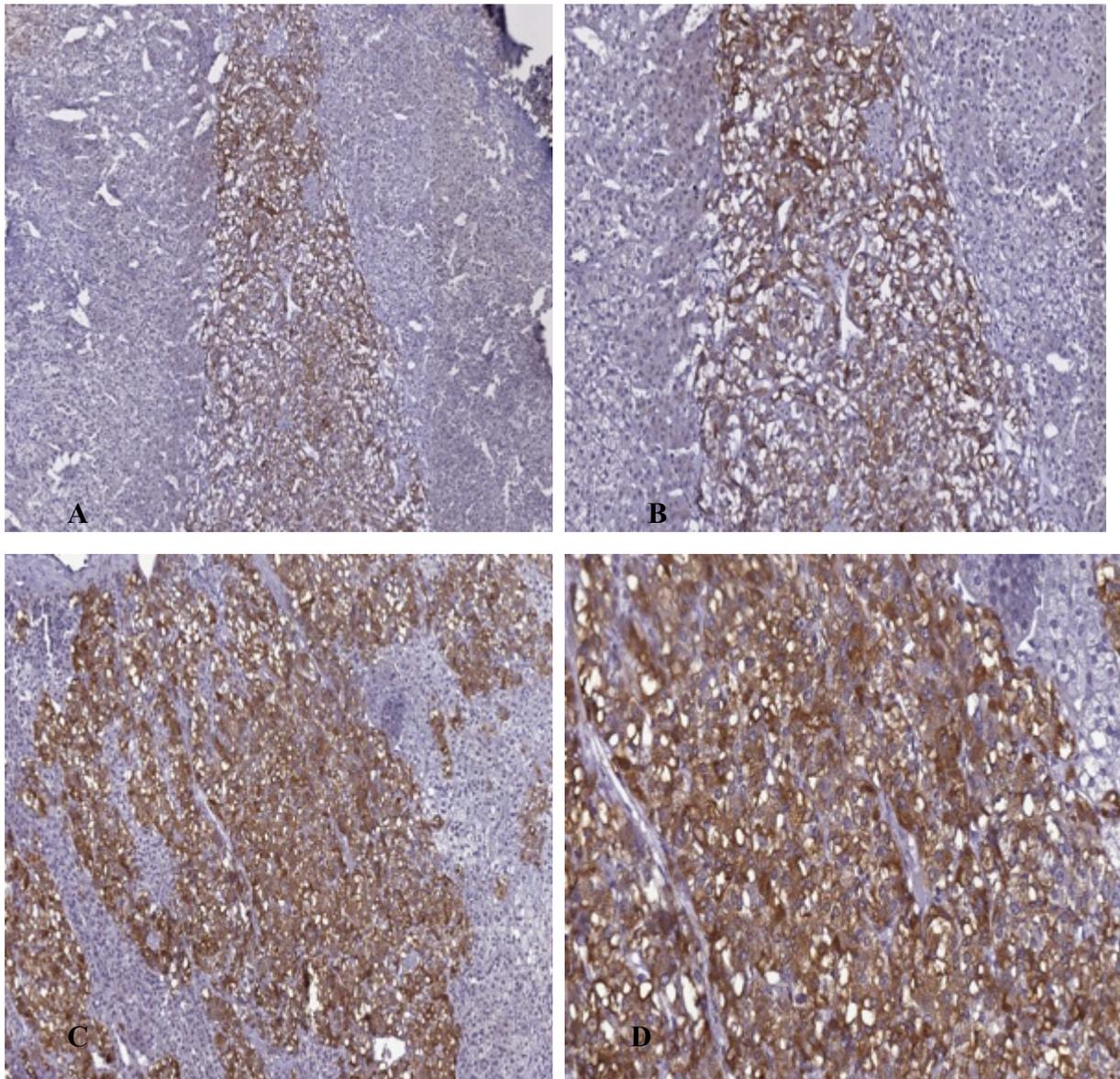
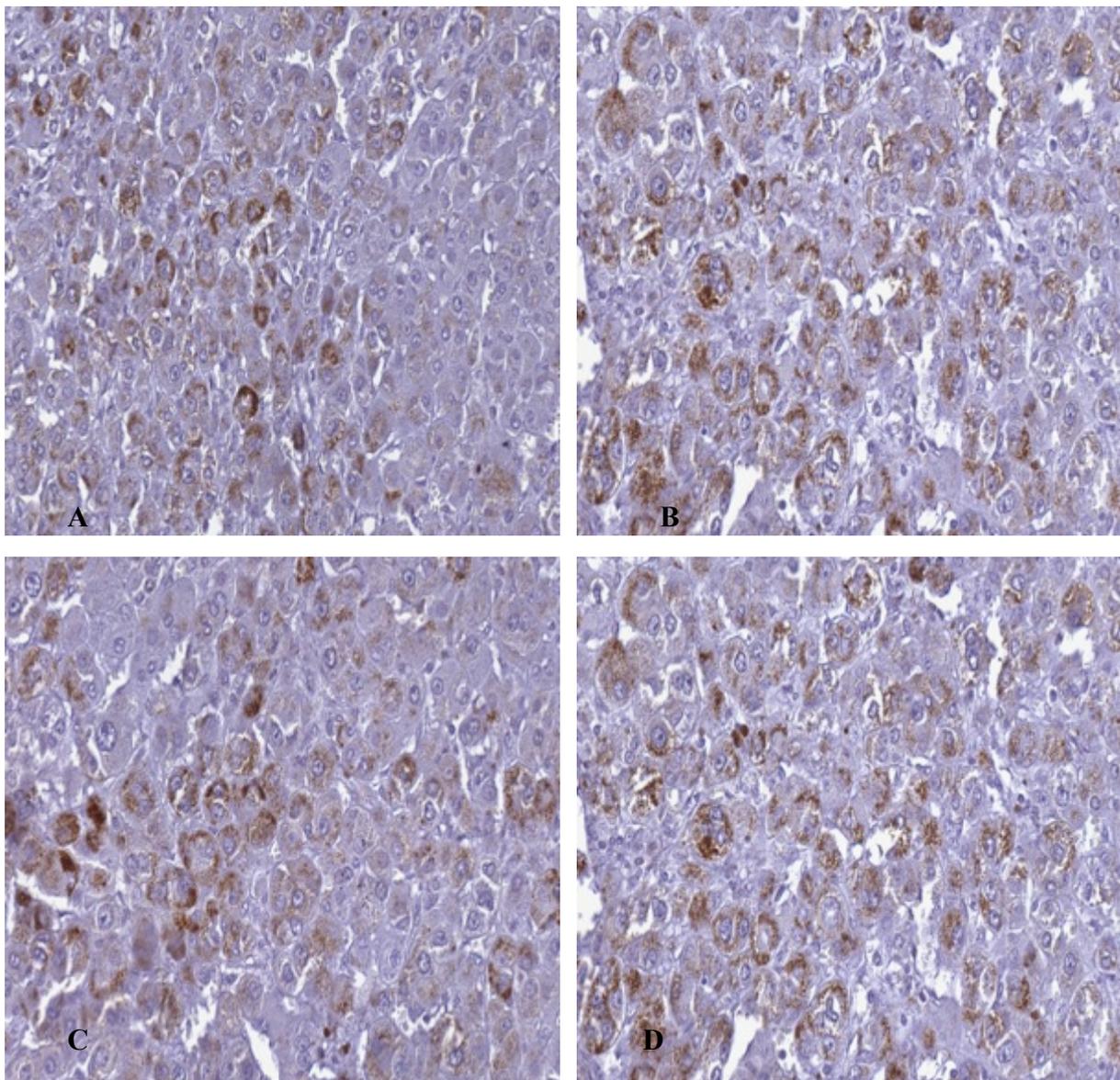


Abb. 5.5 : Immunhistochemische Darstellung von Integrin beta 3 im Normalgewebe der Nebenniere. Der Nachweis der Antigene erfolgte hier mit der ABC-Methode (s. Kapitel 4.1 und Abb.4.1). Positive Zellen stellten sich braun dar.

Integrin beta 3 ist ein Rezeptorkomplex von OPN in der Nebenniere. Es konnte mittels der Immunhistochemie eine Kolokalisation von Integrin beta 3 und OPN nachgewiesen werden (siehe auch 5.1.3).

In der Abbildung 5.5 ist Expression von Integrin beta 3 in der normalen Nebenniere dargestellt. Es fiel ebenfalls wie bei der IHC zum Nachweis der OPN Expression eine schichtweise Anfärbung auf (Abb. 5.5 A und B). Hierbei handelte es sich hauptsächlich um die Zona fasciculata.

5.1.2.2 Expression von Integrin beta 3 im Nebennierenkarzinom



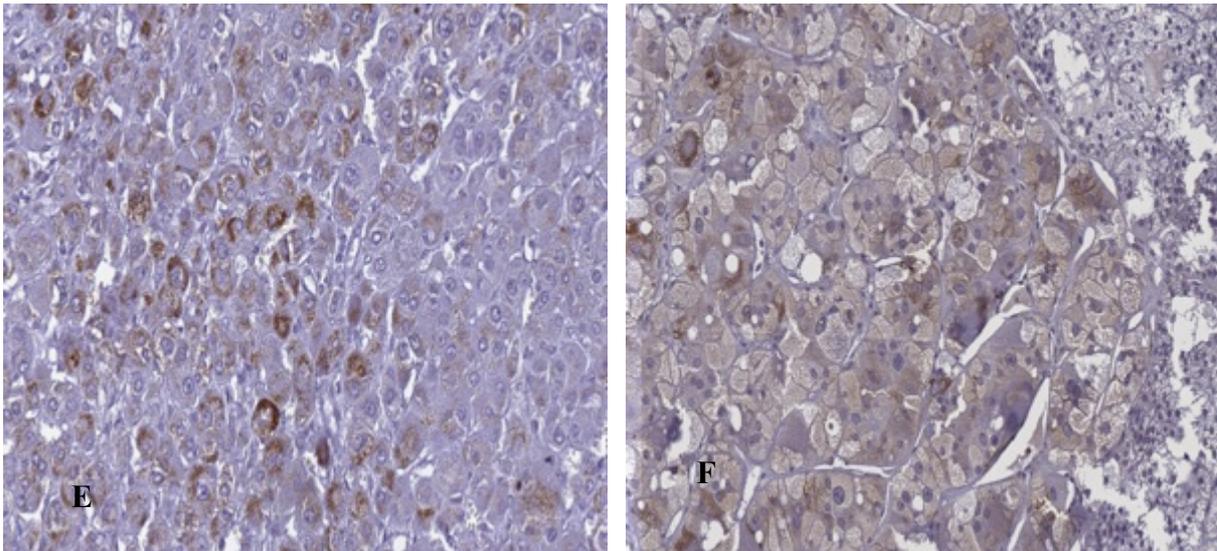


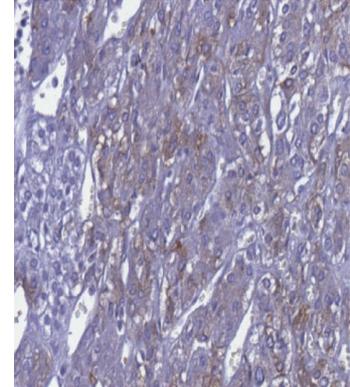
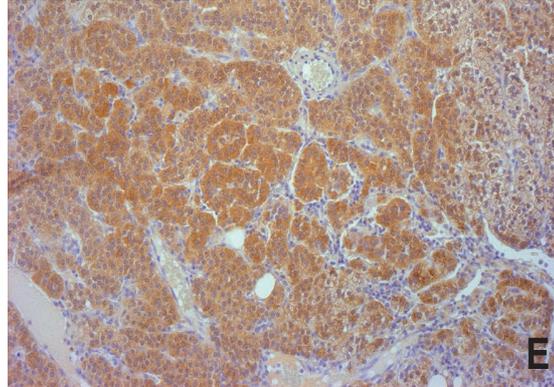
Abb. 5.6: Immunhistochemische Darstellung von Integrin beta 3 im Nebennierenkarzinom. Der Nachweis der Antigene erfolgte hier mit der ABC-Methode (s. Kapitel 4.1 und Abb.4.1). Positive Zellen stellten sich braun dar.

Bei der Anfärbung in Karzinomen der NN zum Nachweis von Integrin beta 3 fand sich das inselartige und heterogene Muster wie bereits bei der OPN Expression wieder.

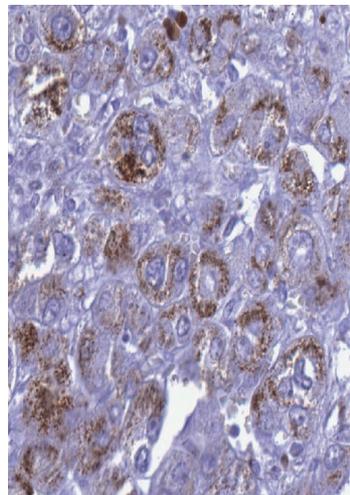
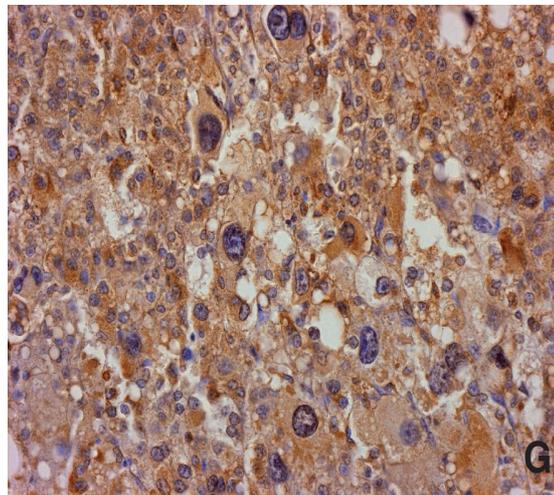
Es fanden sich einzelne Zellen und Zellcluster, wo ein Nachweis der Expression von Integrin beta 3 auffällt. Dieses lässt auf eine Colokalisation der Expression von OPN und Integrin beta 3 in der Nebenniere schließen.

