

Aus der Universitäts-Frauenklinik mit Poliklinik Tübingen
Abteilung Allgemeine Geburtshilfe und Frauenheilkunde

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Wallwiener

Differentielle Genexpression bei Mammakarzinom-Zelllinien
nach chemotherapeutischer Behandlung mit Paclitaxel

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Claudia-Barbara Boschke
aus
Heidelberg

2008

1. Einleitung	4
1.1 Mammakarzinom	6
1.1.1. Epidemiologie	6
1.1.2. Prognosefaktoren	6
1.1.3. Ätiologie	10
1.1.4. Pathomorphologie	11
1.1.5. Therapie	12
1.1.5.1 operative Therapie	12
1.1.5.2 adjuvante Chemotherapie, Hormontherapie	13
1.1.5.3 primäre Chemotherapie	16
1.1.5.4 Radiatio	17
1.1.5.5 Biologisch wirksame Substanzen	17
1.1.5.6 Metastasiertes Mammakarzinom	18
1.1.6. Paclitaxel	19
1.1.7. Paclitaxel induzierte Apoptose	20
1.1.8. Ziel der Arbeit	24
1.2 Methoden zur Differenzanalyse zweier Zellpopulationen	25
1.2.1 Differential Display	27
1.2.2 Subtraktive Hybridisierung	28
2. Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1. Geräte, Zubehör und Verbrauchsmaterialien	29
2.1.2. Häufig verwendete Puffer	30
2.1.3. Filter und Membranen	32
2.1.4. Radiochemikalien	32
2.1.5. Software	32
2.1.6. Chemikalien	33
2.1.7. Molekularbiologische Kits	34
2.1.8 Enzyme	35
2.1.9 Oligonukleotide	35
2.1.10 PCR II-Topo-Vektor	38
2.1.11 Zelllinien	38
2.2 Zellkulturmethodik	39

2.2.1	Passagierung der Zellkulturen	39
2.2.2	Kryokonservierung der Zellen	39
2.2.3	Inkubation mit Chemotherapie	40
2.3	RNA-Verarbeitung	41
2.3.1	Isolierung der Gesamt-RNA	41
2.3.2	Reinheit und Integrität der RNA	42
2.4	DNase Verdau	44
2.5	Reverse Transkription	44
2.6	Differential Display	45
2.6.1	DD-PCR mit Arbitrary Primern	47
2.6.2	Isolation der differentiell exprimierten Banden	48
2.6.3	Reamplifizierung der differentiell exprimierten Banden	49
2.6.4	T/A- Klonierung und Transformation kompetenter E.coli	49
2.6.5	Präparation der Plasmid DNA	50
2.6.6	Restriktionsverdau	51
2.6.7	Sequenzierung	51
2.7	Subtraktive Hybridisierung	52
2.7.1	Doppelsträngige cDNA Synthese	55
2.7.2	RsaI Restriktionsverdau	56
2.7.3	Adaptorligation	56
2.7.4	Tester-Treiber Hybridisierung	57
2.7.5	Anreicherung der differentiellen cDNAs mittels PCR-Amplifikation	58
2.7.6	T/A Klonierung	60
2.7.7	Kolonie-PCR	60
2.7.8	Dot-Blot Analyse	61
2.7.9	Radioaktiv markierte cDNA-Sonden (alpha 32 d CTP)	61
2.7.10	Hybridisierung	62
2.7.11	Strippen der Membranen	62
2.7.12	Semiquantitative PCR	62
2.8	Zytomorphologische Beurteilung der Zellen mit DAPI-Färbung	63
3.	Ergebnisse	65
3.1	DNA Färbungen	65
3.2	Differential Display	68

3.2.1	Isolierung der Gesamt-RNA	68
3.2.2	Doppelansatz	69
3.2.3	Polyacryamid DD-Gel	70
3.2.4	Reamplifikation ausgeschnittener Banden	72
3.3	Subtraktive Hybridisierung	72
3.3.1	Analyse des RsaI-Restriktionsverdau	72
3.3.2	Analyse der Subtraktionsbanken mittels Kolonie-PCR	74
3.3.3	Hybridisierung der subtrahierten cDNA-Banken	75
3.4	Sequenzierung und Datenbankanalyse	80
3.5	Semiquantitative PCR	81
4.	Diskussion	83
4.1	Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren	83
4.1.1	IGFBP-5 und seine Rolle in der Apoptose	84
4.2	Histon-macro H2A	86
4.3	Subtraktive Hybridisierung	86
4.3.1	Gründe für gehäuftes Auftreten falsch positiver Befunde	86
4.3.2	Einfluss der Konzentration von Paclitaxel auf apoptotische Vorgänge	87
4.3.3	Mikrokernnachweis zur Optimierung der Inkubationszeit und Konzentration	88
4.4	Differential Display PCR	89
4.4.1	Gründe für gehäuftes Auftreten falsch positiver Befunde	89
5.	Zusammenfassung	91
6.	Anhang	92
6.1	Vollständige cDNA-Sequenz von IGFBP-5	92
6.2	Vollständige cDNA Sequenz von H2A Histon Protein	95
7	Literaturverzeichnis	99
8	Danksagung	108
9	Lebenslauf	109

1. Einleitung

Bereits seit dem Altertum existieren Kenntnisse über die tumorreduzierende Wirkung von Pflanzen und Mineralien, doch erst der Breslauer Neurologe Heinrich Lissauer konnte im Jahr 1865 in einer wissenschaftlichen Arbeit über positive Effekte einer Chemotherapie bei chronisch myeloischer Leukämie berichten (H.Lissauer, 1865).

Als Begründer der modernen Chemotherapie gilt Paul Ehrlich, der 1909 mit der Erfindung von Salvarsan eine antineoplastisch wirksame Substanz entwickelte (Ehrlich P, 1910).

Lange wurde die zytotoxische Wirkung von Chemotherapeutika auf ihre Fähigkeit zurückgeführt genotoxischen Schaden auszulösen (Epstein, 1990).

Zunehmend wird seit einigen Jahren die Erkenntnis gewonnen, dass zusätzliche Wirkungsweisen eine Rolle spielen, insbesondere die Induktion des sogenannten programmierten Zelltodes, der Apoptose, die als Endpunkt chemotherapeutisch behandelter Zellen betrachtet wird (Barry *et al.*, 1990; Hickman *et al.*, 1994).

Heute ist bekannt, dass sowohl Chemotherapie als auch Radiotherapie im Wesentlichen durch Induktion von Apoptose in den Zielzellen wirken (La Porta, 2004).

Der Endzustand der Apoptose einer Zelle wird über eine Kette von Reaktionsschritten erreicht, die eine Hintereinanderschaltung von Proteasenreaktionen, sogenannten Caspasen sind. Die zentralen Reaktionsschritte können auf unterschiedlichen Wegen eingeleitet werden.

Ein bedeutender Signalweg wird durch die Bindung eines Liganden an einen sogenannten Todesrezeptor, z.B. CD95 (APO-1/Fas) initiiert, was einer extrazellulären Regulation entspricht.

Ein weiterer, intrazellulärer Signalweg hat seinen Ursprung an den Mitochondrien und führt ebenfalls zur Aktivierung der Caspasen (Lüscher B., 2006).

Es konnten diverse Proteine identifiziert werden, die regulierend in diese Signalwege eingreifen. Ein bekanntes Beispiel ist das Bcl-2 (B-cell lymphom 2)-Protein, das als Protoonkoprotein Apoptose inhibieren kann, und in vielen Tumoren überexprimiert ist (Kirkin *et al.*, 2004).

Ein Protein mit proapoptotischer Wirkung ist Bax, das über Interaktion mit Bcl-2 an den Mitochondrien das Auslösen von Apoptose triggern kann (Kim *et al.*, 2002).

Die Überexpression proapoptotischer Proteine kann durch externe Stimuli, wie Chemotherapie oder Radiotherapie ausgelöst werden.

Es bestehen heute weitreichende Kenntnisse über den molekularen Mechanismus von Apoptose und dessen Induktion durch Chemotherapie.

Verschiedene Forschungsprojekte konnten Zusammenhänge zwischen Chemotherapie und differentieller Expression dieser Proteine herstellen. So konnten Lovat *et al.* zeigen, dass chemotherapeutische Behandlung von Neuroblastomzellen mit Fenretidin durch Induktion von Bak, einem weiteren proapoptotischen Protein, zu Apoptose führt (Lovat *et al.*, 2003).

Chemotherapeutische Behandlung von Plattenepithelkarzinomzellen führt zu einer vermehrten Expression von Bax und somit zur Auslösung von Zelltod durch Apoptose (Takemura *et al.*, 2005).

Friesen *et al.* zeigten, daß es bei Jurkat Zellen, humanen T-Zell Leukämie Zellen, nach Behandlung mit Doxorubicin zur Stimulierung der Expression der FAS Liganden mRNA kommt, der eine Rolle in Chemotherapie induziertem programmierten Zelltod über den Todesrezeptor spielt (Friesen *et al.*, 1996).

Die aufgeführte Literatur legt nahe, dass auch durch eine Behandlung von Tumorzellen mit Paclitaxel Apoptose über die Mitwirkung proapoptotischer Proteine erreicht wird, die sich in veränderter Expression der entsprechenden Gene widerspiegelt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte systematisch an Mammakarzinom-Zelllinien die differentielle Genexpression unter Einfluß von Paclitaxel, einem bedeutenden Chemotherapeutikum bei der Behandlung von Brustkrebs, untersucht werden.

Somit gewonnene Erkenntnisse über unterschiedliche Wirkungsweisen von Tumortheraeutika sind in vielerlei Hinsicht relevant. Durch Identifizierung differentiell regulierter Gene können neue Erkenntnisse über Signalwege der Chemotherapie induzierten Apoptose gewonnen werden. Weiterhin ließen sich neue Kombinationstherapien in der Brustkrebstherapie entwickeln, die sich hinsichtlich ihrer molekularbiologischen Wirkungsweisen ergänzen.

1.1 Mammakarzinom

1.1.1. Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist mit über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr weltweit die häufigste bösartige Tumorerkrankung der Frau (Ferlay, 2000; Parkin *et al.*, 2001; Parkin *et al.*, 2005).

Nach Angaben der Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut lag die bundesweite Inzidenz 1998 bei 110,1 Fällen je 100.000 Frauen, somit erkrankt ca. jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom.

1998 traten in der Bundesrepublik Deutschland 46.296 Neuerkrankungen auf, wobei eine kontinuierlich steigende Inzidenz festgestellt wurde (Institut, 2002).

Die Sterbefallzahlen lagen 1999 bei 17616 Frauen (Engel J, 2001), in den USA und der EU konnten seit Anfang der 90er Jahre sinkende Mortalitätszahlen registriert werden (Peto *et al.*, 2000).

1.1.2. Prognosefaktoren

Die Bestimmung von Prognosefaktoren beim Mammakarzinom hat das Ziel, den Krankheitsverlauf für die individuelle Patientin prospektiv möglichst genau vorherzusagen und ist zudem für die Wahl der Therapieform unabdingbar.

Zur Abschätzung der Prognose beim Mammakarzinom ist seit vielen Jahren die TNM-Klassifikation etabliert. Sie stellt heute eine von der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) festgelegte Stadieneinteilung der malignen Tumoren anhand ihrer anatomischen Ausdehnung dar (Hermanek *et al.*, 1987).

Die TNM-Klassifikation wurde zuletzt alle fünf Jahre aktualisiert, und ist heute in ihrer Fassung von 2002 gültig (Wittekind Ch, 2002).

Die Klassifikation unterscheidet verschiedene Stadien, die durch Tumorausdehnung, Lymphknotenstatus und Metastasierungstadium definiert werden.

Größe des Primärtumors

Bezüglich der Tumorausdehnung werden Mammakarzinome bis 2 cm Durchmesser mit T1, Befunde von 2cm bis 5cm mit T2, und alle darüber liegenden Karzinome als T3 klassifiziert. Mit T4 werden unabhängig von der Grösse alle Tumoren mit Infiltration in Haut und Brustwand bezeichnet.

Das UICC-Stadium I, welches einen Primärtumor ohne Lymphknotenbefall oder Fernmetastasen beschreibt, weist im Vergleich zu einem Stadium III, unter dass zum Beispiel ein Tumor gleicher Größe mit fixierter Lymphknoten-Metastase fällt, ein deutlich höheres Gesamtüberleben nach 4 Jahren auf (96% zu 60%) (H. P. Sinn, 2004).