5.1.3 Gegenüberstellung der immunhistochemischen Ergebnisse

Adenoma



ACC



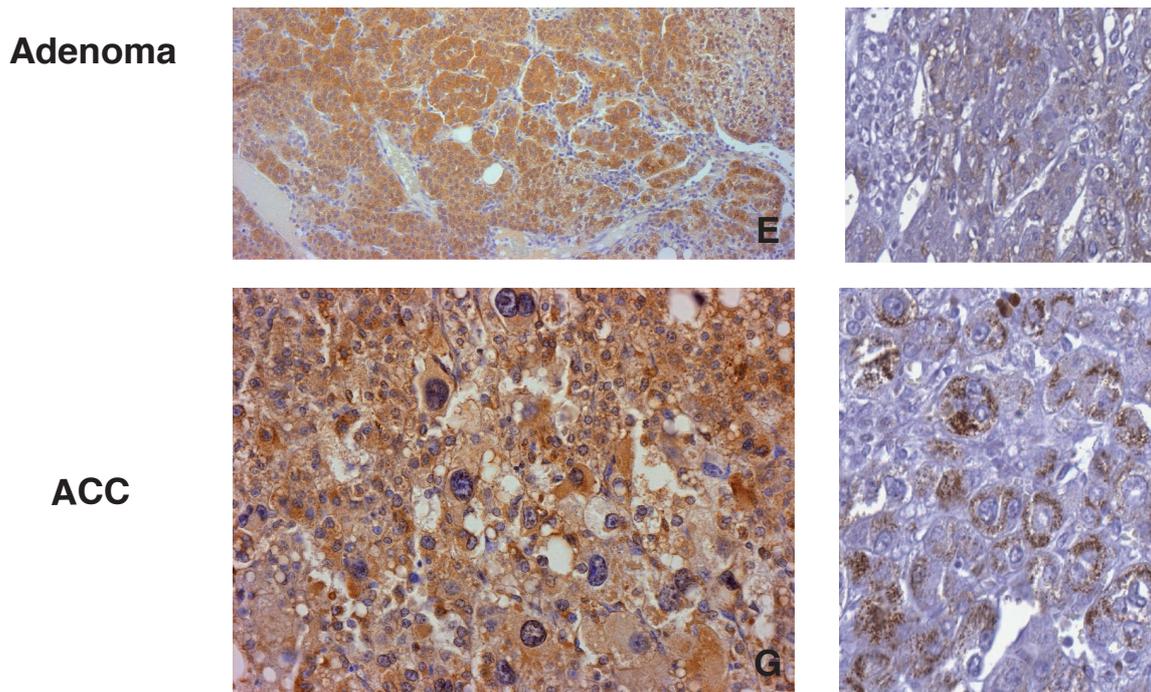


Abb. 5.7: Immunhistochemische Darstellung von OPN und Integrin beta 3 in der normalen Nebenniere (A und B), in der hyperplastischen Nebenniere (C und D), in Nebennierenadenom (E und F) und im Nebennierenkarzinom G und H). Die jeweils positiven Zellen stellten sich braun da (Vergrößerungen 1:400- 1:100)

Die Abbildung 5.7 zeigt nochmal das einheitliche Färbungsmuster von OPN und Integrin beta 3 in Bezug auf die einzelnen histologischen Gewebe.

Wie bereits in dem vorherigen Kapitel beschrieben fiel hierbei eine eindeutige Expression in der Rinde der NN auf. Ferner war die Expression von OPN und dessen Rezeptor Integrin beta 3 in der normalen Nebenniere wesentlich homogener und eindeutig der Zona fasciculata zuzuordnen. In der Adenomen bzw. vor allem den untersuchten Karzinomen fiel ein stärkeres, teilweise gruppiertes, Expressionsmuster auf.

5.1.4 HE-Immunfärbung der Nebenniere

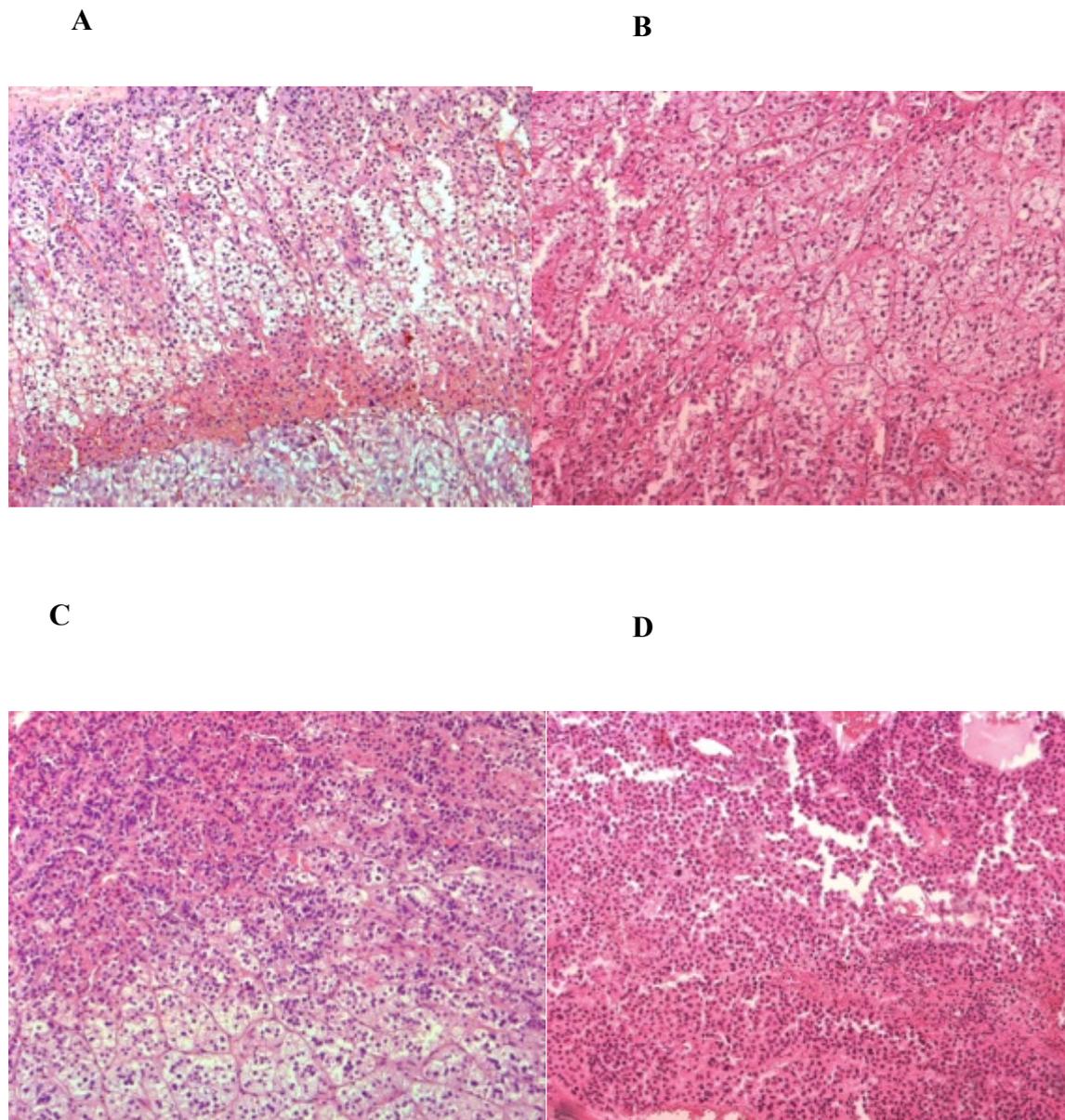


Abb. 5.8: HE- (Hämalaun-Eosin) Färbung der Nebenniere

In Bildteil **A** ist die normale Niere angefärbt. Man erkennt die Rinden- Mark- Gliederung. Es stellen sich die lipidreichen Zellen der Zona fasciculata und die Markzellen mit basophilem Plasma dar. In **B** ist die Architektur einer Nebennierenhyperplasie dargestellt. Man erkennt eine verdichtete Anordnung lipidreicher Zellen in den verbreiterten Zonen. **C** stellt das Adenom der Nebenniere dar. Es fällt eine knotige Architektur auf. Das Nebennierenkarzinom ist in **D** aufgezeigt. Die zerstörte Rindenstruktur fiel auf. Man sieht vergrößerte Zellkerne und „giant cells“ mit mehreren Kernen.

5.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Auswertung erfolgte nach dem im Kapitel 4.1.4 erläuterten Prinzip.

Die einzelnen histologischen Schnitte wurden in der Tabelle laufend nummeriert.

Tabelle 5.1: OPN – Expression in Nebennierenhyperplasien

<i>Fallnummer</i>	<i>Färbeintensität</i>	<i>% der positiven Zellen</i>	<i>Kommentare</i>
1	2	30	-
2	2	30	Dicke Stränge, das Stroma ist negativ
3	1-2	30	Diffuses Färbungsmuster
4	1-2	20-30	Einzig Färbung der Aussenzone
5	2	40	Kribiformes Muster
6	2	30	-
7	2-3	30	-
8	2	30	-
9	1	Unspezifisch	-
10	1-2	30	-
11	-	-	-
12	2	20	-
14	2-3	30	Gehäuft faserartige und knotige Anordnung
15	2	30	-
16	Negativ	Negativ	-

Tabelle 5.2 : OPN-Expression in Nebennierenadenomen

<i>Fallnummer</i>	<i>Färbeintensität</i>	<i>% der positiven Zellen</i>	<i>Kommentare</i>
1	2-3	80	-
2	2	40	Diffuse Verteilung
3	2-3	80	-
4	1	80-90	Im Inneren der pos. Zellen deutliche Zellmusterung
5	1	80	
6	-	-	-
7	2-3	50	-
8	1-3	50	Im Inneren der pos. Zellen deutliche Zellmusterung
9	1	20	-
10	2	50	-
11	1-2	40	-
12	2	30-40	-
13	2	40	Die 40% sind deutlich angefärbt, der Rest nur sehr schwach

Tabelle 5.3: OPN-Expression in Nebennierenkarzinomen

<i>Fallnummer</i>	<i>Färbeintensität</i>	<i>% der positiven Zellen</i>	<i>Kommentare</i>
1	2	100	Viele pos. Areale
2	2	40-50	Pos. Gruppen, „Giant cells“
3	2-3	80	Einz. pos. Zellen oder Gruppen
4	1-1	40	Diffuse Anordnung
5	1-2	50	Diffuse Anordnung
6	2-3	60	-
7	1-2	60	Keine Anfärbung des Markes
8	Unspezifisch	-	-
9	2-3	40-50	-
10	2-3	60	-
11	3	100	-
12	3	90	-
13	2-3	80	-
14	3	80-90	Pos. Tumorzellen und Metastasen im Fettgewebiszellen
15	1-2	40-50	Knotige Anordnung
16	2	100	-
17	2-3	100	-

In diesem Versuchsteil wurde die immunhistochemische Anfärbung von OPN in unterschiedlichen Gewebeformen der Nebenniere untersucht und ausgewertet.

Es konnte der Nachweis erbracht werden, dass OPN in der normalen Nebenniere exprimiert wird (Kapitel 5.1.1.1). In Adenomen und Hyperplasien konnte ebenfalls OPN nachgewiesen werden. Und auch in Karzinomen der Nebenniere konnte der Nachweis von OPN immunhistochemisch aufgezeigt werden. In Kapitel 5.1.1.1-5.1.1.4 wurde dargestellt, dass OPN in den einzelnen Gewebetypen in unterschiedlichsten Schichten der Nebenniere vorkommt.

In den Tabellen 5.1-5.3 wurde dargestellt in welcher Intensität OPN in den untersuchten Geweben der Nebenniere exprimiert wurde.

Hierbei wurde deutlich, dass die Intensität der Expression von OPN in Karzinomen der Nebenniere am größten ist. In den 16 untersuchten Schnitten von Hyperplasien der Nebenniere fiel auf, dass die höchste prozentuale Anfärbung der Zellen bei 30-40 % liegt. Auch die Intensität der Anfärbung fand in der Stärke 2 ihren höchsten Wert (Tabelle 5.1)

Wohingegen in den 13 Adenomfällen der NNR eine höhere Färbeintensität (teilweise 2-3) und ein höherer prozentualer Anteil (bis zu 80%) in Bezug auf OPN aufgezeigt werden konnte (Tabelle 5.2).

Die 17 in Tabelle 5.3 dargestellten Karzinomfälle wiesen die höchste OPN-Expression nach. Die Färbeintensität war in 3 Fällen sogar mit der Stufe 3 angegeben. Und auch in Bezug auf die prozentuale Anfärbung setzen sich die NNR-Karzinome von den Hyperplasien und den Adenomen ab. Es fanden sich in 400 Fällen eine 100 %-Anfärbung von OPN. Ebenfalls fiel eine deutliche Auflockerung und knotige, teils diffuse, Anordnung der positiven Zellen in Bezug auf OPN in den Karzinomen auf.

Es ließ sich also eine starke Expression von OPN in Karzinomen der Nebenniere im Vergleich zu Adenomen und Hyperplasien nachweisen.

5.3 Western Blot- Analysen

In den vorherigen Versuchen konnte erstmals der Nachweis erbracht werden, dass OPN und der entsprechende Rezeptorkomplex Integrin beta 3 in der Nebenniere exprimiert wurde. Ferner konnte aufgezeigt werden, dass sich die Expression auf die Rinde beschränkt. Die Expression ist den Adenomen und vor allem Karzinomen der Nebenniere im Vergleich zum Normalgewebe deutlich verstärkt.

Dieser Nachweis sollte im Folgenden ebenfalls auf Proteinebene erbracht werden.

5.3.1 Osteopontin im Western Blot

In diesem Versuchsteil sollte die Expression von OPN in der Nebenniere mittels eines Western Blots nachgewiesen werden.

Hierbei wurden die unterschiedlichen Gewebeschnitte untersucht und abhängig vom Gewebetyp in unterschiedlichen Banden im Western Blot dargestellt. Des Weiteren wurde die endogene Expression von OPN in der Zelllinie NCI 295 untersucht.

Abbildung 5.9 und 5.10 zeigen die unterschiedlich starke Expression von OPN in der Nebenniere, im Adenom und im Karzinom der Nebenniere.

Abbildung 5.11 zeigt den Western Blot der semiadhärent wachsenden Karzinomzellreihe NCI 295.

In Abb. 5.9 färbt sich OPN bei 55 kD bzw. 70 kD an. In der Bande 4 und 5 fällt die stärkere Anfärbung im Vergleich zum Adenom in Bande 2 und 3 auf.

Gleicherweise lässt sich dieser Unterschied auch in Abb. 5.10 festhalten, wobei die deutlich unterschiedlich starke Anfärbung hier auch beim Adenom im Vergleich zur normalen NN auffällt.

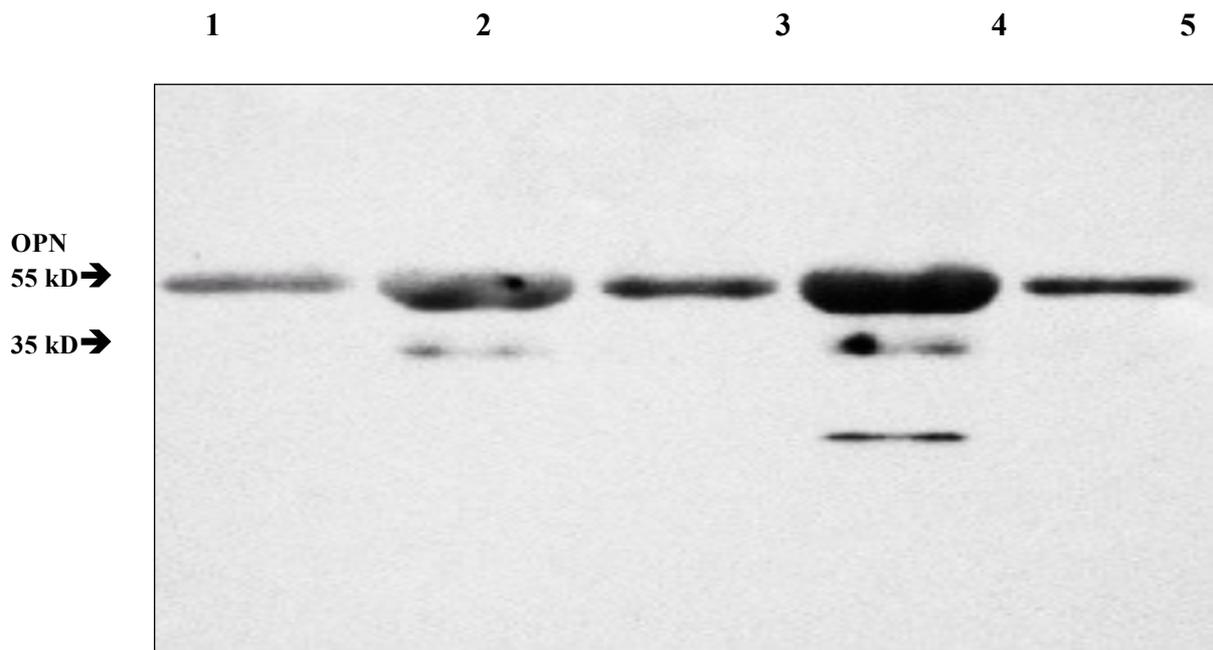


Abb. 5.9 : Western Blot- Analyse von OPN in der Nebenniere

- 1. normale Nebenniere
- 2/3. Adenom der NN
- 4/5. Karzinom der Nebenniere

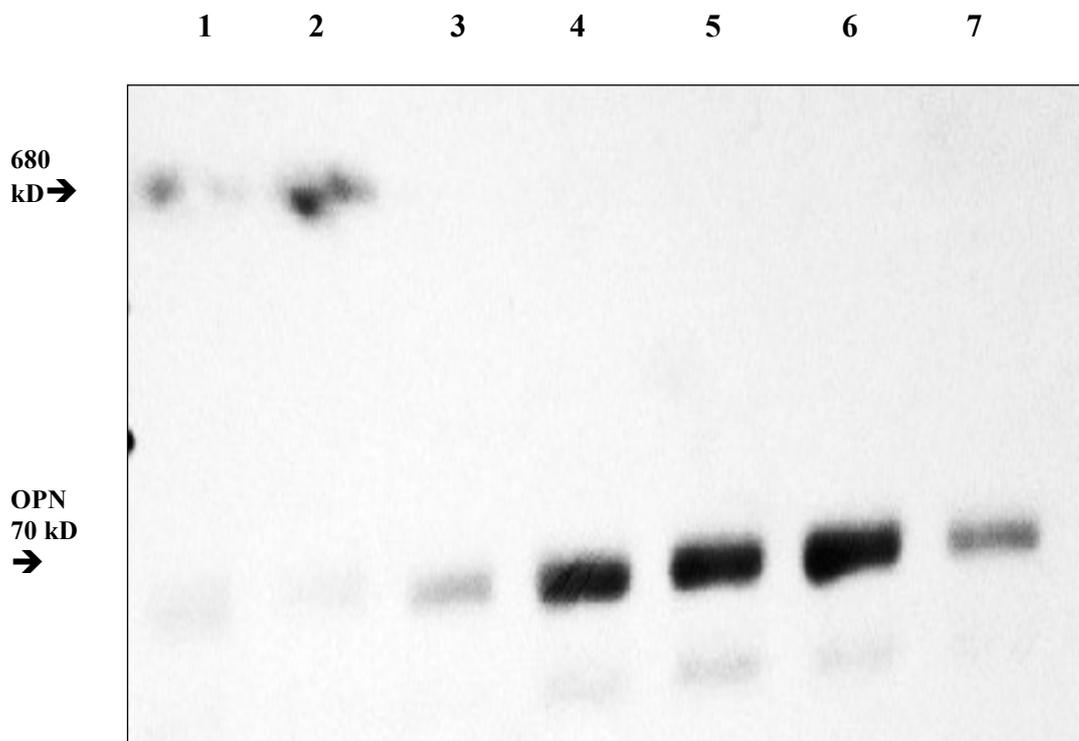


Abb. 5.10 : Western Blot- Analyse von OPN in der Nebenniere

- 1/3. Pheo
- 2/7. Normale Nebenniere
- 4/5. Adenom der Nebenniere
- 6. Karzinom der Nebenniere

In der Abbildung 5.11 kamen nochmal drei Western Blot-Analysen zur Darstellung, welche den Vergleich der OPN- Expression in normalen Nebennieren zu Adenomen und Karzinomen der Nebennieren aufzeigten.

In A sind normale Gewebe dargestellt. In B zeigte sich ein verstärktes Expressionsmuster. Hier wurden Adenome der NN untersucht.

In C sieht man, dass OPN-Expression in den Karzinomen jeweils am stärksten ausfiel. In Bande Nr. 6 in C ist die Positivkontrolle von Osteosarkom Zellen aufgetragen.

Es wurde jeweils „beta-Actin“ mit aufgetragen, um die jeweils untersuchte Proteinmenge aufeinander abzustimmen.

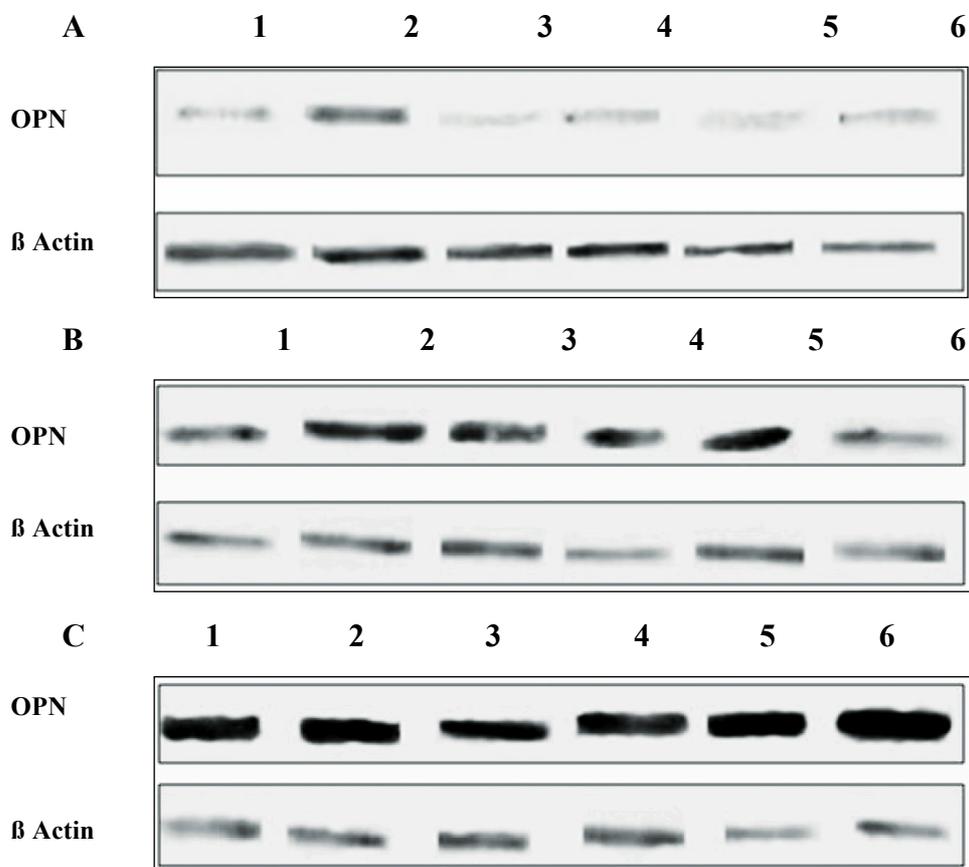


Abb. 5.11 : Western Blot-Analyse von OPN in der Nebenniere

A: Normale Nebenniere

B: Adenom der Nebenniere

C: Karzinom der Nebenniere (Bande Nr. 6 Positivkontrolle Osteosarkom)

In der Abbildung 5.13 wurden die Proteingemische von Lysaten der Karzinomzelllinie NCI 295 R der Nebenniere gegen das normale Nebennierengewebe aufgezeigt. Es zeigte sich eine deutliche Anfärbung von OPN bei 60 kD in den Karzinomen.

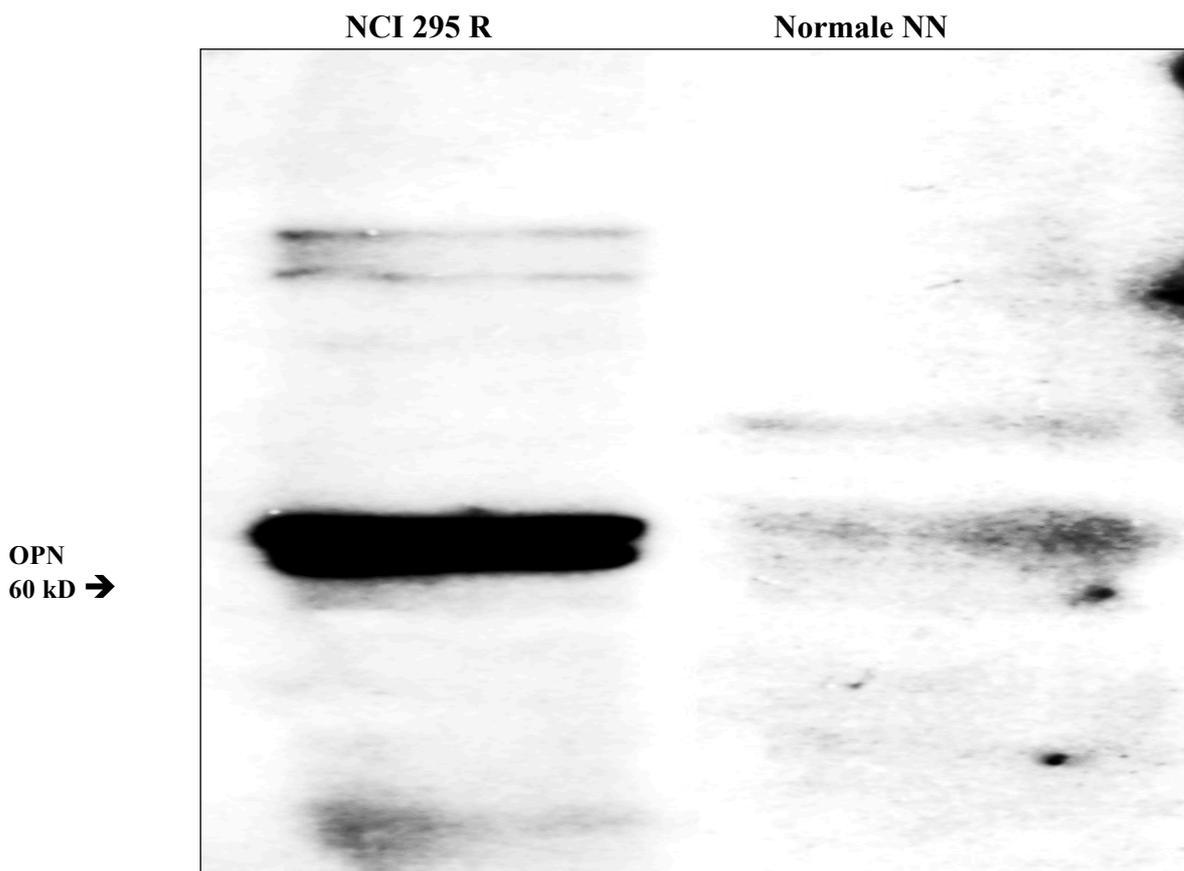


Abb. 5.12 : Western Blot- Analyse von OPN von Lysaten der Zelllinie NCI 295 R und in der normalen Nebenniere

5.3.2 Integrin beta 3 im Western Blot

In diesem Versuchsteil sollte die Expression von Integrin beta 3 in der Nebenniere mittels eines Western Blots nachgewiesen werden.