Lymphknotenstatus

Ein wichtiger Prognosefaktor ist das Vorhandensein bzw die Anzahl oder das Fehlen der befallenen Lymphknoten. Werden diese klinisch oder histologisch nachgewiesen, wird dies als N1 bezeichnet. Ein fehlender Nachweis von befallenen Lymphknoten wird als N0 bezeichnet. Während bei negativem Lymphknotenstatus das relative Fünfjahresüberleben noch mit 82,8 % angegeben wird, werden bei ein bis drei befallenen 73%, bei mehr als 13 befallenen Lymphknoten nur noch 28,4% erreicht (Fisher *et al.*, 1983).

Metastasierungsstadium

Das Vorhandensein von Fernmetastasen z.B. in Lunge oder Leber zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wird mit M1 klassifiziert, und bedeutet eine wesentliche Verschlechterung der Gesamtprognose für die Patientin. Die Diagnose eines metastasierten Mammakarzinoms beinhaltet eine spezielle Therapieplanung, auf die in Kapitel 1.1.5.6 eingegangen werden soll.

Neben den drei aufgeführten Faktoren existieren eine Vielzahl von Weiteren, die erwiesenermassen Einfluss auf die Überlebensrate der Mammakarzinompatientinnen haben, und die im Folgenden erläutert werden sollen.

Östrogen/Progesteron-Rezeptorgehalt

Bei etwa zwei Drittel aller Mammakarzinome können spezifische Rezeptoren für Östrogen und Progesteron nachgewiesen werden. Dieser Steroidrezeptorgehalt der Tumorzelle gilt als weiterer, wesentlicher Prognosefaktor (Duffy, 2005) und besitzt zudem prädiktive Bedeutung, das heißt er lässt Aussagen über das Therapieansprechen, insbesondere auf antiendokrine Therapie zu.

Es konnte gezeigt werden, dass hormonrezeptornegative Karzinome mit einer erhöhten Proliferationsrate einhergehen und sogar früher rezidivieren können, also insgesamt eine schlechtere Prognose besitzen (Osborne, 1991).

Gianni et al. wiesen nach, dass beim primären Mammakarzinom diese prognostisch ungünstigere Gruppe besser auf primäre Chemotherapie anspricht als Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven Tumoren (Gianni, 2002). Deswegen kommt der Untersuchung der Rezeptorgehaltes bei dieser Patientengruppe im Rahmen der Indikationsstellung zu einer primär systemischen Therapie eine besondere Bedeutung zu.

Auch beim metastasierten Mammakarzinom ist der positiv prädiktive Wert der Steroidrezeptorexpression wichtig. Es konnte gezeigt werden, dass Patientinnen, deren Tumoren keine oder nur eine sehr geringe Menge an Hormonrezeptoren aufweisen, vom Zeitpunkt der Fernmetastasierung an eine signifikant geringere Überlebenszeit besitzen als Patientinnen, deren Tumoren einen hohen Steroidrezeptorgehalt aufweisen, da kein Ansprechen auf endokrine Therapie besteht (Hahnel & Spilsbury, 2004).

Grading

Es besteht eine eindeutige Abhängigkeit zwischen dem histologischen Grading und dem rezidivfreien Überleben. Unter Tumorgrading versteht man den Grad der histologischen Entdifferenzierung der Tumorzellen. Nach histologischen und zytologischen Kriterien ist eine Einteilung in niedrig maligne, mittelgradig maligne und hoch maligne möglich, wobei hier mitotische Aktivität, Größe des Zellkerns und Grad der Hyperchromasie berücksichtigt werden. Ein anerkanntes Gradingssystem ist das Scarff- Bloom-Richardson (SBR)- System (Genestie *et al.*, 1998). Eine Korrelation zwischen Grading und 5- Jahresüberlebensrate konnte in Studien belegt werden (Le Doussal *et al.*, 1989).

HER2/neu-Status

HER2/neu (human epidermal growth factor receptor, type 2) ist ein transmembranöser Wachstumsfaktorrezeptor vom Tyrosinkinase-Typ. 20-30% aller invasiven Mammakarzinome zeigen eine Überexpression dieses Glykoproteins. Eine HER2/neu-Überexpression ist mit fortgeschrittenem Tumorstadium, fehlender Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren, einer höheren Tumoraggressivität und somit einer schlechteren Prognose assoziiert (Joensuu *et al.*, 2003). Die Untersuchung auf Überexpression mittels Immunhistochemie oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist zum einen prognostisch, zum anderen bezüglich des Ansprechens auf eine Immuntherapie mit Trastuzumab relevant.

Herceptin® (Trastuzumab) ist ein therapeutischer monoklonaler Antikörper gegen HER2/neu, der 1998 in den USA und 2000 in der Europäischen Union für Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs zugelassen wurde.

Nach Ergebnissen der HERA (= Herceptin adjuvant)- Studie reduziert eine Therapie mit Trastuzumab im Anschluss an eine adjuvante Chemotherapie das Rezidivrisiko um 46 %, unabhängig vom Lymphknoten- und Hormonrezeptorstatus und der Art der adjuvanten Chemotherapie. Das krankheitsfreie Überleben ist statistisch signifikant verbessert (Baselga *et al.*, 2006). Seit 2006 ist Trastuzumab auch für die Behandlung von Patientinnen mit HER2/neu- positivem Brustkrebs im Frühstadium im Anschluss an eine Operation und eine Standard- Chemotherapie zugelassen (Lang & Hitre, 2006).

1.1.3. Ätiologie

Krebsentstehung ist ein multifaktorielles Zusammenspiel umweltbedingter und endogener, bzw. genetisch und nicht genetischer bedingter Faktoren. Die Wichtigsten, der bis heute ermittelten, nicht genetischen Risikofaktoren sind:

(RR = relatives Risiko):

- * Alter: 50 Jahre oder älter (vs.: jünger als 50 Jahre) RR: 6,5
- * Gutartige Brustkrankung: atypische Hyperplasie RR: 4,0 - 4,4
- * Alter bei erster Lebendgeburt über 30 Jahre (vs.: unter 20 Jahre) RR: 1,3 - 2,2
- * Alter bei Menopause 55 Jahre oder älter (vs.: unter 50 Jahre) RR: 1,5 - 2,0
- * Alter bei Menarche unter 12 Jahre (vs.: 14 Jahre oder älter) RR: 1,2 - 1,5
- * Hormonersatztherapie (s.u.) RR: 1,0 - 1,5

(Armstrong *et al.*, 2000; Eiermann W, 2001)

Demgegenüber stehen die genetisch bedingten Brustkrebserkrankungen, die etwa 5 bis 10%, bzw. vor dem 35. Lebensjahr sogar 35% der Brustkrebserkrankungen ausmachen.

1990 wurde das erste der hierfür verantwortlichen Gene, BRCA-1 (Breast cancer gene 1) auf dem Chromosom 17 (17q21) identifiziert.

BRCA-1 und 2 gehören zur Gruppe der Tumorsuppressorgene, deren Mutationen zu Brust- und Ovarialtumoren prädisponiert. Wissenschaftliche Untersuchungen zeigten, dass BRCA Proteine in eine Vielzahl von zellulären Prozessen eingebunden sind, die insbesondere von fundamentaler Bedeutung für DNA Reparaturvorgänge und transkriptionale Regulation nach DNA Schäden sind. Gene, die in DNA- Reparatur, Zellzyklus und Apoptose eingebunden sind, werden auf Transkriptionsebene durch BRCA Proteine reguliert. So sind die BRCA Proteine für die Erhaltung der Chromosomstabilität unerlässlich (Yoshida & Miki, 2004).

Mutationen im BRCA-1 Gen finden sich in Familien mit Auftreten des Mammakarzinoms vor dem 45. Lebensjahr und mit vermehrtem Vorkommen von Brust- und Ovarialkarzinomen. Frauen mit einer BRCA-1- Mutation haben ein 80 - 95%iges Risiko in ihrem Leben an einem Mammakarzinom und ein 60 - 80%iges Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (Jonat W, 2001).

1994 wurde ein zweites Gen auf Chromosom 13 (13q12-13) entdeckt, das BRCA-2 (breast cancer gene 2). Dieses Gen ist in den betroffenen Familien auch für das

erhöhte Auftreten von Mammakarzinomen bei Männern verantwortlich, die Rate an Ovarialkarzinomen hingegen ist nicht erhöht (Verhoog *et al.*, 2000).

Molekulargenetische Untersuchungen zeigten, dass in Familien mit mindestens vier betroffenen Frauen, sogenannten Hochrisikofamilien, BRCA-1 und BRCA-2-Mutationen für über 80% der Mammakarzinome verantwortlich sind, der Rest entfällt auf seltene Genmutationen (Jonat W, 2001).

Die Bewertung einer diagnostizierten Mutation für die Patientin bleibt jedoch schwierig, da nicht eindeutig zwischen einer krankheitsauslösenden Mutation und einem klinisch unbedeutenden Polymorphismus unterschieden werden kann. Daher sind einfache Screeningverfahren in naher Zukunft nicht zu erwarten. Hochrisikopatientinnen sollte die Teilnahme an speziellen Früherkennungsprogrammen empfohlen werden, die im Rahmen spezialisierter interdisziplinärer Tumorzentren über Erkrankungsrisiko und klinische Konsequenzen informieren. Bei bestimmten Risikokonstellationen kann im individuellen Fall eine prophylaktische Operation gegebenenfalls mit anschließender chemoprophylaktischer Maßnahme durchgeführt werden.

1.1.4. Pathomorphologie

Histogenetisch kann das Mammakarzinom je nach histologischer Zuordnung der Ursprungszelle in das Milchgangskarzinom (ductales Karzinom) bzw. das Lappchenkarzinom (lobuläres Karzinom) eingeteilt werden. Es werden invasive und nicht-invasive Wachstumsformen unterschieden.

Häufigste histologische Tumorform ist das duktal-invasive Karzinom, mit einem Anteil von ca. 70%, gefolgt von dem lobulär-invasiven mit ca. 10%.

Als weitere Erscheinungsformen sind das inflammatorische Karzinom und das Paget Karzinom abzugrenzen.

Das inflammatorische Mammakarzinom stellt einen Tumortyp mit spezieller Ausbreitungsart dar. Die Ausbreitung der Tumorzellen erfolgt innerhalb der subepidermalen Lymphgefäße, wodurch es zu einem Lymphstau mit Hautödem und entzündungsähnlichem Erscheinungsbild kommt. Das inflammatorische Mammakarzinom ist die seltenste, aber prognostisch ungünstigste Form des Brustkrebses (Lerebours *et al.*, 2005).

Das Paget- Karzinom entspricht pathogenetisch einer ungewöhnlichen, zellulären Ausbreitungs- bzw. Metastasierungsform eines duktales Mammakarzinoms. Die klinische Besonderheit besteht in einer einseitigen, ekzemartigen, gelegentlich ulzerierenden Hautveränderung der Brustwarze. Die Therapie des Morbus Paget der Brust unterscheidet sich nicht von der Therapie des üblichen intraduktalen bzw. infiltrierenden duktales Mammakarzinoms (Weise, 2003).

1.1.5. Therapie

Die Therapie des Mammakarzinoms beruht auf drei Säulen. Grundsätzlich stehen als Behandlungsmöglichkeiten die Operation, die medikamentöse Therapie und die Strahlentherapie zur Verfügung.

Zur optimalen Therapie der Mammakarzinompatientin ist es erforderlich, je nach Krankheitsstadium die passende Kombination der therapeutischen Optionen zu erstellen.

1.1.5.1 operative Therapie

Mit der Operation wird eine lokoregionäre Sanierung des Mammakarzinoms angestrebt. Heute kommen individualisierte Verfahren zur Anwendung. Das Ausmaß der notwendigen Radikalität hängt vom klinischen und histopathologischen Befund, sowie den Ergebnissen der bildgebenden Verfahren und dem Wunsch der Patientin ab.

Ein Meilenstein auf dem Gebiet der Mammachirurgie bei Malignomen war die Mastektomie nach William Steward Halsted (1894,1907), die heute noch als klassische Halstedsche Mastektomie bzw. radikale Mastektomie nach Halsted bezeichnet wird. Sie umfasst die Entfernung des gesamten Mammagewebes und eines ausgedehnten Hautareals einschließlich der Musculi pectorales major und minor, sowie des gesamten Binde- und Fettgewebes unterhalb der Vena axillaris einschließlich der Lymphknoten.

In den sechziger Jahren setzte sich die Erkenntnis durch, dass die modifizierte radikale Mastektomie, bei der der Musculus Pectoralis major geschont wird, bei kleinen Tumoren und unauffälliger Axilla (T1, N0, M0) ausreichend ist.

Mitte der Achtziger Jahre zeigten die großen NSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) Studien, dass unabhängig vom Lymphknotenstatus keine

wesentlichen Unterschiede nach brusterhaltender OP und Mastektomie bestehen (Fisher & Wolmark, 1985; Fisher et al., 1995).

Das brusterhaltende Behandlungskonzept erbrachte für die Patientinnen aufgrund des besseren kosmetischen Ergebnisses und der geringeren psychischen Belastung eine wesentlich zufriedenstellendere Therapiemöglichkeit. Daher stellt seit etwa Mitte der achtziger Jahre bei unifokalen Mammakarzinomen, die eindeutig R0 reseziert werden können, in der Regel die brusterhaltende Therapie mit Axilladisektion die Behandlung der Wahl dar. Im Rahmen der Zertifizierung von Brustzentren wird eine brusterhaltende OP bei über 50% der Mammakarzinomoperationen, bzw über 70% bei pT1- Tumoren gefordert (Krebsgesellschaft, 2003).

Bei lokal fortgeschrittenen Befunden (großer Primärtumor), schlechter Brust/ Tumorrelation oder Infiltration von Haut oder Musculus Pectoralis ist die modifizierte radikale Mastektomie, ggf. mit simultaner Brustrekonstruktion, auch heute noch Standard.

1.1.5.2 adjuvante Chemotherapie, Hormontherapie

Ziel der adjuvanten Chemotherapie ist es, unterstützend zu Operation und Strahlentherapie Mikrometastasen zu behandeln. Die Indikation zur adjuvanten Chemotherapie muss hinsichtlich des individuellen Metastasierungsrisikos gestellt werden.

Hier stellt sich das Risiko der „unnötigen“ oder zu aggressiven Therapie, insbesondere hinsichtlich der Therapienebenwirkungen, dar (Kahlert S, 2003). Es ist essentiell, anhand von Prognosefaktoren das individuelle Risiko einer Patientin zum Vorhandensein von Mikrometastasen einschätzen zu können und so diejenigen zu selektieren, die bei sehr guter Prognose eher von einer milden Therapie profitieren, als auch diejenigen mit sehr schlechter Prognose, in deren Fall eine sehr aggressive Therapie zu rechtfertigen ist.

Anhand von Begutachtung etablierter Prognosefaktoren (Tumorgroße, Nodalstatus, histologischer Tumortyp, Rezeptorstatus, Grading, Alter der Patientin) sowie prädiktiver Faktoren, wie zum Beispiel Hormonrezeptorstatus oder HER2/neu-Expression (human epidermal growth receptor 2) (Cianfrocca & Goldstein, 2004) wird für jede Patientin ein individuelles Therapiekonzept erstellt. Nach den Empfehlungen

der Konsensus-Konferenz in St. Gallen 2005 werden die Patientinnen nach der Einschätzung der Hormonempfindlichkeit und des Risikos in verschiedene Kategorien klassifiziert.

Als Standard- Chemotherapie zur adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms galt lange Jahre eine Durchführung von 4 Zyklen AC/EC (Adriamycin bzw. Doxorubicin/ Cyclophosphamid und Epirubicin/ Cyclophosphamid) oder 6 Zyklen CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Floururacil). Langzeiterfolge einer adjuvanten Chemotherapie mit dem CMF-Schema, das seit Anfang der siebziger Jahre eingesetzt wird, sind durch verschiedene Studien belegt (Antonia *et al.*, 1995), Demicheli 1995). Diese wird jedoch heute nur noch in Einzelfallentscheidungen, z.B. bei Klassifikation als niedriges Risiko und Kontraindikationen für anthrazyklinhaltige Therapien eingesetzt. Die Anwendung von AC/EC gilt seit den 90er Jahren als etabliert (Fisher, 1992).

Gegenüber diesen früheren Therapieschemata haben verschiedene modernere Regime einen Überlebensvorteil gezeigt, die alle mindestens 6 Therapiezyklen beinhalten.

Ein etabliertes anthracyclinhaltiges Therapieschema ist FEC (6 Zyklen 5-Floururacil, Epirubicin, Cyclophosphamid) nach Bonnetterre (2001).

Seit einigen Jahren wird zunehmend der Nutzen einer Hinzunahme von Taxanen (Paclitaxel, Docetaxel) zur anthracyclinhaltigen Standardtherapie diskutiert und etabliert.

Fünfjahresdaten einer Studie von Henderson *et al* zeigten durch die sequentielle Zugabe von vier Zyklen Paclitaxel nach vier Zyklen AC ein signifikant höheres rezidivfreies und Gesamtüberleben (Henderson *et al.*, 2003). Nachdem in den letzten Jahren noch weitere Studien die Überlegenheit einer sequentiellen Anthrazyklin-Taxan-Therapie untersuchten (Noronha, 2005), wurde auf der St. Galler Konsensus Konferenz 2005 erstmalig die Empfehlung des Einsatzes von Taxanen zur adjuvanten Therapie beim frühen Mammakarzinom mit Lymphknotenbefall ausgesprochen. In randomisierten Phase III Studien waren Therapieregime mit Docetaxel und Antracyclinen dem Kontrollarm mit jeweils einer antracyclinhaltigen 3er-Kombination überlegen und zeigten einen klaren Überlebensvorteil für diese Patientinnen (Martin *et al.*, 2005).

Auf der St. Galler Konsensus Konferenz 2005 wurden auch Empfehlungen zum Einsatz der oben erwähnten Standard-Chemotherapien ausgesprochen. Die über

Jahre propagierte 2er Kombination mit Doxorubicin/Cyclophosphamid (AC) über vier Zyklen sollte bei Patientinnen mit erhöhtem Risiko nur noch in Ausnahmefällen eingesetzt werden, z.B. bei postmenopausalen Frauen mit positivem Hormonrezeptorstatus und ohne Lymphknotenbefall (Nabholtz & Gligorov, 2005).

Zusätzlich zur zytotoxischen Chemotherapie kommt bei der adjuvanten Behandlung des Mammakarzinoms auch die antiendokrine Therapie zum Einsatz. Sie ist bei Patientinnen mit hormonrezeptorpositivem Tumor ein wesentlicher Bestandteil der Therapie.

Bei der adjuvanten antiendokrinen Therapie des Mammakarzinoms wird das Wachstum der Tumorzellen mittels Östrogenentzug gehemmt. Ungefähr zwei Drittel aller Mammakarzinome sind Östrogenrezeptor-positiv, zirka 40 bis 50 % exprimieren Progesteronrezeptoren.

Es gibt drei Möglichkeiten den Östrogeneinfluss auf die Tumorzellen zu verhindern. Zum einen besteht die Möglichkeit der Blockade der Östrogenrezeptoren. Tamoxifen, als Vertreter der Gruppe der selektiven Östrogen Rezeptor Modulatoren (SERM) wird seit Jahren als Standardtherapie des hormonrezeptorpositiven Mammakarzinoms verabreicht. Ein neuerer, selektiver Östrogen Rezeptormodulator, Raloxifen, bislang zur Prävention und Behandlung der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen verwendet, zeigt in einer US-amerikanischen Studie bei postmenopausalen Frauen eine gleich gute Primärprävention des Brustkrebses wie Tamoxifen, bei besserer Verträglichkeit (Yalcin *et al.*, 2005).

Die Hemmung der Östrogensynthese durch Aromatasehemmer verhindert die Umwandlung von Androstendion und Testosteron in Östron und Östradiol durch Inhibition des Aromatase-Enzyms. Bei postmenopausalen Frauen ist die Umwandlung von Androgenen aus der Nebennierenrinde in Östrogene die wichtigste Östrogenquelle. Auf der Internationalen Konferenz zur Primärtherapie des frühen Mammakarzinoms in St Gallen 2005 wurde erstmals empfohlen, Frauen in der Postmenopause mit hormonsensitivem Mammakarzinom, die adjuvant mit Tamoxifen behandelt werden, nach zwei bis drei Jahren auf einen Aromatasehemmer wie Anastrozol umzustellen. Andere Studien zeigten den primären Einsatz von Aromatasehemmern dem von Tamoxifen überlegen (Mouridsen & Robert, 2005).

Als dritte Möglichkeit besteht die Beendigung bzw. Suppression der ovariellen

Hormonproduktion durch Ovariectomie, Bestrahlung oder GnRH-Analoga, z.B. Goselerin, diese werden nur bei prämenopausalen Patientinnen angewandt. Der Einsatz von LHRH-Agonisten ist als primäre Therapie bei prämenopausalen Patientinnen mit hormonabhängigem metastasierendem Mammakarzinom möglich, wenn eine Kontraindikation gegen die Ovariectomie oder die Anwendung von Tamoxifen besteht. Generell wird heute allen Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven Tumoren ohne Kontraindikationen eine antihormonelle Therapie empfohlen. Bei fehlendem Nachweis von Östrogen- oder Progesteronrezeptor sollte immer zytostatisch behandelt werden (Kahlert S, 2003).

1.1.5.3 *primäre Chemotherapie*

Die primär systemische Therapie (PST), auch neoadjuvante Chemotherapie genannt, bezeichnet alle medikamentösen Therapieformen, die vor Durchführung einer operativen Maßnahme verabreicht werden.

Seit vielen Jahren ist die PST bei der Behandlung des inflammatorischen und des lokal weit fortgeschrittenen Karzinoms die Therapie der Wahl, um nach der medikamentösen Tumorreduktion eine Operation in sano zu ermöglichen.

Die Äquieffektivität der PST zur adjuvanten Chemotherapie wurde durch die Resultate der NSABP-18-Studie (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) bewiesen (Fisher et al., 1997; Fisher et al., 1998), in der ein Patientenkollektiv mit operablem Mammakarzinom vier Zyklen AC prä- oder postoperativ erhielt und nahezu identische Überlebensraten zeigte. Die Rate der brusterhaltenden Operationen konnte insbesondere in der Gruppe der großen Tumoren > 5,1cm erhöht werden.

Basierend auf diesen Daten können folgende Ziele der PST zusammengefasst werden: Die Überführung eines primär inoperablen in ein operables Mammakarzinom, Erhöhung der Rate an brusterhaltenden Operationen, Abschätzung der Prognose in Abhängigkeit des primären Tumoransprechens.

Der Einsatz der PST für primär operable Mammakarzinome erfolgt weiterhin nur in Studien.

1.1.5.4 *Radiatio*

Wichtiges Ziel der Strahlentherapie beim Mammakarzinom ist die Verhinderung von Lokalrezidiven und den aus ihnen hervorgehenden Fernmetastasen. Nach den heutigen Erkenntnissen sollte bei brusterhaltender Therapie generell eine Nachbestrahlung der Brust einschließlich der darunter liegenden Thoraxwand erfolgen.

Indikation und Umfang der Strahlentherapie werden nach Feststellung der initial möglichst genauen Tumorausdehnung und Risikokonstellation festgelegt. Die computergestützte Planung am CT-Schnitt und die Feldeinrichtung am Therapiesimulator ist Pflicht, um eine möglichst homogene Dosis im Brustgewebe zu erhalten und weitmöglichst Herz und Lunge zu schonen.

Die Bestrahlung sollte erst nach abgeschlossener Wundheilung, d.h. frühestens nach 3 Wochen beginnen, da ansonsten mit ungünstigen kosmetischen Ergebnissen zu rechnen ist.

Die operierte Brust wird üblicherweise mit täglichen Einzeldosen von vorzugsweise 1,8 Gray bis zu einer Gesamtdosis von 45 bis 50 Gray in 5 bis 6 Wochen bestrahlt.

Bei Tumorresektion nur knapp im Gesunden, großem Tumor (z. B. T2) und Grading III wird eine Verstärkung (Boost) von üblicherweise 10 Gray zur lokalen Dosiserhöhung im Tumorbett empfohlen.

Im Falle einer adjuvanten Chemotherapie wird die Strahlentherapie nach 2 bis 3 Zyklen eingereicht („Sandwich-Verfahren“).