In der Abbildung 5.13 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Banden Nr. 1 - 3 zeigten die Expression in der normalen Nebenniere. Die Expression im Adenom ist in den Banden Nr. 4 und 5 dargestellt. Die deutlich stärkere Expression im Karzinom, wobei die Bande Nr. 8 dieses nicht eindeutig wiedergab, ist in den Banden Nr. 6 - 8 zu sehen. Als Positivkontrolle wurde das menschliche Osteosarkom gewählt. Dieses ist der Bande Nr. 9 zu sehen.

Hier wurde ebenfalls wie in den zuvor dargestellten Western Blots mit OPN eine zweite Anfärbung des Blots gegen „beta-Actin“ vorgenommen. Diese Ladungskontrolle mit beta Actin diente dem Nachweis, dass auf alle Banden die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde. Beta-Actin ist ein Strukturprotein, welches in vielen Geweben vorkommt (siehe auch Kapitel 4.4.5).

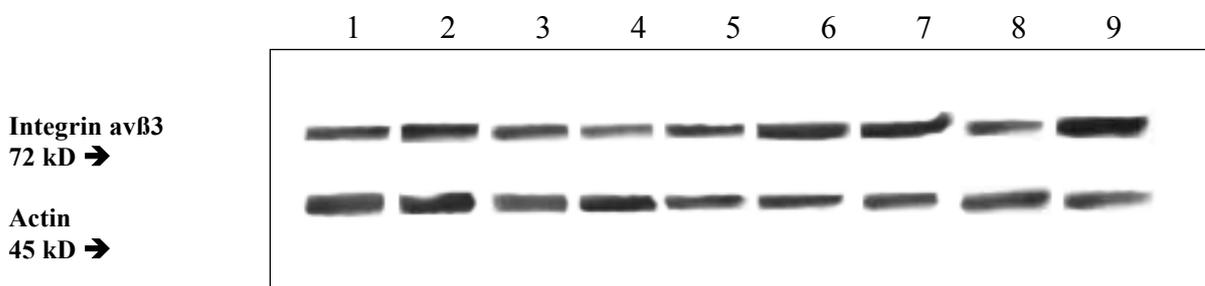


Abb. 5.13 : Western Blot –Analyse von Integrin beta 3 und Actin in der Nebenniere

- | | |
|--------|----------------------------------|
| 1/2/3. | Normale Nebenniere |
| 4/5. | Adenom der Nebenniere |
| 6/7/8. | Karzinom der Nebenniere |
| 9. | Osteosarkom als Positivkontrolle |

5.4 Invasionsassay

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Expression von OPN immunhistochemisch und auf Proteinebene unterschiedlich stark ausgeprägt war. Es konnte eine verstärkte Expression in den Adenomen der Nebenniere im Vergleich zu den normalen Nebennieren festgestellt werden. Die Karzinome wiesen eine im Vergleich zu den Adenomen wiederum noch intensivere Expression auf. Dieses konnte sowohl in der quantitativen Auswertung in der IHC als auch in den Western Blot- Analysen nachvollzogen werden.

Im Folgenden soll dargestellt werden, wie im Rahmen von Transfektionen von Plasmiden sich die Invasivität von Karzinomzellen verändern kann. Als Modell dienten die Karzinomzellen der Nebenniere NCI 295. Hierbei galt es zunächst die Plasmide in die Zellen zu transfizieren. Es wurden wie in Kapitel 4.3 beschrieben zunächst entsprechende Plasmidvektoren in die Zellen transfiziert. Verwendet wurden hier zum einen das Leerplasmid pc DNA3.1(+) (im folgenden mit mock bezeichnet) und zum anderen Vektoren, die die kodierenden Regionen für Integrin beta 3 enthielten.

Der Transfektionsvorgang wurde ausführlich in Kapitel 4.3 beschrieben. Die Zellen wurden entsprechend vorbehandelt und mit Lipofectamin behandelt, um das Eindringen der entsprechenden Plasmide zu kontrollieren.

Im Anschluss wurde jeweils der Erfolg der Transfektion mittels einer Western Blot-Analyse kontrolliert (siehe Kapitel 4.5.1)

Die transfizierten Zellen wurden dann wie beschrieben mittels TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat), Dexamethason (Adrenocorticotropin) und ACTH stimuliert und entsprechend ausgewertet. Im Rahmen dieses Versuches wurden zusätzlich im Anschluss an die Transfektion die entsprechend transfizierten Zellen mittels Osteopontin stimuliert und deren Invasivität im Rahmen eines Invasionsassays ausgewertet.

Im Invasionsassay wurde das invasive Wachstum von Zellen quantitativ *in vitro* unter Nachahmung derer physiologischer Bedingungen ausgewertet.

Es wurde die Anzahl derer Zellen ermittelt, die die Matrigel-Beschichtung (*in vivo* der Basalmembran entsprechend) durchdringen konnten, ermittelt und entsprechend verglichen (siehe auch Kapitel 4.5 und Abb. 4.3).

Die Ergebnisse dieses Versuchsaufbaues sollen in den folgenden Abbildungen exemplarisch dargestellt werden.

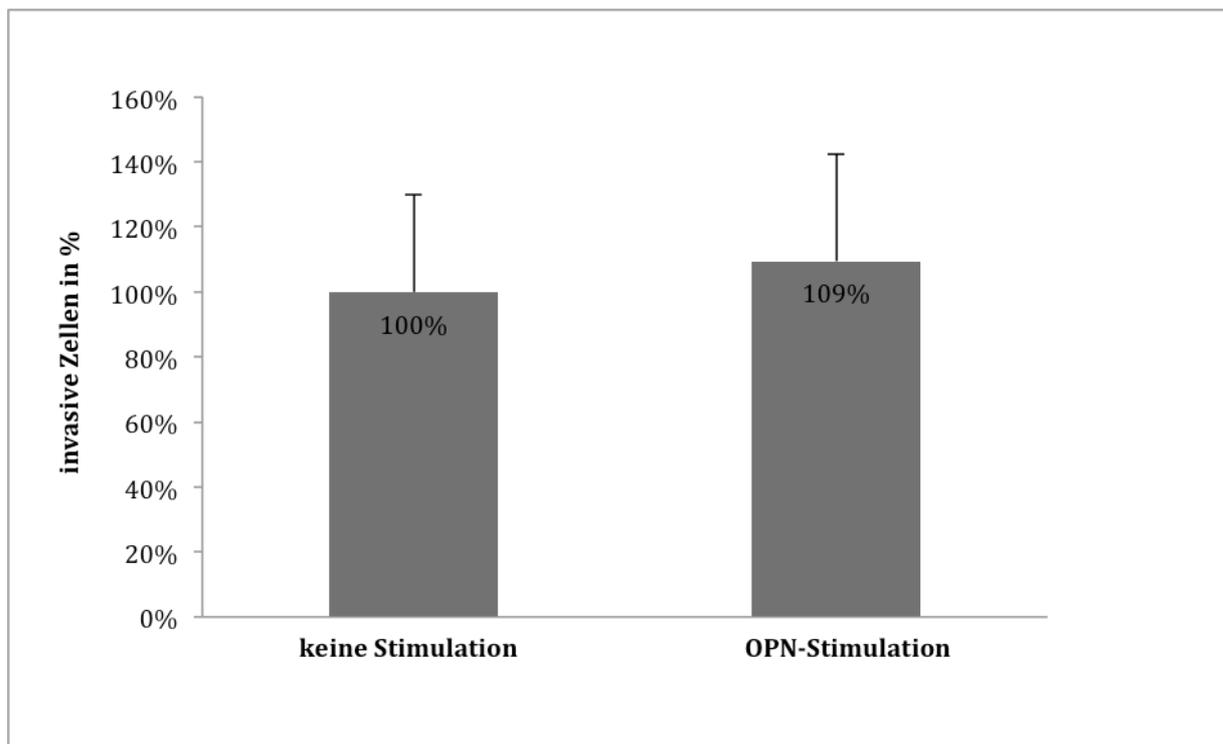


Abb. 5.14 : Auswertung des Matrigelinvasionassays für Karzinomzellen NCI 295 ohne und mit Stimulation mit OPN ohne Transfektion eines Plasmidvektors.

Dargestellt wurde die Invasivität der Karzinomzellen auf der vertikalen Achse. Zum Vergleich wurde das invasive Potential nach OPN-Stimulation dagegen aufgetragen.

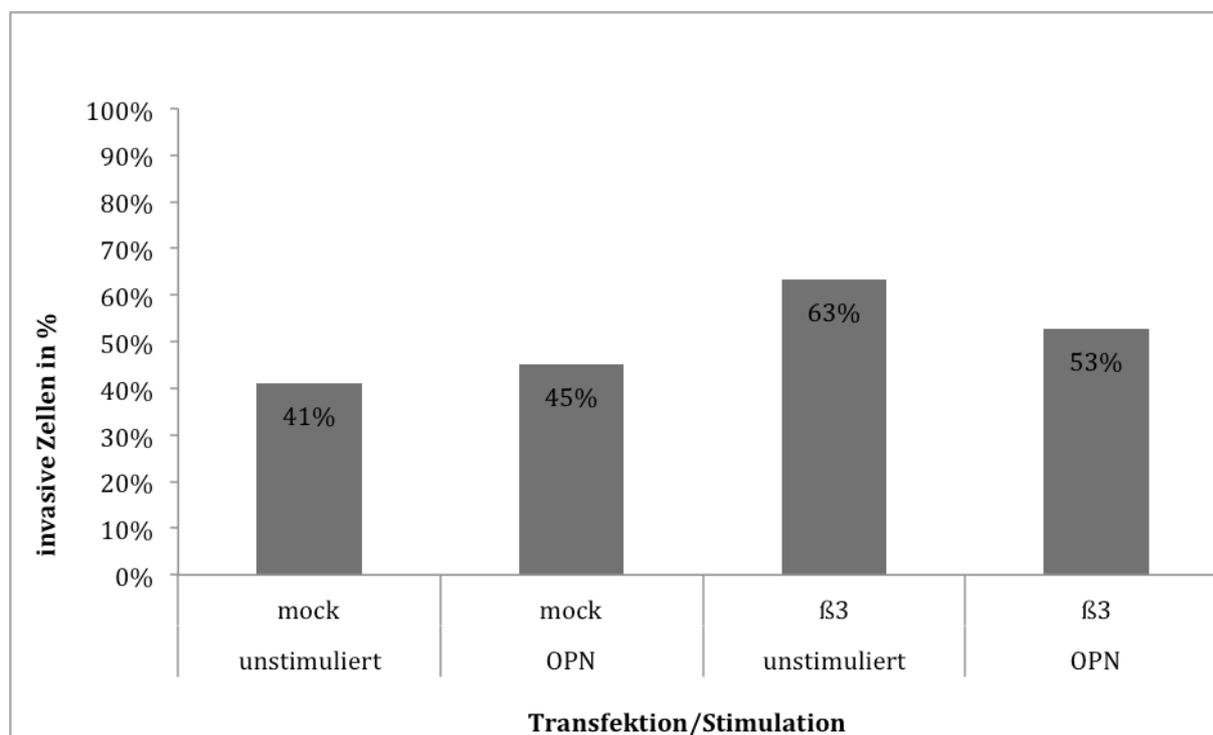


Abb. 5.15 : Auswertung des Matrigelinvasionassays für Karzinomzellen NCI 295 ohne und mit Stimulation und ohne und mit Transfektion des Integrin beta 3 Plasmidvektors.

Dargestellt wurde die Invasivität der Karzinomzellen auf der vertikalen Achse.

In der ersten Bande in Abbildung 5.15 fand sich die unstimulierte und nicht transfizierte Zelllinie. Das invasive Potential der Karzinomzelllinie NCI 295 wurde hier mit 41% angegeben. Erfuhren diese Zellen jedoch eine vorige Stimulation mittels OPN zeigte sich eine Steigerung des invasiven Potentials. Dieses wurde auch in der Abb. 5.14 dargestellt.

In der dritten Bande ist das invasive Potential derer Zellen dargestellt, die zuvor mit dem Integrin beta 3 Vektor transfiziert wurden. Es fällt eine eindeutige Veränderung des invasiven Potentials dieser Zellen auf. Wurden diese Zellen zusätzlich mit OPN vor Durchwanderung der Matrigel-Membran stimuliert war dieser Effekt etwas abgeschwächt. Jedoch ließ sich aus der Darstellung entnehmen, dass deren Invasivität immer noch die der nicht transfizierten und stimulierten Zellen überstieg.

5.4.1 Proteinbestimmung im BCA Proteinassay

Dieser Proteinassay wurde angewandt, um die Proteinkonzentration in Lösungen mittels der Biuret-Reaktion zu ermitteln (siehe 4.3.3). Der violette Farbkomplex wurde in seiner Extinktion proportional zur vorhandenen Menge Protein aufgetragen. So kann die relative Menge an Protein in Relation zur Eichkurve bestimmt werden.

Exemplarisch sollte hier eine Versuchsordnung aufgezeigt werden und deren Ergebnisse in der Abbildung 5.16 dargestellt werden.

Nach dem in Kapitel 4.3 und 4.6.1 ausführlicher beschriebenen Transfektionsvorganges wurden die NCI-Zellen wie folgt stimuliert.

Stimulation der Zellen mit Dexamethason (Adrenocorticotropin) in der Konz. 10^{-6} M und ACTH (9-Fluor-16 α -methylprednisolon) in der Konz. 10^{-9} M (siehe auch Kapitel 4.6.2).