1.1.5.5 *Biologisch wirksame Substanzen*

Seit 2000 ist in der Europäischen Union Trastuzumab zur Therapie bei fortgeschrittenem Mammakarzinom zugelassen. Der humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) ist gegen den HER2/neu Membranrezeptor gerichtet, der bei etwa 25% der Patientinnen mit Mammakarzinom in Überexpression vorliegt. Durch verschiedene Wirkungsmechanismen verhindert Trastuzumab das Tumorstrom und erhöht gleichzeitig die Chemosensibilität des Tumors (Romond *et al.*, 2005).

Wie durch Ergebnisse der HERA-Studie belegt werden konnte, verbessert die adjuvante Gabe von Trastuzumab auch beim HER2/neu-positiven operablen

Mammakarzinom ohne Fernmetastasierung das krankheitsfreie Überleben (Piccart-Gebhart *et al.*, 2005).

Seit Mai 2006 ist der Einsatz für diese Indikation in Europa, und somit Trastuzumab zur palliativen als auch zu adjuvanten Therapie zugelassen (Gonzalez-Angulo *et al.*, 2006).

Ein weiteres hoffnungsversprechendes Medikament ist Lapatinib, das an die intrazelluläre Bindungsstelle von Her2/neu als auch von EGFR bindet und dadurch die Phosphorylierung und Aktivierung bei der Thyrosinkinase verhindert (Moy & Goss, 2006).

Aktuelle Studien weisen auf einen bemerkenswerten Anstieg des progressionsfreien Überlebens bei Patientinnen mit Her2/neu positivem metastasierten Brustkrebs nach Addition von Lapatinib zu einer Monotherapie mit Capecitabin. Es gibt Hinweise für eine gute Wirksamkeit bei cerebralen Metastasen. Vorteile liegen in der oralen Applikation und geringen Nebenwirkungen bei insbesondere geringer Kardiotoxizität (Rack, 2006).

1.1.5.6 *Metastasiertes Mammakarzinom*

Da das metastasierte Mammakarzinom als nicht heilbar gilt, ist die Therapie in erster Linie als palliativ anzusehen. Als vorrangiges Therapieziel gilt der längstmögliche Erhalt einer guten Lebensqualität. Sekundäre Ziele sind die Remission und die Verlängerung des progressionsfreien Intervalls sowie des Gesamtüberlebens.

Prinzipiell stehen wie bei der adjuvanten Therapie Hormon-, sowie Chemotherapie, der monoklonale Antikörper Trastuzumab, als auch Strahlenherapie und Chirurgie zur Verfügung. Diese werden abhängig von Ausmaß und Lokalisation der Metastasen, Alter, Menopausen- und Rezeptorstatus sowie Allgemeinzustand zu einem individuellen Therapiekonzept zusammengefügt.

Für die Hormontherapie stehen mehrere Alternativen zur Verfügung (siehe 1.1.5.2).

Die Ansprechrate auf primäre Hormontherapie liegt im metastasierten Stadium zwischen 20 und 40%. Auch eine zweite oder dritte Hormontherapie kann wirksam sein. In der Postmenopause stellen Aromatasehemmer bei rezeptorpositiven Patienten mit Metastasierung das Mittel der Wahl dar (Heinemann, 2003).

Eine palliative Chemotherapie wird beispielsweise bei initialer Metastasierung, tumorbedingten Beschwerden und Versagen der Hormontherapie eingesetzt. Da im

Vordergrund der palliativen Behandlung stets die Erhaltung der Lebensqualität der Patientin steht, wird meistens eine nebenwirkungsärmere Monotherapie durchgeführt. Die Wahl des Chemotherapeutikums orientiert sie an Wünschen der Patientin (z.B. Akzeptanz der Alopezie) und einer eventuellen Vorbehandlung. Als Erstlinientherapie werden in der Regel Taxane oder Antracycline eingesetzt.

1.1.6. Paclitaxel

Paclitaxel ist ein komplexes Diterpenoid, das aus der inneren Rinde der pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* gewonnen wird. Seit den späten 70er Jahren zunehmend Inhalt pharmakologischer Forschung, zeigten sich vielversprechende Wirkungen, die die Bedeutung von Paclitaxel als Antitumor-Substanz festigten.

Heute wird Taxol in der klinischen Pharmakotherapie standardmäßig zur Primärbehandlung des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms in Kombination mit Cisplatin eingesetzt.

Über die neueren Empfehlungen der Verwendung von Taxanen zur Primärtherapie bei nodalpositiven Mammakarzinompatientinnen wurde oben berichtet.

Bei der Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms stellen Taxane eine der wichtigsten und vielversprechendsten Substanzgruppen dar (Gherzi et al., 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass Taxan enthaltende Therapieschemata im Vergleich zu nicht Taxan enthaltenden Therapieschemata zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Intervalls führen.

1.1.7. Paclitaxel induzierte Apoptose

Das Verständnis der Wirkung von Chemotherapie ist in den letzten Jahren fundamental gewachsen. Apoptose, der programmierte Zelltod, wird als der wichtigste Mechanismus betrachtet, der nach chemotherapeutischer Behandlung zum Tod der Zelle führt (Barry et al., 1990; Hickman et al., 1994).

Apoptose ist durch spezifische, morphologische Kriterien gekennzeichnet und kann so deutlich von der Nekrose unterschieden werden. Wichtige morphologische Kennzeichen sind Zellschrumpfung, Chromatin-Kondensation, DNA-Fragmentierung, und das Auftreten von Membranausstülpungen, das sogenannte "membrane-blebbing" (Lüscher B., 2006).

Je nach Zelltyp und Auslöser kann Apoptose über verschiedene Signalwege eingeleitet werden. Das gemeinsame Ziel der unterschiedlichen, Apoptose auslösenden Wege ist die Aktivierung einer Reaktionsreihe von Caspasen. Bei Caspasen handelt es sich um ubiquitäre Proteasen, die in einer inaktiven Form in der Zelle vorliegen. Am Ende dieser sogenannten Caspasen-Kaskade, kommt es zur spezifischen Hydrolyse von Proteinen und dadurch zur Einleitung des Zelltodes.

Ein wichtiger Signalweg wird über spezifische Zellmembranrezeptoren, sogenannte Todesrezeptoren aktiviert. Die Bindung von spezifischen Liganden (z.B. Fas) an diese Rezeptoren führt zur Aktivierung der erwähnten Kaskade.

Bei weiteren Signalwegen spielen Mitochondrien eine zentrale Rolle. Bei der Aktivierung dieses Apoptosewegs öffnen sich Membranporen in der äußeren Mitochondrienmembran und setzen u.a. Cytochrom C ins Zytoplasma frei. Die Permeabilitätserhöhung der äußeren Mitochondrienmembran wird durch proapoptotische Mitglieder der bcl-2 Familie oder andere Einflüsse getriggert. Im Zytoplasma führt Cytochrom C schließlich zur Einleitung der erwähnten Kaskade mit dem Endpunkt Apoptose (siehe Abbildung 1)(Green, 2005).

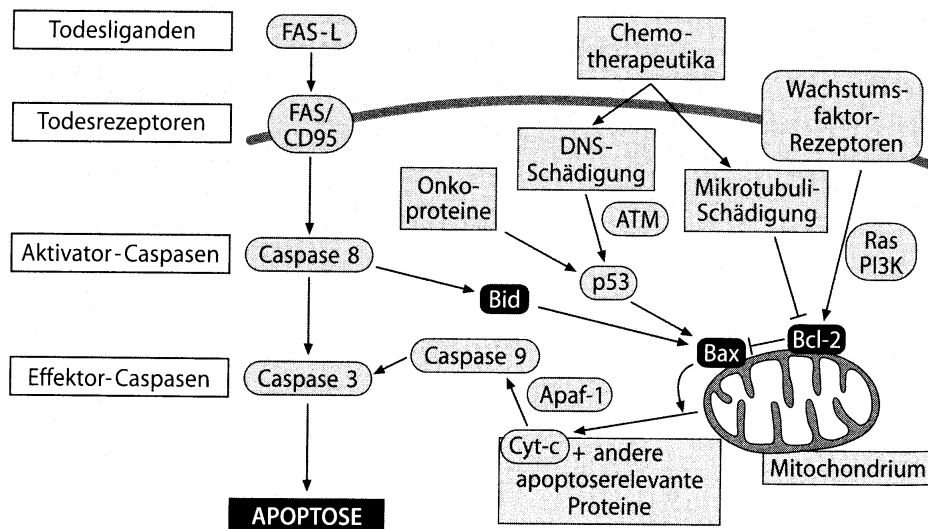


Abbildung 1: Regulationsvorgänge der Apoptose (aus Kompendium Internistische Onkologie, Schmoll, 2006)

Über die Wirkungsweise von Paclitaxel, als langjährig etabliertem Zytostatikum mit nachgewiesener Wirksamkeit bei diversen Malignomen, sind unterschiedliche Aspekte bekannt. Es wurde beschrieben, dass Paclitaxel bei Tumoren zur Induktion von Apoptose führt (Jordan *et al.*, 1996; Milross *et al.*, 1996).

Die Antitumoraktivität ist mit einer Stabilisierung der Mikrotubuli assoziiert. Mikrotubuli stellen einen Hauptbestandteil des Zytoskeletts der Zelle dar. Sie sind Hohlfasern mit einem Durchmesser von 25 nm, strahlen in ruhenden Zellen von Kernnähe zur Zelloberfläche aus und reorganisieren sich während der Zellteilung zu Spindelfasern, um die Tochterchromosomen zu entgegengesetzten Polen der Zelle zu ziehen.

Das Paclitaxel-Molekül bindet an eine spezifische Bindungsstelle der Mikrotubuli, verhindert hierdurch die Depolymerisation und die dynamische Veränderung der Mikrotubuli, was zu einer Stabilisierung des Spindelapparats führt (Horwitz *et al.*, 1993; Horwitz, 1994). Durch diese Stabilisierung wird ein Mitosearrest bewirkt.

Der Zusammenhang zwischen Zellzyklusarrest und Paclitaxel induzierter Apoptose ist jedoch noch weitgehend ungeklärt, das heißt, es besteht keine exakte Kenntnis über die biochemischen Mechanismen, die nach der Paclitaxelbindung an Mikrotubulie zur Apoptose führen. Vielmehr sind unterschiedlichste Einzelaspekte über Zellzyklusfunktionen und aus Paclitaxelbehandlung resultierende molekulare Wege bekannt, ohne dass diese bis jetzt schlüssig miteinander verknüpft werden konnten (Abal *et al.*, 2003).

Paclitaxel führt zu einem Arrest der behandelten Zellen in der G2/M Phase des Zellzyklus, ein normales Fortschreiten der Mitose wird verhindert (Rowinsky *et al.*, 1992). Von diesem Punkt aus kann die Zelle verschiedene Wege beschreiten. Direkte Apoptose-Induktion oder Übergang in einen multinukleären Zustand sind beschrieben worden.

Zur Regulierung des Zellzyklus verfügt die Zelle über verschiedene Kontrollpunkte. Der sogenannte mitotischen Spindel-Checkpoint, ein wichtiger Regulator des Zellzyklus im Stadium der Metaphase, ist mit Paclitaxel induzierter Apoptose assoziiert. An diesem Punkt wird der weitere Ablauf der Mitose bei inkorrekt organisierten Kinetochoren der Chromosomen am Spindelapparat, und somit Auftreten von Poly- oder Aneuploidie, verhindert. Auch eine Veränderung der Spindelstruktur durch chemische Substanzen, z.B. Paclitaxel, kann zur Aktivierung des Spindel-Checkpoints führen. Verschiedene Proteine (z.B. MAD, BUB, mps) die mit dem Spindel-Checkpoint assoziiert sind, werden im Rahmen der Paclitaxel induzierten Apoptose verstärkt exprimiert (Taylor & McKeon, 1997).

Wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung der vorliegenden Arbeit war es, geeignete Inkubationszeiten und Konzentrationen von Paclitaxel festzulegen. Essentiell war es, die RNA der Zellen zu einem Zeitpunkt zu untersuchen, in dem es zu unterschiedlicher Regulierung möglichst vieler Gene gekommen war. Sinnvoll erschien hier ein Zeitpunkt, zu dem es durch die Noxe der Paclitaxelbehandlung zur Triggerung apoptotischer Kaskaden kommt.

Um Ergebnisse der in diesem Projekt geplanten Untersuchungen auf klinische Aspekte beziehen zu können, ist hinsichtlich der Wahl der Chemotherapie-konzentration die Orientierung an Konzentrationen bedeutsam, die im Rahmen pharmakologischer Studien im menschlichen Serum gemessen werden können.

Die Mehrzahl der experimentellen Paclitaxel-Studien orientiert sich an sogenannten Plasma Peak Konzentrationen, die die höchsten, im Rahmen pharmakologischer Studien erreichten Konzentrationen von Zytostatika im menschlichen Serum darstellen. Hier sind Werte von 1 bis 10 µg Paclitaxel pro ml bzw. bis zu ca. 12 µM nach Applikation gängiger Dosierungsschemata gemessen worden (Maier-Lenz *et al.*, 1997; Mross *et al.*, 2000). Für Differential Display und Subtraktive Hybridisierung in der vorliegenden Arbeit wurde eine Konzentration von 7,5 µg/ml bzw. 8,7 µM Paclitaxel gewählt. Auch Guo *et al.* zeigten bei Osteosarkomzellen nach Paclitaxelbehandlung eine zeit- und dosisabhängige Induktion von Apoptose, steigend im Konzentrationsbereich von 0,004 - 8 µg/ml (Guo *et al.*, 2002).

Meyer *et al.* zeigten, dass Chemosensitivität von Mammakarzinomzellen im Bereich von 1 bis 9 µM nach Chemosensitivitätsmessungen mittels ATP-Zellviabilitätsassay ansteigt, so dass auch durch diese Arbeit die Wahl der Konzentration bestätigt wurde (Stumm *et al.*, 2004).

Zur weiteren Validierung von Paclitaxelkonzentration und Inkubationszeit wurden in dieser Arbeit zytomorphologische Kriterien untersucht. Hier ließ sich die Eigenschaft von Paclitaxel, die Bildung von sogenannten Mikronuklei auszulösen, nutzbar machen.

Bei Zellen eukaryontischer Lebewesen wird die Kernmembran während der Mitose aufgelöst. Der Wiederaufbau der Kernhülle erfolgt gegen Ende der Mitose und dabei wird die Gesamtheit der meist eng zusammenliegenden Chromosomen umschlossen. Wenn jedoch während der Telophase die Chromosomen nicht nahe beieinander liegen, können sich Chromosomengruppen oder auch einzelne Chromosomen mit einer eigenen Kernmembran umgeben, die als Mikrokerne bezeichnet werden (Traut, 1991).

Ähnliches passiert, wenn die Funktion des Spindelapparates beeinträchtigt ist, z.B. unter Einfluss von Colchizin oder Paclitaxel. Dabei wird der Hauptkern durch eine ganze Gruppe kleinerer Kerne ersetzt. Diese Paclitaxel induzierte Mikrokernbildung wird als Kennzeichen von apoptotischen Zellen interpretiert (Guo *et al.*, 2002).

Es wurden nach Inkubation der Mammakarzinomzellen mit Paclitaxel in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen DNA-Färbungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigten die Wahl der Konzentration von 7,5 µg/ml bzw. einen Bereich von 4-10 µM als geeignet (siehe Kapitel 4.3.3).

Bezüglich der Zeitspanne der Inkubation konnten hier 8 Stunden als sinnvoller Ausgangspunkt für Differenzanalysen bestätigt werden. Dieser Zeitwert findet sich auch in der Literatur. Allman *et al.* zeigten bei humanen Lymphomzellen nach Paclitaxel- Exposition eine Induktion der Apoptose nach 8 Stunden (Allman *et al.*, 2003).

1.1.8. Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, Gene zu identifizieren, bei denen es nach chemotherapeutischer Behandlung mit Paclitaxel zu einer differentiellen Regulierung kommt, um so weitere Erkenntnisse über die Wirkung von Paclitaxel auf Tumorzellen zu erlangen und Konsequenzen für die klinische Anwendung von Chemotherapie abzuleiten.

1.2 Methoden zur Differenzanalyse zweier Zellpopulationen

Zur vergleichenden Untersuchung des Transkriptoms, der Gesamtheit der zellulären mRNA, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung.

Sie ermöglichen einen cDNA Vergleich zweier Zellgruppen, beispielweise normaler und tumorös veränderter Zellen des gleichen Ausgangsgewebes oder wie im vorliegenden Experiment, vergleichende Untersuchung eines Zelltyps vor und nach chemotherapeutischer Behandlung.

Prinzipiell werden zwei methodische Ansätze unterschieden.

In einem Fall wird eine Analyse des gesamten Transkriptoms durchgeführt. Dies erfordert einen hohen Aufwand, da auch die Expressionsdaten nicht differentiell exprimierter Gene erhoben und erst später herausgefiltert werden. Hierzu gehören das Sequenzieren nicht normalisierter cDNA Bibliotheken, „serial analysis of gene expression“ (SAGE) (Velculescu *et al.*, 1995) und transcriptional profiling (Schena *et al.*, 1995) bzw. high density DNA Mikroarrays (Eisen & Brown, 1999).

Bei der alternativen Methodengruppe wird vor der Analyse eine Selektionierung durchgeführt. Bei den sogenannten Display Techniken werden Bandenmuster von cDNA-Fragmenten in einem Gel verglichen und so differentielle Expressionen identifiziert, so zum Beispiel bei der Technik des Differential Displays, das in dieser Arbeit angewandt wurde (Liang & Pardee, 1992; Liang & Pardee, 1995; Liang & Pardee, 1998).

Des weiteren existieren subtraktive Techniken, die eine Hybridisierungsreaktion zwischen den zu vergleichenden cDNA Proben nutzen, um Unterschiede anzureichern, wie zum Beispiel die repräsentative Differenzanalyse (Hubank & Schatz, 1994), und die subtraktive Suppressions-Hybridisation, die in dieser Arbeit ebenfalls verwandt wurde (Diatchenko *et al.*, 1996).

Die SAGE Analyse greift auf die bereits bestehende Infrastruktur zur DNA Sequenzierung zurück, um zur quantitativen Bestimmung von Transkriptionsraten zu gelangen. Dazu werden die cDNA Moleküle über das Oligo-dt-Ende an eine Oberfläche gebunden und anschließend mit einem Restriktionsenzym geschnitten. An die im Trägermaterial verbliebenen Restfragmente wird eine Kasette ligiert, die eine Schnittstelle für eine Restriktionsnuklease besitzt, welche von den cDNA

Restmolekülen ein 9bp langes Fragment abschneidet. Diese kurzen Fragmente werden über eine Ligation in zufälliger Reihenfolge zu einem langen Molekül zusammengelagert, das dann durch normale Sequenzierungsverfahren gelesen werden kann. Jedes 9-bp-Fragment kommt mit hoher Wahrscheinlichkeit nur in einem bestimmten Gen vor und dient somit als dessen Repräsentant. Durch die Häufigkeit, mit der es in der Sequenz auftaucht, lässt sich die Transkriptionsrate bestimmen. Schwäche der SAGE-Methode ist die hohe Fehlerrate aufgrund verschiedener technischer und systematischer Ursachen.

DNA Mikroarrays ermöglichen das Screenen von DNA-Material auf Vorhandensein verschiedener bekannter und teilweise bereits charakterisierter Gene.

Das Prinzip der Arrays wird als Reverse-Northern bezeichnet. cDNA Fragmente, die bis zu mehrere tausend Gene mit bekannten Funktionen repräsentieren, sind auf einer Nylon Membran immobilisiert.

Es wird mit einer markierten Sonde hybridisiert, die aus der Poly-A-RNA eines bestimmten Gewebes oder einer Zelllinie hergestellt wurde.

Anhand der Intensität der Hybridisierungsmerkmale kann darauf geschlossen werden, wie stark bestimmte Gene im untersuchten Gewebe exprimiert werden.

Die cDNA Fragmente sind 200 bis 500 bp lang und stellen eine Einzelsequenz ohne Poly-A-Schwanz, repetitive Sequenzen und hoch homologe Sequenzen dar, um Cross-Hybridisierungen zu minimieren und unspezifische c-DNA Bindung zu vermeiden. Größter Vorteil der Arrayanalysen ist der hohe Durchsatz und die Möglichkeit mit wenig Zellmaterial große Datenmengen zu erhalten. Ein Nachteil ist, dass niedrig exprimierte mRNAs nicht erfasst werden. Zudem sind die Untersuchungen auf bereits bekannte Gene beschränkt und äußerst kostenintensiv.

Im weiteren soll nun auf die angewandten Methoden des Differential Displays und der Repräsentativen Differenzanalyse (RDA) eingegangen werden.

1.2.1 Differential Display

Die Technik der Differential Display PCR wurde 1992 von Arthur B. Pardee und Peng Liang am National Institutes of Health in den USA entwickelt, um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren (Liang & Pardee, 1992). Die Methode erlaubt einen Vergleich der Genexpressionen zweier sonst identischer Zellpopulationen. Sie ermöglicht die Identifikation von Genen, deren Expression sich als Folge eines bestimmten Ereignisses, im vorliegenden Fall der Behandlung mit Chemotherapie, verändert hat (Hanke *et al.*, 1997). Nach Isolierung der Gesamt-RNA aus den zu untersuchenden Zellen wird die RNA zunächst in einer Erststrangsynthese in cDNA umgeschrieben. Die gebildete cDNA dient als Matritze für die anschließende Differential-Display PCR, bei der Fragmente mit einem Satz von 60 arbiträren 5' Primern amplifiziert werden. Die in jeder PCR Reaktion entstehenden Produkte werden in einem Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetrennt. Banden, die nur in einer Zellpopulation auftauchen, werden ausgeschnitten, eluiert und reamplifiziert. Anschließend werden die Produkte in einen Vektor kloniert, sequenziert und mit Datenbanksuche versucht, die Sequenzen einem bereits bekannten Gen zuzuordnen. Mittels semiquantitativer PCR wird die differentielle Expression der isolierten Genfragmente bestätigt. Eine detaillierte Beschreibung der Methode erfolgt in Kapitel 2.6.

1.2.2 Subtraktive Hybridisierung

Das Grundprinzip subtraktiver Methoden zum Vergleich zweier RNA Populationen ist die selektive Anreicherung differentiell vorhandener Sequenzen, bei gleichzeitiger Herausfilterung der in beiden Populationen vorkommenden, uninteressanten Sequenzen.

RNA zweier zu vergleichender Zellpopulationen wird in cDNA umgeschrieben und hybridisiert. Die cDNA der Zellpopulation, in der differentiell exprimierte Sequenzen erwartet werden, wird als Tester bezeichnet, die andere als Treiber. Während der Hybridisierung liegt die sogenannte Treiber cDNA im Vergleich zur Tester cDNA im vielfachen Überschuss vor. Dabei bildet die cDNA, die in Tester und Treiber vertreten ist, Mischhybride (Tester-Treiber Doppelstrang-DNA), während differentiell exprimierte Sequenzen in der anderen Population kein Homolog finden und so in der Mehrzahl als Einzelstrang DNA oder zumindest als Homohybrid verbleiben. Die Mischhybride können über physikalische Verfahren (z.B. mit Hydroxyapatit) abgetrennt und die verbleibende unhybridisierte cDNA, die differentiellen Sequenzen entspricht, angereichert werden.

Bei neueren, wie auch der vorliegenden Methode, erfolgt die Subtraktion durch Verhinderung von Amplifizierung unerwünschter DNA Fragmente. Dies wird durch die Ligierung von Adaptoren erreicht, die in mehreren PCR Schritten als spezifische Primerbindungsstellen dienen.