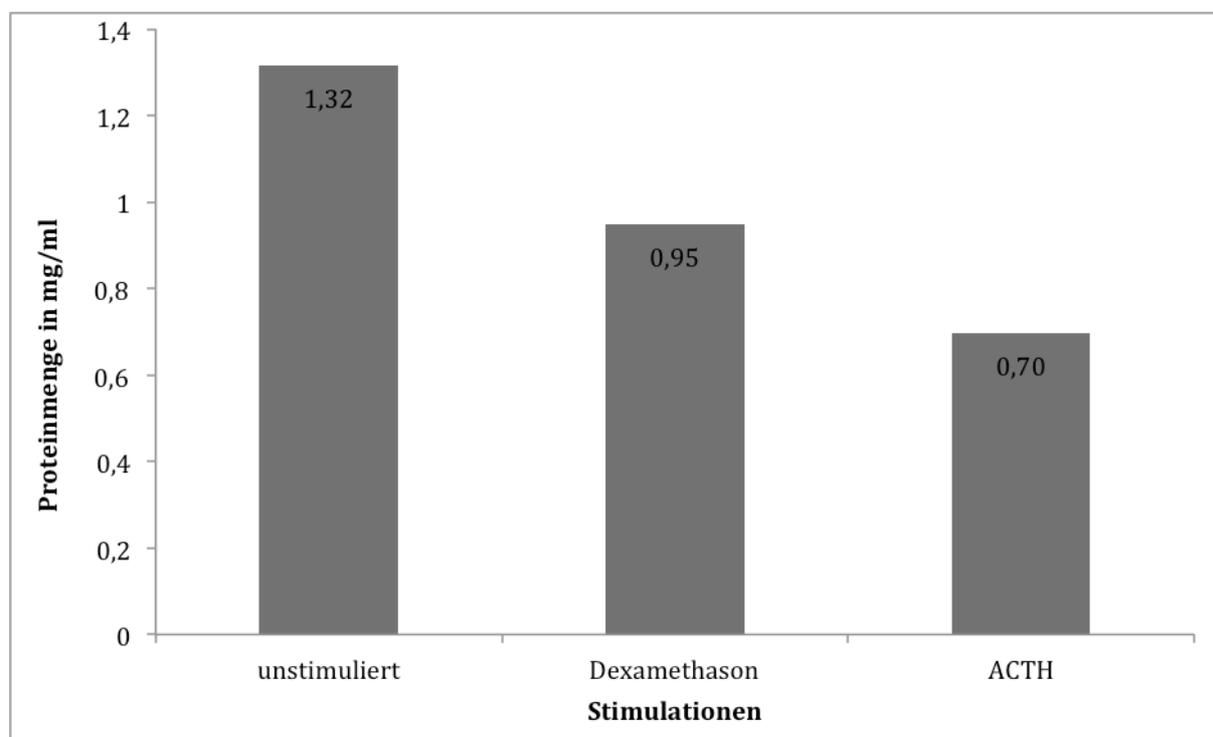


Abb. 5.16 : BCA Protein-Assay von OPN der Zellreihe NCI 295 nach Stimulation

Dexamethason (Adrenocorticotropin) in der Konz. 10^{-6} M und ACTH (9-Fluor-16 α -methylprednisolon) in der Konz. 10^{-9} M.

Verdünnungsreihe nach dem Standard des Herstellers. Ermittlung der Proteinmenge mittels einer linearen Eichkurve Die Extinktion wurde bei 562 nm gemessen. Angabe der Proteinmenge in mg/ml. Verdünnungsfaktor 1:5000. Ermittlung der Werte mittels Mittelwertbildung aus drei Messungen.

Der BCA Proteinassay zeigte eine unterschiedliche starke Expression von OPN nach Stimulation mit den angegebenen Hormonen. Dexamethason führte zu einer verminderten Expression von OPN. Bei der Hinzugabe von ACTH verminderte sich die Expression von OPN noch stärker. Dieses Ergebnis konnte im nachfolgend aufgeführten Luciferase Assay zur Bestimmung der Promotoraktivität wiedergespiegelt werden.

5.5 Luciferase Assay

In diesem Versuchsabschnitt konnte mittels eines Luciferase-Assays untersucht werden, welche Promotorabschnitte in welcher Art und Weise durch bestimmte Stimulantien aktiviert werden.

Es wurden 2 Promotorabschnitte verwendet, die in Kapitel 3.8 und Kapitel 4.6.1 beschrieben wurden. Beide sollten hier noch einmal kurz beschrieben werden:

Reporterplasmid mit Osteopontin-Promoterfragment l (=long): Insert: 880 Basenpaare

Reporterplasmid mit Osteopontin-Promoterfragment s (=short): Insert: 300 Basenpaare

Diese aufgeführten Reporterplasmid mit entsprechenden OPN-Promotorfragmenten wurden in einen pGL3-basic-Vector kloniert, an den die Luciferase angehängt ist.

Der entsprechende Leervektor diente somit als Leerwert.

Die Transfektion wurde wie oben beschrieben mittels Lipofectamin vorgenommen.

Die eingesetzten Stimulantien entsprachen denen aus dem BCA-Proteinassay mit den NCI Zellen (siehe vorheriges Kapitel). Es wurde erneut mit Dexamethason (Adrenocorticotropin), in diesem Fall aber veränderter Konz. 10^{-7} M und ACTH (9-Fluor-16 α -methylprednisolon) in der Konz. 10^{-9} M stimuliert. Nach einer definierten Stimulationszeit wurden die Luciferase-Aktivität im Luminometer ausgewertet.

Die Ergebnisse sind in Abb. 5.17 und Abb. 5.18 dargestellt.

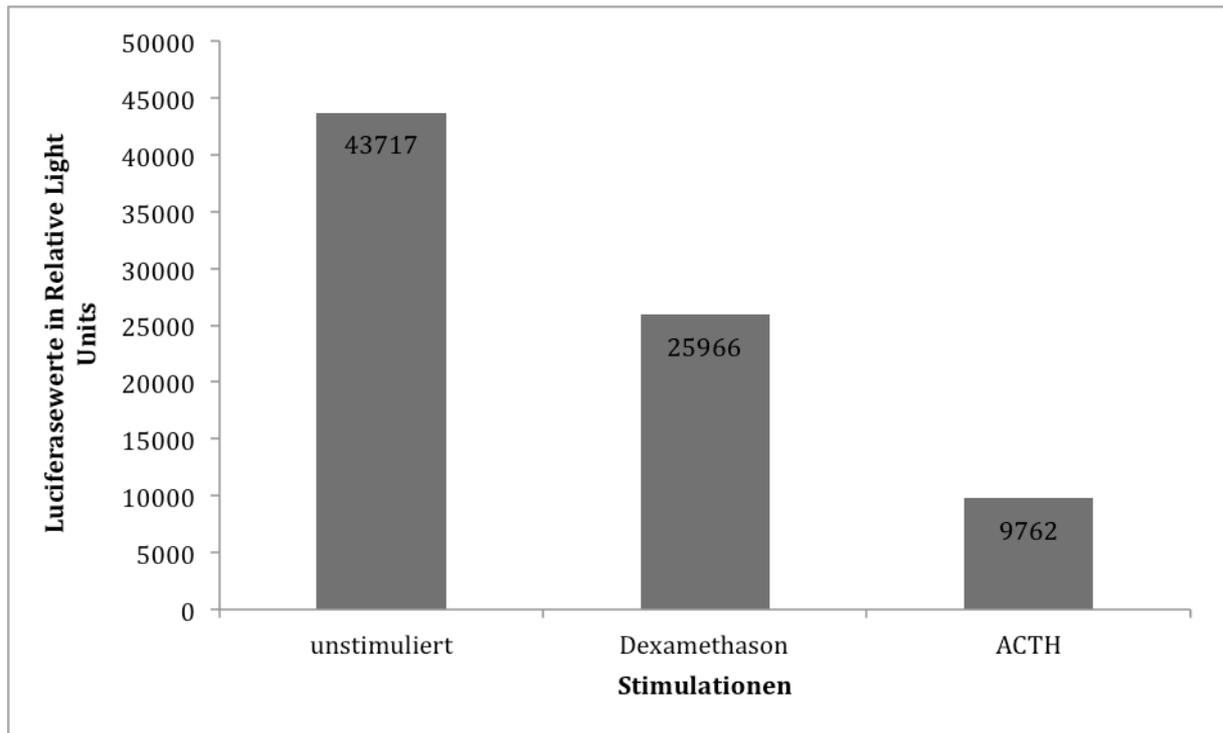


Abb. 5.17 : Ergebnisse der Luciferasemessung für das Reporterplasmid OPN-Promotorfragment s(short) mit 300 bp in der Karzinomzelllinie NCI 295 nach Stimulation mit Dexamethason 10^{-7} M und ACTH 10^{-9} M

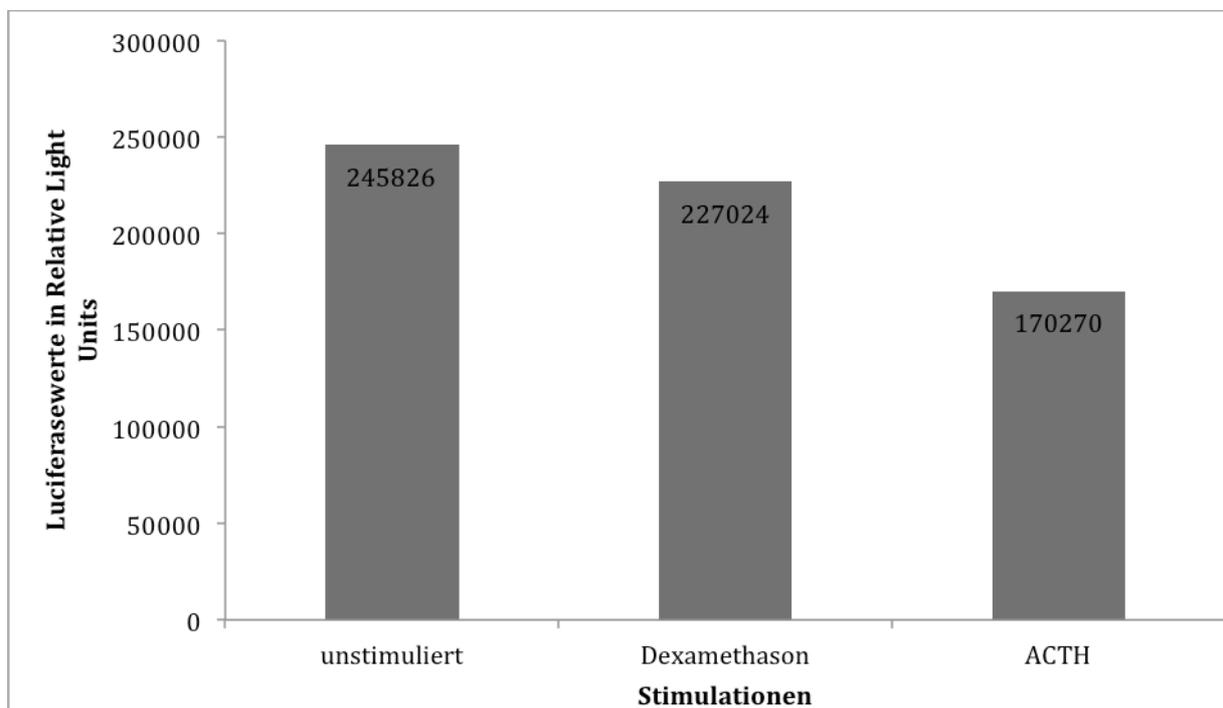


Abb. 5.18 : Ergebnisse der Luciferasemessung für das Reporterplasmid OPN-Promotorfragment l (long) mit 880 bp in der Karzinomzelllinie NCI 295 nach Stimulation mit Dexamethason 10^{-7} M und ACTH 10^{-9} M

Die Abbildungen 5.17. und 5.18 zeigten die Ergebnisse der Luciferaseassay nach Transfektion und Stimulation mittels angegebener Substanzen.

In beiden Abbildungen wurde in der ersten Bande jeweils die Luciferaseaktivität des entsprechend transferierten Promotorabschnittes aufgezeigt. Die Einheit hierbei ist „Relative Light Units“ und gibt Auskunft über die Aktivität des jeweils transferierten Promotorabschnittes. Abbildung 5.17 zeigt die Aktivität des Promotorabschnittes mit 300 bp. Im Vergleich zu Abbildung 5.18 fiel initial die deutlich niedrigere Aktivität des kürzeren (short) Promotorabschnittes auf. Die Aktivität des langen (long) Promotorabschnittes war mit 245825 Relative Light Units um ein vielfaches höher als die Grundaktivität des kürzeren Promotorabschnittes (43716 RLU). Dieses liess auf eine höhere Aktivität in Abhängigkeit von der Länge des Promotorabschnittes schließen.

Des weiteren fiel auf, dass durch die Stimulation mit Dexamethason und ACTH keine Mehrinduktion der Aktivität des jeweiligen Promotorabschnittes erzielt werden konnte. Dexamethason führte zu einer Aktivitätsreduzierung sowohl des 300 bp-langen Promotorabschnittes ($p < 0,6$) als auch des 880 bp-langen Promotorabschnittes ($p < 0,4$). Dieser Effekt verstärkte sich nochmals bei Hinzugabe von ACTH. Die Aktivität des kurzen Promotorabschnittes war deutlich reduziert, sowohl im Vergleich zu der Zugabe von Dexamethason als auch deutlich zu der Grundaktivität desselben. In der Abb. 5.15 in der dritten Bande ist die Aktivität nun mit 9761 RLU im Vergleich zu der Grundaktivität in der ersten Bande reduziert ($p < 0,1$). Dieses Ergebnis ließ sich auch den langen Promotorabschnitt mit 880 bp aus Abb. 5.18 übertragen mit gleicher Signifikanz ($p < 0,1$).

Im Vergleich der Auswertung des BCA-Proteinassays aus Abb. 5.16 zeigte sich ein ähnlicher Effekt. Dort wurde sowohl durch Dexamethason ($p < 0,1$) als auch durch ACTH ($p < 0,01$) eine Reduktion der exprimierten Proteinmenge aufgezeigt.

Zusammenfassend ist also festzuhalten, dass der Einfluss der Stimulantien auf die jeweiligen Reporterplasmide einen analogen Effekt hatte. Dieser Effekt war aber in Bezug auf die absoluten Zahlen unterschiedlich stark ausgeprägt.

Sowohl Dexamethason als auch ACTH scheinten also keinen stimulierenden Effekt auf die Induktion von OPN auszuüben.