Die PCR-Produkte werden schließlich sequenziert und anschließend einer Datenbanksuche zugeführt. Eine ausführliche Beschreibung der Methode erfolgt unter Kapitel 2.7.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1. Geräte, Zubehör und Verbrauchsmaterialien

Abdeckfolien „ABI PRISM® Optical Adhesive Covers“, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt

Agarosegel-Elektrophoresekammer, Harnischmacher, München

Autoradiographie-Expositionskassetten, MS-Laborgeräte Schröder OMG, Wiesloch

BioMax MR-1 Kodak Film, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

DNA- Engine „Peltier Thermal Cycler PTC-200“, Biozym, Hess. Oldendorf

Einfrierröhrchen „Cryotubes“, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden

Elektronische Präzisionswaage, Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz

Entwickler „SCOPIX LR 5200“, Agfa, Mortsel, Belgien

Frischhaltefolie „Toppitis“, Melitta, Minden

Gelelektrophoresekammer Modell S2 (vertikal), Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe

Geltrockner „Modell 583“, Bio - Rad Laboratories GmbH, München

Glaspipetten 5ml, 10ml und 25ml „Falcon®“, Becton Dickinson Europ. HQ, Erembodegem-Aalst

Glasplatten (Spezialanfertigung)

Inkubatoren, Heraeus Sepatech, Osterode

Klebeband, schwarz, Tesa, Baiersdorf AG, Hamburg

Kühlzentrifuge mit Vakuumpumpe, Speed Vac, Model SC 110a, Savant, Holbrook, USA

Microwellen-Heizgerät, EHG Elektroholding GmbH (ehemals AEG), Frankfurt

PCR-Reaktionsgefäße „0.5 ml PCR tubes“, Biozym, Hess. Oldendorf

Petrischalen, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden

pH-Meter, Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz

Pipetierhilfe „Pipetboy acu“, Integra Biosciences GmbH, Fernwald

Pipetten, Abimed, Langenfeld

Pipettenspitzen, „filter tip“; 20µl, 200µl, 1000µl, Greiner GmbH, Frickenhausen und Solingen

Pipettierplatte „Micro Amp®“, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt

Reaktionsgefäße, 1.5ml, Eppendorf, Hamburg

Spannungsgeräte „Modell 455“, Consort, Turnhout, B.
Sterilwerkbank „Microflow“, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Thermomixer - Heizblock, Eppendorf, Hamburg
Thermomixer „5436“, Eppendorf, Hamburg
UV- Spektrophotometer „DU 7400“, Beckmann Instruments GmbH, München
UV- Transluminator mit Sofortbildkamera „Eagleye II“, Stratagene, Heidelberg
Vortex- Mixer „Reax Top C“, Heidolph, Kehlheim
Zellkulturflaschen „NunKlon™ Δ Surface“, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Zellkulturröhrchen, Greiner GmbH, Frickenhausen und Solingen
Zentrifuge „5417“, Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge „Megafuge 1.0.R“, Heraeus Sepatech, Osterode
Zentrifugenröhrchen „Falcon“ Becton Dickinson Europ. HQ, Erembodegem-Aalst

2.1.2. Häufig verwendete Puffer

10xMOPS-Puffer (pH 6,5-6,8)	200mM MOPS 50mM Na-Acetat 10mM EDTA
20xSSC (standard saline citrate)	3M NaCl 0,3M Natriumcitrat
RNA-Gel-Ladepuffer	0,86% Glycerin 0,5% Bromphenolblau 100mM Natriumphosphat
50xTAE-Puffer	100ml 0,5M EDTA (pH 8,0) 242g Tris 57,1ml Eisessig
	<hr/> ad 1l H ₂ O
DEPC- H₂O	1ml DEPC 1l H ₂ O

DNA-Gel-Ladepuffer	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylene Cyanol FT 40% (w/v) Sucrose in H ₂ O
Denhardt's	5g Ficoll Typ 400 5g Polyvinylpyrrolidon 5g BSA Fraktion V
	<hr/> ad 500ml H ₂ O
10x Dnase I Puffer	Tris-HCL, ph 8,4 20mM MgCl ₂ 2mM KCL 50mM
10xTBE-Puffer	1,34M Tris pH 8,8 0,44M Borsäure 25mM EDTA
Differential-Display-Gel-Ladepuffer	0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylen Cyanol FF 20mM EDTA pH 8 9,5ml Formamid 237,5mg Servolit Ionenaustauscher MB3
Hybridisierungspuffer	15g Dextransulfat in 462ml H ₂ O 60ml 20xSSC 60ml Denhardt's 3ml 20% SDS 6ml Natriumpyrophosphat 4,8ml 250mM EDTA 1,8ml Lachssperma

Waschpuffer-1	2xSSC 0,5% SDS
Waschpuffer-2	0,1xSSC 0,1% SDS
Markierungslösung	1000ml Inkubationspuffer 20µl Annexin 20µl Propidiumiodid (50µg/ml)
Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl 0,5M NaOH
Neutralisierungspuffer (pH 7,5)	1,5M NaCl 1M Tris
4x SET Puffer (pH 7,8)	0,6M NaCl 4mM EDTA

2.1.3. Filter und Membranen

Whatman 3MM, Schleicher & Schuell, Dassel

Gel-Blotting-Papier, Schleicher & Schuell, Dassel

Nylon Transfer Membran „To Fit Minifold®I, Schleicher & Schuell, Dassel

2.1.4. Radiochemikalien

[α -³³P]-dATP-Revidue (10mCi/ml; 2500Ci/mmol), Amershan Pharmacia Biotech, Freiburg

[α -³²P]-dCTP, (10mCi/ml; 3000Ci/mmol) Amershan Pharmacia Biotech, Freiburg

2.1.5. Software

Auf folgende Programme wurde über das Internet Zugriff genommen:

CMBI Clustal W Server, <http://www.cmbi.kun.nl/bioinf/tolls/slustalw.html>

NCBI-Programm „BLAST“, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

NCBI-Genbank, <http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>

2.1.6. Chemikalien

Agarose, Appligene Oncor, Heidelberg,

Ammoniumperoxosulfat (APS), Merck, Darmstadt

Ampicillin, ICN Biomedicals, Eschwege

Antihafthlösung „Serva BlueSlick“, Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg,

Bacto™ Agar, Becton Dickinson, Sparks/MD, USA

Bacto™ Yeast Extract, Becton Dickinson, Sparks/MD, USA

Bind-Silane plusone™, Pharmacia Biotech, Freiburg

Borsäure, Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, Niederlande

Bovines Serum, (BSA) Fraktion V, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Bromphenolblau, Merck, Darmstadt

CaCl₂, Riedel-De Haën Laborchemikalien GmbH und Co. KG, Seelze

Dextransulfat, SERVA Feinbiochemika GmbH & Co, Heidelberg

Diethyl Pyrocarbonate (DEPC), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

DTT (0,1M), Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

EDTA (25mM), Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

EDTA-Salz, GERBU, Gaiberg

Eisessig, Merck, Darmstadt

Essigsäure, Merck, Darmstadt

Ethanol, Riedel-De Haën Laborchemikalien GmbH und Co. KG, Seelze

Ethidiumbromid, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

Fetales Kälberserum (FCS), Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

Ficoll Typ 400, Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg

Formamid, Merck, Darmstadt

KCL-Reaktionspuffer, Promega GmbH, München

L- Glutamin, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

Glycerol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Harnstoff (Urea), USB™, Cleveland/Ohio, USA

Hepes, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Magnesiumchlorid (25mM), Eurogentec, Seraing, Belgien

14,5M β -Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
3-N-Morpholino-Propan-Sulfonsäure (MOPS), GERBU, Gaiberg
Natriumchlorid, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Deutschland
Natriumcitrat, Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH), Baker, Deventer, Niederlande
Natriumphosphat, Merck, Darmstadt
Penicillin/ Streptomycin ,10000 $\mu\text{g/ml}$, Seromed, Berlin
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1), Roth, Karlsruhe
Phosphate-buffered saline (PBS), Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
2-Propanolol (Isopropanolol), Riedel-De Haën Laborchemikalien GmbH und Co. KG, Seelze
Propidiumiodid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Puffer „10x Puffer“, Eurogentec, Seraing, Belgien
Puffer „10x KlenTag-PCR-Reaktions Puffer“, Clontech, Heidelberg
Puffer „buffer EcoR1* Not1*“, MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Puffer „First Strand“; 5fach konzentriert, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
RNAse Inhibitor, 50U/ μl , Boehringer, Mannheim, Deutschland
Salmon Testes DNA (Lachssperma), Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Sequagele XR complete, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sequagele XR extended range, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tris, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypsin/EDTA, PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Tryptone Peptone, Becton Dickinson, Sparks/MD, USA
Ultrapure dNTP Set, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid), PeqLab, Erlangen
Xylene-Cyanol FF, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Zytostatika:

- **Paclitaxel** die Substanz wurde von der Apotheke der Universitätskliniken zubereitet und die entsprechenden Mengen in 1ml NaCl 0,9% gelöst

2.1.7. Molekularbiologische Kits

Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit, Clontech, Heidelberg
Megaprime cDNA labelling System, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

NICK™ Columns, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Oligotex™ mRNA Mini Kit, Qiagen, Hilden
One Shot™ Kit, Invitrogen BV, Groningen, Niederlande
QIA prep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Hilden
QIAquick™ Gel Extraction Kit, Quiagen, Hilden
QIAshredder™, Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit, Qiagen, Hilden
TOPO™ TA Kloning® Kit, Invitrogen BV, Groningen, Niederlande

2.1.8 Enzyme

Advantage™ cDNA Polymerase Mix, Clontech, Heidelberg,
DNA-Polymerase „Goldstar“ (5U/μl), Eurogentec, Seraing, Belgien
Desoxyribonuklease „DNase I“ (1U/μl), Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Restriktionsenzym „EcoRI“ (10U/μl), MBI Fermentas, ST. Leon-Rot
Reverse Transkriptase „SuperScript™ RT II (200U/μl), Gibco BRL Life Technologies,
 Karlsruhe
T4 DNA Polymerase (5U/μl), Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Advantage™ Klentaq-Polymerase Mix, Clontech, Heidelberg
Taq-Polymerase (5U/μl), Promega GmbH, München

2.1.9 Oligonukleotide

Die Primer für die Differential-Display-PCRs wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen, Oligo(dt)- und M13 Primer von der Firma Gibco BRL Life Technologies (Karlsruhe). Die Primer D1CB-L2214, D1CB-U1712, G6CB-U1003, G6CB-L1503, A3CB-L1718, A3CB-U1344 wurden von MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Aus dem PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech, Heidelberg) entstammen folgende Oli-gonukleotide: Adapter1 und 2, cDNA-Synthese-Primer, Nested-PCR-Primer1 und 2R sowie PCR-Primer1. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Oligonukleotide in einer entsprechenden Menge H₂O auf eine Konzentration von 50pmol/μl eingestellt. Die Darstellung der Sequenzen erfolgt, soweit nicht anders angegeben, in 5'-3'-Richtung.

Zufallsprimer1	GTGCAATGAG
Zufallsprimer2	CAATGCGTCT
Zufallsprimer3	AGGATACGTG

Zufallsprimer4	TCCCTTTAGC
Zufallsprimer5	CGGATAACTG
Zufallsprimer6	AGGTTCTAGC
Zufallsprimer7	TCCGACGTAT
Zufallsprimer8	GGAAGACAAC
Zufallsprimer9	AGAAGCGATG
Zufallsprimer10	CCATTTACGC
Zufallsprimer11	AAATCGGAGC
Zufallsprimer12	GTCCATAGCA
Zufallsprimer13	TACACTAGCG
Zufallsprimer14	CATAGCCCTT
Zufallsprimer15	CTACTAGGGT
Zufallsprimer16	AGTGAATGCG
Zufallsprimer17	ACGATTCCTG
Zufallsprimer18	TTTACGGTGG
Zufallsprimer19	ATGGTGTAGC
Zufallsprimer20	AATCACACCC
Zufallsprimer21	ACGCTACATC
Zufallsprimer22	CGAAACAGTC
Zufallsprimer23	CTTACACTTG
Zufallsprimer24	GTTAGTGGCA
Zufallsprimer25	ATCTGAGGAG
Zufallsprimer26	AAGATAGCGG
Zufallsprimer27	CCTATCCGTT
Zufallsprimer28	GATTGCGTTC
Zufallsprimer29	CGTTCGTGTA
Zufallsprimer30	TGCTGTGAAC
Zufallsprimer31	TAGCACAGTC
Zufallsprimer32	CCAAACTGCT
Zufallsprimer33	CTTGAGTGGA
Zufallsprimer34	GGATCTGAAC
Zufallsprimer35	TCCTCAAGAC
Zufallsprimer36	AGCGTAACCT
Zufallsprimer37	CCACTTIGAG
Zufallsprimer38	GAGATGACGA