6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit sollte die Regulation und Funktion des extrazellulären Glykoproteins Osteopontin in menschlichen Nebennierenrindenzellkarzinomzellen untersuchen und ein Vergleich mit dem invasiven Trophoblasten anstellen. Hierbei ging es vor allem darum Parallelen aufzuzeigen in Bezug auf die Vorstellung des Trophoblasten als „physiologisch“ invasives Modell und das Nebennierenzellkarzinom als malignes Modell.

Das Karzinom der Nebenniere ist bis dato wenig erforscht und unter diesem Aspekt besonders interessant. Besonderes Augenmerk sollte hierbei auf die Regulation und die Expression von Osteopontin in Bezug auf die Nebenniere gerichtet werden.

Die Gliederung der Diskussion richtet dabei nach dem Aufbau der Ergebnisse unter Hinzunahme aktueller Forschungsergebnisse.

6.1 Nebennierenrindenzellkarzinom

Das Karzinom der Nebennierenrinde ist "ein seltener und oft hochmaligner Tumor mit sehr schlechter Prognose" (Allolio et al., 2002). Klinisch kann sich dieser Tumor gänzlich unterschiedlich präsentieren und seine klinische Diagnose ist oft an sein hormonelles Produktionsmuster gebunden. Die Inzidenz desselben wird in der Literatur mit 1-2 Fällen auf 1 Mio. Einwohner angegeben (Allolio et al., 2002). Es werden typischerweise 2 unterschiedliche Gipfel in der Altersverteilung beschrieben. Zum einen im Kindesalter und zum anderen in der 5. Lebensdekade (Wajchenberg et al., 2000). Im Kindesalter ist die Prognose besser und „stellt die häufigste Ursache eines Cushingssyndroms“ in dieser Altersperiode dar .

„Beim Erwachsenen hingegen ist die Prognose schlechter und nur selten liegt dem dort auftretenden Cushing-Syndrom ein NNR- Karzinom zugrunde“ (Allolio et al., 2002). Die Pathogenese bleibt immer noch zu Großen Teilen ungeklärt. Das Li-Fraumeni-Syndrom (Mutation im p53-Tumorsuppressorgen) und Beckwith-Wiedemann-Syndrom (IGF-II-Überexpression) stehen im Verdacht begleitend mit NNR-Karzinomen aufzutreten (Reincke et al., 2000; Allolio et al., 2002)(siehe auch Kapitel 2.2). Spannend ist in diesem Zusammenhang, dass bei der Pathogenese des NNR-Karzinoms häufig ein „Allelverlust des ACTH-Rezeptors“ beobachtet wird (Allolio et al., 2002; Beuschlein et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zelllinie NCI 295, die dem NNR-Karzinom entsprechen, auf die

Expression von OPN nach unterschiedlicher Stimulation untersucht. Mittels eines BCA-Proteinassays wurde die nach Stimulation mit ACTH exprimierte Proteinmenge quantifiziert. Hierbei kam es zu einer signifikanten ($p < 0,05$) verminderten Expression von OPN nach Stimulation mit ACTH (siehe Kapitel 5.4.1 und Abb. 5.16). Dieses Ergebnis lässt im Rahmen der zuvor beschriebenen pathogenetischen Zusammenhänge ausreichend Spielraum für Diskussionen und weitergehende Untersuchungen. „Eine Entdifferenzierung wird durch den Allelverlust des ACTH-Rezeptors begünstigt“ (Allolio et al., 2002). Das unbehandelte AGS scheint ebenfalls das Auftreten eines NNR-Karzinoms zu begünstigen (Beuschlein et al., 2001). Oft liegt bei der Diagnosestellung des NNR-Karzinoms schon ein weit fortgeschrittener Befund vor, da nur etwa die Hälfte dieser Tumoren endokrin aktiv ist. Der Prozess der Steroidbiosynthese scheint hierbei aber gestört zu sein. Allolio, Fassnacht und Arlt beschrieben, dass in den meisten Fällen die autonome Glukokortikoidsekretion im Rahmen eines Cushing-Syndroms beim NNR-Karzinom eine Rolle spielt. Die Stadieneinteilung hierbei wird auf MacFarlane (MACFARLANE, 1958) und modifiziert auf von Sullivan et. Al. (Sullivan et al., 1978) zurückgeführt. Aufgrund der zuvor beschriebenen klinischen Verlaufsformen ist dementsprechend das Auftreten von Fernmetastasen keine Seltenheit. Betroffen sind hierbei oft Lunge, Leber und Knochen und hieraus folgend ist eine entsprechend ungünstige Prognose abzuleiten. In den ersten beiden Jahren sterben 50% der Patienten nach Diagnosestellung. Dieser Abschnitt stützt sich weitgehend auf die Veröffentlichung von Allolio, Fassnacht und Arlt im „Internisten 2002-Ausgabe 43, Seite 186-195, erschienen im Springer Verlag“. Histopathologisch lässt sich das NNR-Karzinom nach Saeger einordnen (Saeger, 2000). Die entsprechenden aufgeführten Kriterien, wie z.B. „diffuses Wachstumsverhalten, nukeläre Atypien und abnorme Nukleoli“ konnten in der Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen des NNR-Karzinoms in Kapitel 5.1.1.4 und in Tabelle 5.3 in Kapitel 5.2 aufzeigen. Die entsprechende sichere Diagnose kann also weitestgehend nur vom erfahrenen Pathologen aufgrund morphologischer Kriterien gestellt werden. Die Immunhistologie bietet in diesem Zusammenhang nur wenig Unterstützung. In den Untersuchungen dieser Arbeit konnte erstmals der Nachweis von Osteopontin in der Nebenniere gelingen (siehe Kapitel 5.1). Die unterschiedlich starke Expression von OPN im Normalgewebe, in Hyperplasien, Adenomen und Karzinomen konnte anhand von mehreren Gewebeschnitten erfasst werden. Hierbei bleibt festzuhalten, dass OPN in dem NNR-Karzinom das stärkste Expressionsmuster aufwies (siehe Tabelle 5.1. Tabelle 5.3 in Kapitel 5.2). Die Differenzierung zum Normalgewebe bzw. zur Hyperplasie der NN vom Karzinom gelingt mittels immunhistochemischen Nachweises von OPN scheinbar relativ

gut. Es ist aber durchaus auch kritisch anzumerken, dass zum einen die Differenzierung zum Adenom rein immunhistochemisch mittels OPN alleine nicht möglich ist. Zum anderen ist es sinnvoll die zu untersuchende Stichprobenzahl zu erhöhen, um das Ergebnis repräsentativ auszuwerten. In dieser Arbeit wurden 16 Hyperplasien, 13 Adenome und 17 Karzinome untersucht.

Aufgrund eines bis dato kleinen Therapieregimes (chirurgische R₀-Resektion als Primärtherapie in Stadien I-III), den wenigen Therapiealternativen neben der Strahlentherapie und der medikamentösen Präparate und der hohen Rezidivgefahr (Allolio et al., 2002), sollte die Erforschung des Nebennierenkarzinoms ein elementarer Bestandteil der nächsten Jahre bleiben. Osteopontin scheint hierbei aufgrund der vorliegenden Ergebnisse möglicherweise eine entscheidende Rolle zu spielen.

6.2 OPN Expression im utero-plazentarem System

Es konnte bereits immunhistochemisch der Nachweis bei Vorarbeiten erbracht werden, dass OPN in der menschlichen Plazenta eine unterschiedlich starke Expression zeigt. OPN zeigt eine starke Expression im invasiven extravillösen Trophoblasten im Bereich der fetomaternalen Grenzfläche sowie im Zytotrophoblasten. Im Synzytiotrophoblasten hingegen stellte sich eine nur sehr gering ausgeprägte Expression dar (Briese et al., 2005a). Im Western Blot konnten diese Ergebnisse mittels Frischgewebe von allen 3 Trimeni der humanen Plazenta ebenfalls aufgezeigt werden. Durch eine Kooperation mit der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe der Universität von Heraklion konnte OPN im extravillösen invasiven Trophoblastzellen nachgewiesen werden. Im Anschluss wurde das invasive Potential der primären Trophoblasten mittels eines primären Invasionsassays quantifiziert (Briese et al., 2005a).

Ferner konnte aufgezeigt werden, dass OPN sowohl immunhistochemisch als auch im Western Blot in schwangerschaftsbedingten Tumoren (GTD), genauer hydatide Mole, Plazentabett-Trophoblasttumor (PSTT), Plazentabett-Knötchen (PSN) und Chorionkarzinom, exprimiert wird (Briese et al., 2006). Eine andere Vorarbeit wies OPN immunhistochemisch auch im normalen Endometrium, in Endometriumhyperplasien und auch in verschiedenen Endometriumkarzinomen nach.

Die Pathologie der Plazenta ist des weiteren auch im Einführungskapitel 2.3 beschrieben.

6.3 Osteopontin Expression und Regulation

Auch in dieser Arbeit konnte die Rolle des Osteopontin im Zusammenhang mit der Entstehung, dem Nachweis und der Regulation des Nebennierenkarzinoms beleuchtet werden. Als Vorlage dienten hierbei Karzinomzellen der Zellreihe NCI 295.

Osteopontin wird in Bezug auf die Invasivität, Prognose und Einteilung von verschiedensten Tumoren aufgeführt. Im Einführungsteil dieser Arbeit sind einige bereits genannt worden. An dieser Stelle sollen reflektierend ein paar weitere Hinweise aufgeführt werden.

So beschrieben Anborgh et al. erst kürzlich die prä- und postrtranslationale Veränderung von OPN in Tumoren (Anborgh et al., 2011). Daneben beschrieben auch vor kurzem Lu et al. die Rolle einer Überexpression von OPN im Zusammenhang mit dem Larynx- und Hypopharynxkarzinom (Lu et al., 2011). So konnte eine Down-Regulation von OPN bei nasopharyngealen Tumoren das Wachstum und die Invasivität derselben beeinflussen (Yang et al., 2011). Hier scheint vor allem auch durch OPN eine mögliche Aussage zu Metastasen und zur Prognose möglich (Li et al., 2011).

Auch das zuvor erwähnte Mammakarzinom stellt ein breit erforschtes Gebiet in Bezug auf Osteopontin und dessen Rolle als z.B. diagnostischer Marker dar. Mutrie et al. wiesen OPN die Bedeutung eines möglichen Benefits bei der Therapie mit Hsp 90 oder Src- Kinase-Inhibitoren zu (Mutrie et al., 2011). Eine pharmakokinetische Ansatzstelle konnte in der Therapie des Mammakarzinoms in Bezug auf OPN gefunden werden (Talbot et al., 2011). Und auch das Entstehen von Metastasen scheint mitunter beim Mammakarzinom durch Osteopontin vermittelt zu sein (Mi et al., 2011).

Das ebenfalls aggressive hepatozelluläre Karzinom weist in der aktuellen Forschung einen Zusammenhang zu OPN auf. Die Invasion dieses Tumortyps wird mitunter, durch OPN vermittelt, durch eine verstärkte Expression durch die MMP 2 und uPA getriggert (Chen et al., 2011)(siehe hierzu auch Kapitel 2.3). Zhang et al. wies in diesem Zusammenhang vor kurzem auf die prognostische Bedeutung von OPN in Bezug auf das hepatozelluläre Karzinom hin (Zhang et al., 2011). Eine gezielte OPN-Therapie hat möglicherweise einen Einfluss den Verlauf eines solchen Karzinoms (Liu et al., 2011). Und auch Lin et al. konnten aufzeigen, dass OPN in diesem Zusammenhang eine Aussage zulässt in Bezug auf die Metastasenhäufigkeit und mögliche Therapieoptionen (Lin et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte ein eindeutiger Zusammenhang von OPN und dem Nebennierenkarzinom dargestellt werden. Die unterschiedlich starke Expression in der Immunhistochemie wurde bereits dargestellt. Dieser Zusammenhang ließ sich auch auf der Proteinebene reproduzieren. In Western-Blot-Analysen ließ sich die verstärkte Expression von OPN im Karzinom der NN nachvollziehen. In Kapitel 5.3 ist ausführlich dargestellt welche quantitativen Aussagen hier gemacht werden können (siehe auch Abb. 5.9- 5.11). Die starke Expression von OPN in Bezug auf das Karzinom läßt also möglicherweise auch hier Rückschlüsse auf einen Zusammenhang möglicher Therapieoptionen oder Aussagen in Bezug auf den klinischen Verlauf des entsprechenden Krankheitsbildes zu. Auch hier sei erwähnt, dass die Stichprobenzahl bedeutend erhöht werden muss und die Versuchsschemata erweitert werden müssten, um mögliche Ansatzpunkte oder verbindliche Verlaufsaussagen treffen zu können.

6.3 Colokalisation von OPN und Integrin beta3 mit weiteren Adhäsionsmolekülen

In Vorarbeiten konnte mittels eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskopes (CLSM) und fluoreszierender Antikörper an Gewebeteilen von Plazenta und Endometrium eine membranöse Colokalisation und Coexpression von OPN mit dem Adhäsionsmolekül CEACAM1 und eine Colokalisation von Integrin beta3 mit CAECAM1 an der fetomaternalen Grenzfläche der Plazenta und in den uterinen Drüsen aufgezeigt werden (Briese et al., 2005a) (Briese et al., 2005b) (Brummer et al., 2001). CAECAM1 (Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule1) ist ein Mitglied der Familie des Carcinoembryonalen Antigens (CEA) und der Immunglobulin-Superfamilie und wird in diversen Isoformen in verschiedenen Zellen (z.B. Endothelzellen, Blutzellen, Endometrium) exprimiert (Prall et al., 1996) (Heilmann, 2010).

Der Zusammenhang von Osteopontin und dessen Rezeptorprotein wurde teilweise im Einführungsteil dieser Arbeit beschrieben. So sollte auch der Zusammenhang von Integrin beta 3 und OPN beim Nebennierenrindenzkarzinom Teil dieser Arbeit sein.

Matsuura et al. konnten bereits einen Zusammenhang dieser beiden Moleküle in Bezug auf das ovarielle klarzellige Karzinom herausstellen. Hier scheint die Regulation von OPN einen bedeutenden Einfluss auf die Therapie dieses Karzinoms innezuhaben (Matsuura et al., 2010).