Zufallsprimer39	TCGCTATCTC
Zufallsprimer40	TGACTTGGCT
ZufallsprimerDOC	ACAAGGCACCGGTGCCTTGT
Adapter1 (10pmol/μl)	CTAATACGACTCACTATAGGGCTCG- AGCGGCCGCCCCGGGCAGGT 3'-GGCCCGTCCA-5'
Adapter2 (10pmol/μl)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAGC- GTGGTCGCGGCCGAGGT 3'-GCCGGCTCCA-5'
cDNA-Synthese Primer	TTTTGTACAAGCTT30N1N
GAPDHas (100pmol/μl,)	TGTTATGGGGTCTGGGATGGA
GAPDHs (100pmol/μl)	CCTGGACCACCCAGCCCAGCA
D1CB-L2214	GTG CCG TCT TCC TCC AGT GCC TCC CTT C
D1CB-U1712	AAC CCA ACT CAC GTT TCT GTA TGT CTT A
G6CB-L1503	AAC AGT AAT GCC AAC TAT CAG TGC T
G6CB-U1003	CTG CCT GCC AAG TTT GTG ATC CAC TGT A
A3CB-L1718	GCC CTC CCT GCC TGC TTA TGT ATG GAC A
A3CB-U1344	CAT CTC TCG CCT CCC TCG CTC GTC TCA G
M13 forward primer	CGA CGT TGT AAA ACG GCC AGT
M13 reverse primer	CAG GAA ACA GCT ATG AC
Nested-PCR-Primer1 (10pmol/μl)	TCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT
Nested-PCR-Primer2R (10pmol/μl)	AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT
Oligo(dt)-Primer (3μg/μl)	pd(T)12-18
PCR-Primer1 (10pmol/μl)	CTAATACGACTCACTATAGGG

2.1.10 PCR II-Topo-Vektor

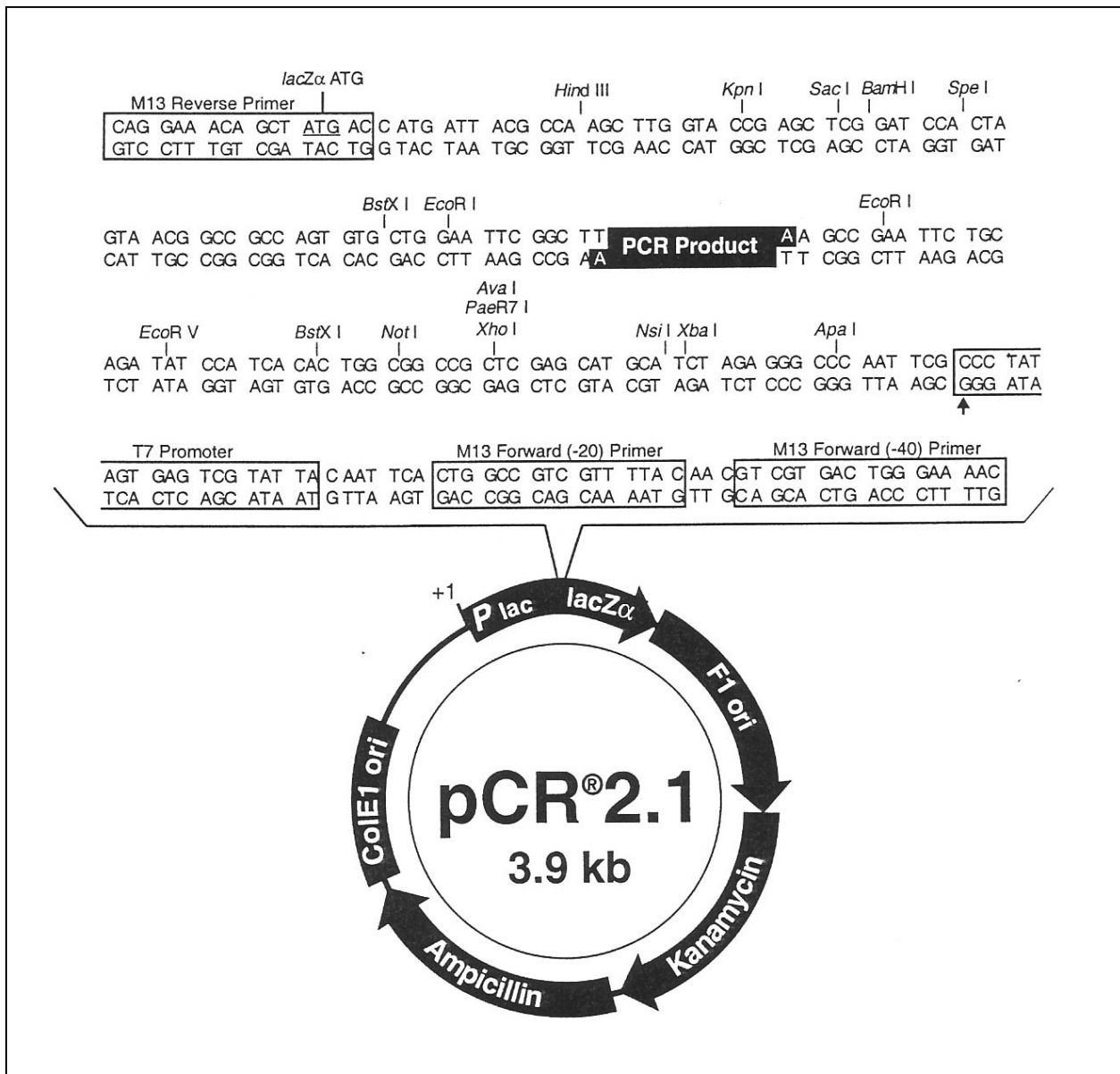


Abbildung 2: TopoT/A Vektor

2.1.11 Zelllinien

Die beschriebenen Experimente wurden an zwei verschiedenen Mammakarzinom Zelllinien durchgeführt.

Die Zelllinie KS stammt aus einer Primärzellkultur aus Gewebe einer Mammakarzinompatientin der Universitätsfrauenklinik Heidelberg. Es handelt sich um adenoide Karzinomzellen, die uns freundlicherweise von Frau PD Dr. rer. nat. B. Gückel zur Verfügung gestellt wurden. Anhand dieser Zelllinien wurden Arbeiten zum Thema der tumorspezifische T-Zellantwort veröffentlicht (Guckel *et al.*, 2005).

MCF-7 Mammakarzinomzellen sind Zellen eines duktal invasiven Mammakarzinoms und wurden von der Tumorbioologischen Abteilung der Universitätsfrauenklinik Heidelberg bereitgestellt.

2.2 Zellkulturmethodik

2.2.1 Passagierung der Zellkulturen

Die Versuche wurden mit den adhärennten Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und KS durchgeführt. Bei Ersterer handelt es sich um weltweit verbreitete, epithel-ähnliche Tumorzellen eines Adenokarzinoms der Mamma, letztere entstammt einer Primärzellkultur aus Aszites einer Mammakarzinompatientin an der Universitäts-Frauenklinik Heidelberg und besteht histologisch ebenfalls aus adenoiden Mammakarzinomzellen. Für die Versuche des Differential Displays wurde die MCF-7 Zelllinie, als Ausgangsmaterial für die RNA Extraktion der subtraktiven Hybridisierung KS-Zellen verwandt.

Die Kultivierung erfolgte steril in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37°C in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), angereichert mit 10% hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum, 1% Glutamin und 100µg/ml Streptomycin.

Zur Expansion wurden die Zellen zweimal wöchentlich eir folgt geteilt:

- Das Medium wurde steril abpipettiert, die Flasche mit 10 ml RPMI 1640 mit 5%FCS gespült, und wieder mit 50ml des Kultiviermediums versorgt
- Bei Konfluenz des Zellrasens von 70-80% erfolgte die Verteilung der Zellen auf neue Kulturflaschen. Zur Lösung der Zellen wurde das Medium entfernt, mit 10ml PBS gespült, und anschließend mit 5 ml Trypsin für 3-4min bei 37°C inkubiert.
- Die Reaktion wurde durch Zusatz des Mediums gestoppt. Die Zellsuspension wurde pipettiert, um Zellglomerate voneinander zu lösen. Nach zweimaliger Zentrifugierung für 7 min bei 1200 U/min und Waschen mit RPMI Medium, konnten die Zellen entweder im Verhältnis 1:3 auf neue Kulturlaschen verteilt, oder den weiteren Versuchen zugeführt werden.

2.2.2 Kryokonservierung der Zellen

Zur Lagerung der Zellen bis zu mehreren Monaten bei -80°C wurden die Zellen nach beschriebener Weise abtrypsinisiert, gewaschen und zentrifugiert. Die Zellen wurden in 0,5 ml Mengen anschließend zügig auf Eis in 0,5ml DMSO-Einfriermedium (FCS mit Dimethylsuloxid) überführt und unverzüglich bei -80°C eingefroren.

Zur Revitalisierung wurden die Zellen mit angewärmtem Medium von ungefähr 37°C Temperatur aufgetaut, unverzüglich in Waschmedium mit 5 % FCS aufgenommen und mehrmals gewaschen und zentrifugiert.

Die Kultivierung erfolge nach der gewohnten Methode.

2.2.3 Inkubation mit Chemotherapie

Bei einer Konfluenz des Zellrasens von ungefähr 80% konnten die Zellen der Inkubation mit Chemotherapie zugeführt werden.

Die Zellen wurden zunächst mit Waschmedium gespült. Anschließend wurden 29 ml DMEM-Kultiviermedium und die berechnete Menge an Chemotherapeutikum gelöst in 1 ml NaCl 0,9 % unter strengen Schutzmaßnahmen dazu pipettiert.

Die Zellen der Vergleichsgruppe wurden mit 29 ml Medium und 1 ml NaCl 0,9% versetzt.

Für die Verwendung bei Differential Display und Subtraktiver Hybridisierung wurde zur Inkubation der Zellen im DMEM-Medium eine Konzentrationen von $7,5\ \mu\text{g}$ Paclitaxel /ml [entsprechend $8,7\ \mu\text{M}$ (Molekulargewicht Paclitaxel 853,93g)] verwandt. Nach der entsprechenden Inkubationszeit, wurden die Medien abpipettiert, die Zellen nach oben beschriebener Methode abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in RLT-Lyse Puffer mit β -Mercaptoethanol aufgenommen, oder in Flüssigstickstoff schockgefrostet.

2.3 RNA-Verarbeitung

2.3.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Isolation der RNA aus den kultivierten Zellen wurde unter Verwendung des QIAshredder™ Kits, des RNeasy® Mini Kits und zur Gewinnung von mRNA zusätzlich des Oligotex™ mRNA Mini Systems nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

RNA ist empfindlich gegen Hydrolyse durch die äußerst stabilen und ubiquitären RNasen. Entsprechend erfolgten alle weiteren Versuchsschritte, die die Arbeit mit RNA einschlossen, unter streng RNase-freien Bedingungen. Dies beinhaltet das Tragen von Latexhandschuhen, Gefäße und Lösungen müssen RNase frei sein. Gelkammern und Schlitten wurden 30 min mit 0,05 M NaOH behandelt und mit DEPC (Diäthylpyrokarbonat), einem RNase Hemmstoff gespült.

- Die Zellen wurden nach der Ernte in Guanidiniumthiocyanat-haltigen RLT-Lyse Puffer, im Verhältnis 100:1 mit β -Mercaptoethanol versetzt, aufgenommen.
- Das Zellysate wird zur Homogenisierung auf die QIAGEN-Shredder Säule überführt und 2 min bei 14,000 rpm zentrifugiert. Die Shredder-Säule mit den haftenden Zellbestandteilen wurde verworfen und das Lysat 1:1 mit RNA-se freiem Ethanol gemischt.
- Maximal 700 μ l der Probe wurde nun auf die RNeasy mini spin Säule überführt und bei 10,000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Die RNA wurde so an die Silica-Gel Membran der Säule gebunden. Der Durchfluß konnte verworfen werden.
- Die Säule wurde mit 700 μ l RW1-Waschpuffer gewaschen und hierdurch DNA, durch Waschen mit ethanolversetztem RPE-Puffer Proteine und Salze entfernt.
- Schließlich wurde die Säule bei maximaler Geschwindigkeit 14,000 rpm zentrifugiert und somit die Membran getrocknet, bevor die Gesamt RNA mit jeweils 35 μ l RNase-freiem Wasser eluiert werden konnte. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei -80°C .
- Wurde wie bei der Subtraktiven Hybridisierung anstatt der Gesamt-RNA Messenger-RNA benötigt, so war ein weiterer Separationsschritt notwendig, wofür das Oligotex™-System wie folgt verwandt wurde:

- Bis zu 3mg Gesamt-RNA konnten, in Abhängigkeit von der eingesetzten RNA-Menge gelöst in einem Volumen bis maximal 500µl, in einem Ansatz eingesetzt werden.
- Das gleiche Volumen des OBB - Bindungspuffers wurde je nach eingesetzter RNA-Menge, sowie 15-175µl Oligotex™ - Suspension hinzugefügt und die Suspension für 3min auf 70°C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen.
- Die nachfolgende Inkubation von 10min Dauer bei Raumtemperatur diente zur Hybridisierung zwischen der RNA und der Oligo-d(T)-Sequenz der Oligotex™-Partikel.
- Es schloss sich eine zweiminütige Zentrifugation bei 14000g an, das Sediment wurde in 400µl - 600µl OW2 - Waschpuffer aufgenommen und die Suspension auf eine Zentrifugationssäule überführt und wiederum 1min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt.
- Die isolierte Messenger-RNA konnte in zwei Elutionsschritten mit je 20µl - 100µl des auf 70°C erwärmten OEB-Elutionspuffers durch je einminütige Zentrifugation bei 14000g gewonnen werden.