Fong et al. wiesen auf einen Zusammenhang von OPN und Integrin beta 3 beim Lungenkarzinom und vermuten eine auf diesem Wege vermittelte Migration von Karzinomzellen der Lunge (Fong et al., 2009). Auch beim Mammakarzinom wurden diverse Zusammenhänge von OPN und Integrin beta 3 bei der Signalvermittlung von Karzinomzellen gesehen. Als ein Beispiel sei hier die Arbeit von Das et al. aufgeführt (Das et al., 2004).

Der Zusammenhang von Integrin beta 3 und OPN beim Nebennierenkarzinom wurde durch immunhistochemische Nachweise erbracht. In Kapitel 5.1.2 und 5.1.3 wurden die Ergebnisse dargestellt. Es fiel eine vergleichbare Expression von Integrin beta 3 und OPN in Bezug auf die unterschiedlichen Gewebetypen auf. Auch auf Proteinebene ließ sich dieser Zusammenhang reproduzieren. In Kapitel 5.3.2 und Abb. 5.13 wurden dargestellt das Expressionsmuster, aus den Untersuchungen von OPN im Western Blot, sich auf das Rezeptormolekül übertragen lassen. Es lässt sich also auch hier möglicherweise eine Ansatzstelle für eine Therapie des Nebennierenkarzinoms ableiten. Der quantitative Zusammenhang der Expressionsstärke von OPN und Integrin beta 3 birgt vielleicht Potential für weitere Arbeiten.

6.4 Regulation von OPN und Invasivität

Auch die Regulation von OPN und der Einfluss auf ein mögliches invasives Verhalten vor allem im Nebennierenkarzinom sollte in dieser Arbeit beleuchtet werden. Voruntersuchungen konnten wie bereits beschrieben auf dem Gebiet des utero-plazentaren Systems, welches als Vergleichsmodell zu Untersuchungen bei der Nebenniere fungieren sollte, konnten diese Zusammenhänge aufdecken. Vor allem CEACAM 1 konnte hier als Mediator bei Invasionsprozessen beim invasiven Trophoblasten und Melanomen identifiziert werden (Briese et al., 2005a) (Ebrahimnejad et al., 2004). In diesem Zusammenhang sei auch auf die Arbeiten von Thorsten Heilmann hingewiesen (Heilmann, 2010). Wai et al. wiesen auf einen

Zusammenhang hin, bei dem OPN offensichtlich durch eine Unterdrückung der NO-Produktion durch Makrophagen die Proliferation der kolorektalen Karzinomzellen fördert (Wai et al., 2006). Eine Co-Stimulation von OPN und EGF beim Prostatakarzinom führte nach Angelucci et al. zur verstärkten Proliferation entsprechender Zellen (Angelucci et al., 2004).

EGF scheint in Nebennierenkarzinomen die Kortisolproduktion anzuregen und in Kombination mit OPN die Proliferation signifikant zu steigern (Feltus et al., 2003). Dieser Effekt schien auch auf die Beobachtungen von Angelucci et al. zuzutreffen (Angelucci et al., 2004). Diese Beobachtungen sind insofern interessant, da Steroidhormone in vielen Fällen die OPN-Expression zu beeinflussen scheinen (Angelucci et al., 2004) (Kasugai et al., 1991; Prince and Butler, 1987). Die kooperierende Arbeitsgruppe um Weismann, Allolio und Gruneberger aus Würzburg führte mit unserer Arbeitsgruppe gemeinsam Untersuchungen im Bereich OPN und Invasivität und Überleben in Bezug auf das NNR-Karzinom und konnte bereits zuvor beschriebene Zusammenhänge widerspiegeln, abschließend aber keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Überlebenshäufigkeit und dem quantitativen Auftreten von OPN feststellen (Weismann et al., 2009).

In den eigenen Untersuchungen konnte keine stimulierende Wirkung auf die Expression von OPN durch die Hinzugabe von Steroidhormonen dargestellt werden. Sowohl ACTH als auch Dexamethason führten, teilweise signifikant (im BCA Assay $p < 0,05$), zu einer verminderten Expression. In Untersuchungen mittels eines BCA-Assays, in Kapitel 5.4.1 dargestellt, wurde in Bezug auf die Zellreihe NCI 295 eine verminderte Expression von OPN aufgezeigt. Insbesondere Dexamethason zeigte einen starken supprimierenden Effekt.

Diese Ergebnisse ließen sich gut mittels eines Matrigel-Invasionsassays und einer Messung der Luciferase-Aktivität nach Transfektion entsprechender Vektoren untermauern. Kapitel 5.4 und Abb. 5.15 zeigen entsprechende Ergebnisse auf. Nach Transfektion von Integrin beta 3 und Stimulation mittels OPN war die Invasivität nachweisbar gestiegen. Dieser Effekt schien aber noch stärker, wenn nach erfolgter Transfektion die Stimulation mittels OPN ausblieb. Dieses Ergebnis schien auf den ersten Blick widersprüchlich, lässt sich aber vielleicht durch die zu geringe Anzahl repräsentativer zu wiederholender Untersuchungen erklären.

In den Luciferase Assays konnte nach Transfektion entsprechender Promotorregionen für OPN mittels Stimulation durch Dexamthason und ACTH ähnliche Ergebnisse wie zuvor bei den BCA-Assays beschrieben, dargestellt werden. Die Luciferase-Aktivität, als Parameter für die entsprechende „Aktivität“ des Osteopontin wurde durch Hinzugabe von Dexamethason und ACTH supprimiert (siehe Kapitel 5.5 und Abb- 5.17 und Abb. 5.18.). Hierbei sei auch

auf die unterschiedliche Länge der Promotorkonstrukte und entsprechend unterschiedlich starke Luciferaseaktivität hingewiesen. Das OPN-Promotorkonstrukt mit 300 bp erreichte unstimuliert in den Luciferase-Assayversuchen eine Aktivität von etwa 43000 RLU (siehe Abb. 5.17), wohingegen das längere Konstrukt mit 880 bp eine um etwa 5-fach verstärkte „unstimulierte“ Grundaktivität aufwies (siehe Abb. 5.18). Der Effekt sowohl von ACTH als auch von Dexamethason war in beiden Fällen ein supprimierender, wodurch sich durch weitergehende Versuchsreihen in Zukunft vielleicht ein möglicher therapeutischer Nutzen ableiten lässt. Sicherlich spielt hier auch die Zahl der repräsentativ zu quantifizierenden Versuchszahlen eine entscheidende Rolle.

7 Zusammenfassung

Das Nebennierenrindenzarzinom stellt eine sehr seltene und in vielen Fällen hochmaligne Tumorentität dar. Die Prognose dieses Karzinoms ist sehr häufig als sehr schlecht einzustufen. Dieses liegt mitunter daran, dass sich die Klinik oft gänzlich endokrin inaktiv verhält und insofern die klinische Diagnose zu einem Zeitpunkt gestellt wird, der sich als zufällig im Rahmen einer Bildgebung offenbart.

Diese Arbeit sollte im Rahmen der beschriebenen Charaktereigenschaften des NNR-Karzinoms die Rolle des Proteins Osteopontin in diesem Zusammenhang beleuchten.

In Bezug auf andere maligne Tumoren liegen bereits zahlreiche Erfahrungen zur Osteopontin-Expression und -Funktion vor. OPN scheint eine wesentliche Rolle bei der Tumorgenese, bei der Invasion von Karzinomen und bei Metastasierungsprozessen von verschiedensten Tumoren zu spielen. Ferner wurde dem Adhäsionsmolekül Integrin beta 3 entsprechende Aufmerksamkeit gewidmet, da es einer der Hauptrezeptoren in diesem Zusammenhang zu sein scheint. Hier läßt sich auch die Brücke zu dem invasiven Trophoblasten schlagen, der als ein „physiologisches Tumormodell“ als Vergleich zum NNR-Karzinom verstanden werden will. OPN ist im invasiven Teil des Trophoblasten spezifisch exprimiert und scheint eine entscheidende Rolle in Bezug auf die Invasivität desselben inne zu haben.

In dieser Promotionsarbeit konnte erstmals der Nachweis von OPN in der Nebenniere erbracht werden. Die Expression ist nach immunhistochemischen Untersuchungen strikt auf den Kortex begrenzt. In vergleichenden Untersuchungen der unterschiedlichen NN-Gewebe konnte die stärkste Expression bei den Karzinomen nachgewiesen werden. Gleiches konnte in diesem Zusammenhang auch für Integrin beta 3 aufgezeigt werden. Das Normalgewebe, die Hyperplasie und das Adenom lassen sich auf diesem Wege vom Karzinom der NN unterscheiden. Auf der Proteinebene konnte im Western Blot Untersuchungen die gleichen quantitativen Ergebnisse in Bezug auf OPN im Karzinom der NN offenbart werden.

Die Zelllinie NCI 295 diente hierbei als Vorlage und im Rahmen von vergleichenden Untersuchungen mittels Matrigelinvasionsassays konnte eine verstärkte Durchwanderung der invasiven Zellen nach Transfektion des Integrin beta 3 Plasmidvektors und vorheriger Stimulation der Zellen mittels OPN dargestellt werden.

In dem letzten Teil dieser Arbeit wurde versucht die Aktivität nach Transfektion unterschiedlich langer OPN-Promotorfragmente mittels Luciferase Assays und Stimulation

durch Dexamethason (Adrenocorticotropin) und ACTH (9-Fluor-16 α -methylprednisolon) zu beeinflussen. Nach einer definierten Stimulationszeit wurde die Luciferase-Aktivität im Luminometer ausgewertet. Beiden Substanzen konnte hierbei eine hemmende Funktion in Bezug auf die Aktivität nachgewiesen werden. Interessanterweise fiel auf, dass das längere OPN-Promotorfragment im Vergleich zum kürzeren Fragment eine höhere Aktivität aufwies. Schlussfolgernd lässt sich in Bezug auf das Nebennierenrindenzarzinom OPN auch hier eine bedeutende Rolle nachweisen, so dass weitere klinische Studien in Bezug auf Regulation und Interaktion von Osteopontin sinnvoll erscheinen.

8 Literaturverzeichnis

1. Albrecht, E.D. et al. (2006) Suppression of extravillous trophoblast invasion of uterine spiral arteries by estrogen during early baboon pregnancy. *Placenta*, **27**, 483-490.
2. Allolio, B., Fassnacht, M. & Arlt, W. (2002) [Malignant tumors of the adrenal cortex]. *Internist (Berl)*, **43**, 186-195.
3. Allolio, B. et al. (2004) Management of adrenocortical carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **60**, 273-287.
4. Anborgh, P.H. et al. (2011) Pre- and post-translational regulation of osteopontin in cancer. *J Cell Commun Signal*, **5**, 111-122.
5. Angelucci, A. et al. (2004) Osteopontin enhances the cell proliferation induced by the epidermal growth factor in human prostate cancer cells. *Prostate*, **59**, 157-166.
6. Ashkar, S. et al. (2000) Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science*, **287**, 860-864.
7. Bautista, D.S. et al. (1995) A monoclonal antibody against osteopontin inhibits RGD-mediated cell adhesion to osteopontin. *Ann N Y Acad Sci*, **760**, 309-311.
8. Beuschlein, F. et al. (2001) ACTH-receptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation. *Eur J Endocrinol*, **144**, 199-206.
9. Bland, M.L., Desclozeaux, M. & Ingraham, H.A. (2003) Tissue growth and remodeling of the embryonic and adult adrenal gland. *Ann N Y Acad Sci*, **995**, 59-72.
10. Braitch, M. & Constantinescu, C.S. (2010) The role of osteopontin in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and multiple sclerosis (MS). *Inflamm Allergy Drug Targets*, **9**, 249-256.
11. Briese, J. et al. (2005a) Osteopontin is colocalized with the adhesion molecule CEACAM1 in the extravillous trophoblast of the human placenta and enhances invasion of CEACAM1-expressing placental cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **90**, 5407-5413.
12. Briese, J. et al. (2005b) Osteopontin expression in gestational trophoblastic diseases: correlation with expression of the adhesion molecule, CEACAM1. *Int J Gynecol Pathol*, **24**, 271-276.
13. Briese, J. et al. (2006) Expression pattern of osteopontin in endometrial carcinoma: correlation with expression of the adhesion molecule CEACAM1. *Int J Gynecol Pathol*, **25**, 161-169.
14. Brown, L.F. et al. (1992) Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell*, **3**, 1169-1180.

15. Brummer, J. et al. (2001) cis Interaction of the cell adhesion molecule CEACAM1 with integrin beta(3). *Am J Pathol*, **159**, 537-546.
16. Brzezicki, G. et al. (2010) Postlaminectomy Osteopontin Expression and Associated Neurophysiological Findings in Rat Peridural Scar Model. *Spine (Phila Pa 1976)*,
17. Chaddha, V. et al. (2004) Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. *Semin Fetal Neonatal Med*, **9**, 357-369.
18. Chambers, A.F. & Tuck, A.B. (1993) Ras-responsive genes and tumor metastasis. *Crit Rev Oncog*, **4**, 95-114.
19. Chen, R.X. et al. (2011) Osteopontin promotes hepatocellular carcinoma invasion by up-regulating MMP-2 and uPA expression. *Mol Biol Rep*, **38**, 3671-3677.
20. Coppola, D. et al. (2004) Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies. *Clin Cancer Res*, **10**, 184-190.
21. Cross, J.C., Werb, Z. & Fisher, S.J. (1994) Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science*, **266**, 1508-1518.
22. Das, R., Mahabeleshwar, G.H. & Kundu, G.C. (2004) Osteopontin induces AP-1-mediated secretion of urokinase-type plasminogen activator through c-Src-dependent epidermal growth factor receptor transactivation in breast cancer cells. *J Biol Chem*, **279**, 11051-11064.
23. Denda, S., Reichardt, L.F. & Muller, U. (1998) Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin alpha8 beta1 and potential roles for this integrin-ligand interaction in kidney morphogenesis. *Mol Biol Cell*, **9**, 1425-1435.
24. Denhardt, D.T. et al. (2003) Transcriptional regulation of osteopontin and the metastatic phenotype: evidence for a Ras-activated enhancer in the human OPN promoter. *Clin Exp Metastasis*, **20**, 77-84.
25. Denhardt, D.T. et al. (2001) Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest*, **107**, 1055-1061.
26. Dey, S.K. (2005) Reproductive biology: fatty link to fertility. *Nature*, **435**, 34-35.
27. Ebrahimnejad, A. et al. (2004) CEACAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells. *Am J Pathol*, **165**, 1781-1787.
28. Fazleabas, A.T., Kim, J.J. & Strakova, Z. (2004) Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment--a review. *Placenta*, **25 Suppl A**, S26-31.
29. Feltus, F.A. et al. (2003) Epidermal growth factor increases cortisol production and type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta(5)-Delta(4)-isomerase expression in human adrenocortical carcinoma cells: evidence for a Stat5-dependent mechanism. *Endocrinology*, **144**, 1847-1853.

30. Floridon, C. et al. (1999) Localization and significance of urokinase plasminogen activator and its receptor in placental tissue from intrauterine, ectopic and molar pregnancies. *Placenta*, **20**, 711-721.
31. Fong, Y.C. et al. (2009) Osteopontin increases lung cancer cells migration via activation of the alphavbeta3 integrin/FAK/Akt and NF-kappaB-dependent pathway. *Lung Cancer*, **64**, 263-270.
32. Frank HG, K.P. (2000) Nonvillous parts and trophoblast invasion. *Pathology of the Human placenta*, 171-272.
33. Giachelli, C. et al. (1991) Molecular cloning and characterization of 2B7, a rat mRNA which distinguishes smooth muscle cell phenotypes in vitro and is identical to osteopontin (secreted phosphoprotein I, 2aR). *Biochem Biophys Res Commun*, **177**, 867-873.
34. Giancotti, F.G. & Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling. *Science*, **285**, 1028-1032.
35. Giordano, T.J. et al. (2001) Organ-specific molecular classification of primary lung, colon, and ovarian adenocarcinomas using gene expression profiles. *Am J Pathol*, **159**, 1231-1238.
36. Goldman, S. & Shalev, E. (2006) Difference in progesterone-receptor isoforms ratio between early and late first-trimester human trophoblast is associated with differential cell invasion and matrix metalloproteinase 2 expression. *Biol Reprod*, **74**, 13-22.
37. Gupta, D. et al. (2000) Prognostic value of immunohistochemical expression of topoisomerase alpha II, MIB-1, p53, E-cadherin, retinoblastoma gene protein product, and HER-2/neu in adrenal and extra-adrenal pheochromocytomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, **8**, 267-274.
38. Hartner, A. et al. (2001) Glomerular osteopontin expression and macrophage infiltration in glomerulosclerosis of DOCA-salt rats. *Am J Kidney Dis*, **38**, 153-164.
39. Heilmann, T. (2010) *Vergleichende Untersuchungen zur Regulation und Funktion des Adhäsionsmoleküls CEACAM1 in dem extravillösen Trophoblasten der Plazenta und in leukämischen T-Lymphozyten*. Hamburg Eppendorf.
40. Hong, J. & Hutton, G.J. (2010) Regulatory effects of interferon-beta on osteopontin and interleukin-17 expression in multiple sclerosis. *J Interferon Cytokine Res*, **30**, 751-757.
41. Iino, K. et al. (1997) DNA topoisomerase II alpha and Ki-67 in human adrenocortical neoplasms: a possible marker of differentiation between adenomas and carcinomas. *Mod Pathol*, **10**, 901-907.
42. Iizuka, J. et al. (1998) Introduction of an osteopontin gene confers the increase in B1 cell population and the production of anti-DNA autoantibodies. *Lab Invest*, **78**, 1523-1533.
43. Witt, K.J.B., J. Lepenies; K. (2004) *Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie*.

44. Kasugai, S. et al. (1991) Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro: inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic phenotype. *J Cell Physiol*, **147**, 111-120.
45. Katagiri, Y.U. et al. (1999) CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res*, **59**, 219-226.
46. Kaufmann, P., Black, S. & Huppertz, B. (2003) Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod*, **69**, 1-7.
47. Koszewski, N.J., Reinhardt, T.A. & Horst, R.L. (1996) Vitamin D receptor interactions with the murine osteopontin response element. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **59**, 377-388.
48. Li, Y. et al. (2011) Elevated content of osteopontin in plasma and tumor tissues of patients with laryngeal and hypopharyngeal carcinoma associated with metastasis and prognosis. *Med Oncol*,
49. Liaw, L. et al. (1998) Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J Clin Invest*, **101**, 1468-1478.
50. Lin, F. et al. (2010) Overexpression of osteopontin in hepatocellular carcinoma and its relationships with metastasis, invasion of tumor cells. *Mol Biol Rep*,
51. Liu, W. et al. (2011) Osteopontin as a key mediator for vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma. *Tohoku J Exp Med*, **224**, 29-39.
52. Lu, J.G. et al. (2011) Overexpression of osteopontin and integrin alpha v in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas associated with differentiation and metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol*,
53. MACFARLANE, D.A. (1958) Cancer of the adrenal cortex; the natural history, prognosis and treatment in a study of fifty-five cases. *Ann R Coll Surg Engl*, **23**, 155-186.
54. Matsuura, M., Suzuki, T. & Saito, T. (2010) Osteopontin is a new target molecule for ovarian clear cell carcinoma therapy. *Cancer Sci*, **101**, 1828-1833.
55. Mi, Z. et al. (2011) Osteopontin promotes CCL5-mesenchymal stromal cell-mediated breast cancer metastasis. *Carcinogenesis*, **32**, 477-487.
56. Mirza, M. et al. (2008) Osteopontin-c is a selective marker of breast cancer. *Int J Cancer*, **122**, 889-897.
57. Miyauchi, A. et al. (1991) Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. *J Biol Chem*, **266**, 20369-20374.

58. Murugaiyan, G., Mittal, A. & Weiner, H.L. (2010) Identification of an IL-27/osteopontin axis in dendritic cells and its modulation by IFN-gamma limits IL-17-mediated autoimmune inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 11495-11500.
59. Mutrie, J.C., Chambers, A.F. & Tuck, A.B. (2011) Osteopontin increases breast cancer cell sensitivity to specific signaling pathway inhibitors in preclinical models. *Cancer Biol Ther*, **12**,
60. O'Regan, A.W. et al. (1999) Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol*, **162**, 1024-1031.
61. Okada, H. et al. (2000) Osteopontin expressed by renal tubular epithelium mediates interstitial monocyte infiltration in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, **278**, F110-21.
62. Prall, F. et al. (1996) CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, **44**, 35-41.
63. Prince, C.W. & Butler, W.T. (1987) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the biosynthesis of osteopontin, a bone-derived cell attachment protein, in clonal osteoblast-like osteosarcoma cells. *Coll Relat Res*, **7**, 305-313.
64. Prince, C.W. et al. (1987) Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J Biol Chem*, **262**, 2900-2907.
65. Reincke, M. et al. (2000) Molecular adrenocortical tumourigenesis. *Eur J Clin Invest*, **30 Suppl 3**, 63-68.
66. Reincke, M. et al. (1996) p53 mutations in adrenal tumors: Caucasian patients do not show the exon 4 "hot spot" found in Taiwan. *J Clin Endocrinol Metab*, **81**, 3636-3638.
67. Saeger, W. (2000) Histopathological classification of adrenal tumours. *Eur J Clin Invest*, **30 Suppl 3**, 58-62.
68. Scatena, M. et al. (1998) NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol*, **141**, 1083-1093.
69. Senger, D.R. et al. (1989) Purification of a human milk protein closely similar to tumor-secreted phosphoproteins and osteopontin. *Biochim Biophys Acta*, **996**, 43-48.
70. Shimonovitz, S. et al. (1998) Expression of gelatinase B by trophoblast cells: down-regulation by progesterone. *Am J Obstet Gynecol*, **178**, 457-461.
71. Song, J.Y. et al. (2009) Osteopontin expression correlates with invasiveness in cervical cancer. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, **49**, 434-438.
72. Sorensen, E.S., Hojrup, P. & Petersen, T.E. (1995) Posttranslational modifications of bovine osteopontin: identification of twenty-eight phosphorylation and three O-glycosylation sites. *Protein Sci*, **4**, 2040-2049.

73. Sternlicht, M.D. & Werb, Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **17**, 463-516.
74. Sullivan, M., Boileau, M. & Hodges, C.V. (1978) Adrenal cortical carcinoma. *J Urol*, **120**, 660-665.
75. Takahashi, F. et al. (2001) Role of osteopontin in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **24**, 264-271.
76. Talbot, L.J. et al. (2011) Pharmacokinetic characterization of an RNA aptamer against osteopontin and demonstration of in vivo efficacy in reversing growth of human breast cancer cells. *Surgery*, **150**, 224-230.
77. Terzolo, M. et al. (2001) Immunohistochemical assessment of Ki-67 in the differential diagnosis of adrenocortical tumors. *Urology*, **57**, 176-182.
78. Toy, H. et al. (2009) Correlation between osteopontin protein expression and histological grade of astrocytomas. *Pathol Oncol Res*, **15**, 203-207.
79. Tuck, A.B. et al. (1998) Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients. *Int J Cancer*, **79**, 502-508.
80. Urquidi, V. et al. (2002) Contrasting expression of thrombospondin-1 and osteopontin correlates with absence or presence of metastatic phenotype in an isogenic model of spontaneous human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res*, **8**, 61-74.
81. Vassalli, J.D., Sappino, A.P. & Belin, D. (1991) The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest*, **88**, 1067-1072.
82. Wai, P.Y. et al. (2006) Osteopontin inhibits macrophage nitric oxide synthesis to enhance tumor proliferation. *Surgery*, **140**, 132-140.
83. Wajchenberg, B.L. et al. (2000) Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer*, **88**, 711-736.
84. Wang, D. et al. (2000) Transcriptional regulation of the human osteopontin promoter: functional analysis and DNA-protein interactions. *Oncogene*, **19**, 5801-5809.
85. Weber, G.F., Lett, G.S. & Haubein, N.C. (2010) Osteopontin is a marker for cancer aggressiveness and patient survival. *Br J Cancer*, **103**, 861-869.
86. Weintraub, A.S. et al. (2000) Osteopontin deficiency in rat vascular smooth muscle cells is associated with an inability to adhere to collagen and increased apoptosis. *Lab Invest*, **80**, 1603-1615.
87. Weismann, D. et al. (2009) Osteopontin stimulates invasion of NCI-h295 cells but is not associated with survival in adrenocortical carcinoma. *J Pathol*, **218**, 232-240.
88. Yan, W. et al. (2010) Expression pattern of osteopontin splice variants and its functions on cell apoptosis and invasion in glioma cells. *Neuro Oncol*, **12**, 765-775.

89. Yang, G. et al. (2011) Osteopontin regulates growth and migration of human nasopharyngeal cancer cells. *Mol Med Report*,
90. Young, L.S. et al. (2003) Differential production of adrenal steroids by purified cells of the human adrenal cortex is relative rather than absolute. *Eur J Endocrinol*, **148**, 139-145.
91. Yu, X.Q. et al. (1999) IL-1 up-regulates osteopontin expression in experimental crescentic glomerulonephritis in the rat. *Am J Pathol*, **154**, 833-841.
92. Zhang, C.H. et al. (2011) Prognostic significance of osteopontin in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *Int J Cancer*,
93. Zhao, B. et al. (2011) Osteopontin as a potential biomarker of proliferation and invasiveness for lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*,
94. Zohar, R. et al. (2000) Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration. *J Cell Physiol*, **184**, 118-130.

Buchangaben und weitere Literatur

1. G. Herold, Innere Medizin 2005, Köln
2. Gerok, Huber, Meinzer, Zeidler, Die innere Medizin 2007, Schattauer Stuttgart
3. W. Remmele, Pathologie, Band 4 1997, Springer Berlin

10 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christoph Bamberger und bei seiner Frau PD Dr. med. Ana-Maria Bamberger für die Überlassung dieses spannenden Dissertationsthemas, die Nutzung der Laboratorien, deren Unterstützung, deren motivierende und konstruktive Kritik und vor allem für die unendliche Geduld bedanken.

Der Wechsel aus regelmäßigen Rückfragen und Feedback waren eine perfekte Mischung.

Mein großer Dank gilt ebenfalls Dr. med. Juliane Briese. Sie war die beste Betreuerin, die man sich nur wünschen konnte. Sie brachte eine riesige Geduld für mich auf, um mir bei Problemen mit tatkräftiger Hilfe und Kreativität zur Seite zu stehen. Ihre Motivation mich an das „wissenschaftliche Arbeiten“ heran zu führen blieb ungebrochen.

Auch für die Möglichkeit meine Poster vorzustellen und an Kongressen teilzunehmen, möchte ich mich bedanken.

Meinem Doktorvater und dem Graduiertenkolleg „Molekulare Endokrinologie“ des UKE um Prof. Dr. med. Hans-Joachim Seitz danke ich ebenfalls für die Möglichkeit eines Stipendiums im Rahmen der wissenschaftlichen Forschung.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. rer. Nat. HaJo Paust und Bianca Kelp, deren Verständnis für biologische Prozesse und Tipps mir eine große Hilfe waren.

Ebenso danke ich den medizintechnischen Assistenten und Doktorandenkolleginnen und –kollegen für die Motivation, Unterstützung und die angeregten Diskussionen.

Vielen Dank auch Prof. Dr. med. C. Wagner aus dem Institut für Klinische Chemie des UKE für die Bereitstellung der Materialien für diese Arbeit.

Insbesondere gilt mein Dank meinen Freunden, insbesondere Dr. med. Johann Müller und Torben Jürgens, deren Motivationshilfe und fleißiges Korrigieren elementar für die Entstehung dieser Arbeit waren.

Letztlich möchte mich bei meinen Eltern und bei meiner Freundin Anna-Lena Reimers bedanken. Sie haben mir mit Vertrauen, Zuwendung und großer Motivationshilfe die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht.

11 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Joscha Niemann

Hamburg, den 29.12.2011