2.3.2 Reinheit und Integrität der RNA

Die Überprüfung von Reinheit und Qualität bzw. Konzentrationsbestimmung der RNA wurde mit UV- Spektrometrischer Messung bei einer Wellenlänge von 260nm im UV-Photometer durchgeführt.

5 µl des RNA-Eluats aus der RNA Isolierung wurden im Verhältnis 1:20 mit Wasser verdünnt. Ein Leerwert wurde zunächst mit reinem Wasser bei 260 nm Wellenlänge erstellt, und dieser anschließend automatisch von allen Messungen abgezogen.

In einer speziellen, RNase-freien Glasküvette, wurden nun die RNA Proben bei 260 und 280 nm Wellenlänge gemessen.

Die Konzentration ergab sich nach folgender Formel:

$\text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{\text{optische Dichte bei 260 nm} \times \text{Verdünnung} \times 40}{1000}$

Für Nukleinsäuren liegt das Absorptionsmaximum bei 260 nm, für Proteine hingegen bei 230 nm bzw. bei 280 nm.

Aus dem Quotienten der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm ließ sich eine Aussage über die Reinheit der RNA-Proben erstellen.

Reine RNA-Proben weisen bei der Messung idealerweise einen Quotienten zwischen 1.8 und 2.0 auf. Niedrigere Werte können durch Proteinkontamination, höhere Werte durch Verunreinigungen durch Salze zustande kommen.

Weiterhin wurde die Qualität der RNA mittels einer Elektrophorese auf einem 1%-igen Agarose Gel bestimmt:

- Der PH-Wert des 10x MOPS-Puffers wurde auf 6,5-6,8 eingestellt und durch Verdünnung mit DEPC Wasser 1X MOPS-Puffer hergestellt und autoklaviert.
- 50ml eines 1x MOPS Puffers wurden mit 0,5 g Agarose aufgekocht, und mit 2 µl Ethidiumbromid versetzt. Nach Abkühlung wurde die Argarosegelmasse luftblasenfrei in einen vorher mit Natronlauge gereinigten Gelschlitten gegossen und der Gelkamm eingesetzt.
- Nach der Auspolymerisation wurde der Schlitten in eine ebenfalls mit Natronlauge gereinigte Flachgelelektrophoresekammer eingesetzt und mit 1 x MOPS-Puffer überschichtet.
- 1 µg RNA wurde entsprechend den Messergebnissen der optischen Dichte mit 3 µg RNA-Stoppuffer versetzt und in die Taschen eingefüllt.
- Die Elektrophorese wurde zunächst 10 min bei 50 mV und anschließend 30 min bei 70 mV durchgeführt. Nach dem Gellauf wurde die RNA durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254nm sichtbar gemacht und fotografiert. Bei reiner RNA wurde eine Bande bei 1,9 kb (18-S) und eine Bande bei 5 kb (28-S) erwartet.
- Den weiteren Versuchen wurde nur RNA zugeführt, die unter UV Licht scharfe Banden und keinerlei Verunreinigung aufwies.
- Die DNA-Gelelektrophorese wurde nach dem gleichen Prinzip durchgeführt. Statt MOPS-Puffer wurde jedoch entweder TAE- oder TBE-Puffer als Laufpuffer verwandt. Außerdem wurde den Proben ein spezieller DNA-Auftragspuffer vor der Beladung des Gels zugefügt.

2.4 DNase Verdau

Die erhaltenen RNA Proben wurden vor der Reversen Transkription einer DNase Behandlung zugeführt, um spätere Amplifikation genomischer DNA zu verhindern. Für den DNase Verdau wurden eingesetzt:

2 µg RNA
2 µl DNase
1 µl 10 x DNase I-Puffer
ad 10 µl H₂O_{DEPC}

Es wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, und danach die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 25mM EDTA gestoppt. Anschließend erfolgte die Denaturierung der DNase bei 70°C für 10 Minuten im Thermocycler

2.5 Reverse Transkription

REVERSE TRANSKRIPTION FÜR DIFFERENTIAL DISPLAY

Die Gewinnung der cDNA erfolgte wie nachfolgend beschrieben:

5µl RNA
5µl H₂O_{DEPC} und
5µl Ankerprimer/Ankerprimergemisch

wurden bei 70° C für 10 Minuten in dem PTC-200 Thermal Cycler erhitzt.

Bei 42°C erfolgte die Zugabe folgender Substanzen:

8µl First Strand-Puffer
4µl DTT
1µl RNase Inhibitor
2µl dNTPs (10mM)

9µl H₂O_{DEPC}

1µl Reverse Transkriptase „SuperScript™ RT II”

Die Reaktion wurde bei 42°C 60min belassen, bevor das Enzym in einem nächsten Schritt bei 70°C 15 Minuten denaturiert wurde.

Es erfolgte eine Verdünnung der cDNA mit 60µl H₂O.

REVERSE TRANSKRIPTION FÜR DIE SUBTRAKTIVE HYBRIDISIERUNG

Die Reverse Transkription für die Subtraktive Hybridisierung wird, da die Reagenzien bereits dem KIT entstammen, gesondert aufgeführt

REVERSE TRANSKRIPTION FÜR DIE DOT-BLOT-ANALYSE

Die Reaktion gleicht in der Durchführung der zuvor beschriebenen. Ein Reaktionsansatz setzte sich letztlich wie folgt zusammen:

50-500ng mRNA in entsprechendem Volumen

1,6µl Oligo-(dT)-Randomprimer

4µl 5xFirst Strand Puffer

2µl DTT

1µl dNTP Mix (10mM)

1µl Reverse Transkriptase „SuperScript™ RT II”

ad 20µl H₂O_{DEPC}

cDNA wurde bei -20° C gelagert.

2.6 Differential Display

Die Technik der Differential Display PCR wurde 1992 von Athur B. Pardee und Peng Liang am National Institutes of Health in den USA entwickelt, um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren (Liang & Pardee, 1992). Die Methode erlaubt einen Vergleich der Genexpressionen zweier sonst identischer Zellpopulationen. Sie ermöglicht die Identifikation von Genen, deren Expression sich als Folge eines bestimmten Ereignisses, im vorliegenden Fall der Behandlung mit Chemotherapie, verändert hat (Hanke *et al.*, 1997). Das Prinzip der Methode ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

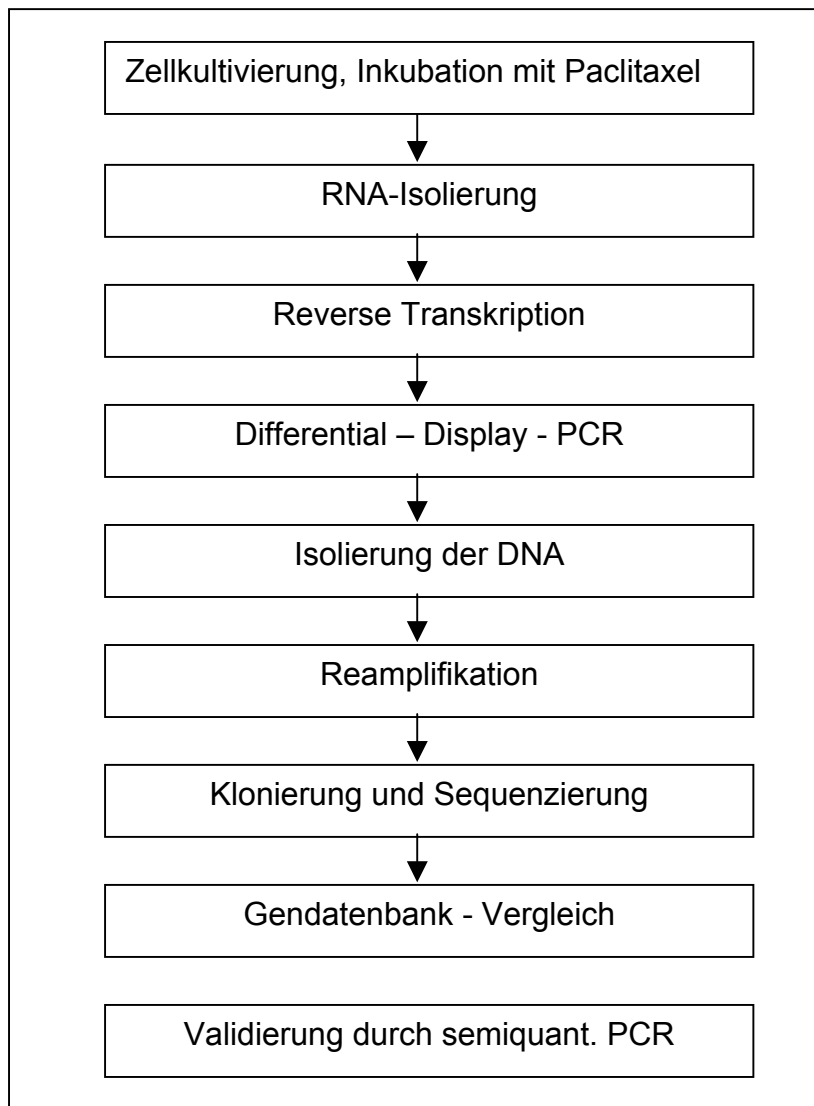


Abbildung 3: Differential-Display-PCR

Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene

Der Versuchsablauf stellt sich folgendermaßen dar:

Nach Isolierung der Gesamt-RNA aus den zu untersuchenden Zellen wird die RNA zunächst in einer Erststrangsynthese in cDNA umgeschrieben. Diese Reverse Transkription wird mit C oder G Ankerprimern der Firma Eurogentech durchgeführt, die neben einem Oligo-dT-Schwanz von 11 Nukleotiden zusätzlich zwei Nukleotide am 3'Ende enthalten.

Die verschiedenen cDNAs werden dann mit einem Satz von 60 verschiedenen 5' Primern in einer PCR- Reaktion amplifiziert. Diese Primer haben eine arbiträr festgelegte Sequenz mit einer Länge von zehn Nukleotiden.

Eine Hybridisierung findet an komplementären cDNA- Bereichen statt, wobei zu erwähnen ist, dass die Bereiche nicht völlig komplementär sein müssen. Ausreichend ist, wenn die letzten sechs Nukleotide des Primers an die cDNA binden.

Als 3'Primer wird entsprechend der Primer der zugehörigen Reversen Transkription verwendet.

Die in jeder PCR Reaktion entstehenden Produkte werden in einem Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetrennt.

Banden, die nur in einer Zellpopulation auftauchen, werden ausgeschnitten, eluiert und mit den Primern reamplifiziert, die zu ihrer Identifikation geführt haben. Zur Klonierung bietet sich eines der T/A Klonierungssysteme an, mit denen PCR-Produkte direkt in einen Vektor kloniert werden, der nachfolgend auch zur Sequenzierung benutzt wird.

Anschließend wird mit einer Datenbanksuche versucht, die Sequenzen einem bereits bekannten Gen zuzuordnen. Bei bekannten Genen ist es auch möglich, Informationen über deren Funktion zu erhalten.

Mittels semiquantitativer PCR wird die differentielle Expression der isolierten Genfragmente bestätigt.

2.6.1 DD-PCR mit Arbitrary Primern

Je Ansatz wurden eingesetzt:

2µl cDNA
1µl Zufallsprimer
2µl 10xPuffer
1,5µl MgCl₂
1,6µl dNTPs (25µM)
1µl Ankerprimer,
0,1µl [α -³³P]-dATP
0,2µl DNA-Polymerase „GoldStar“

H₂O ad 20µl

Die Differential Display PCR fand in dem PTC- 200 Thermal Cyler bei folgendem Programm statt:

1min bei 96°C
30s bei 94°C
1min bei 42°C
30s bei 70°C
3,5min bei 70°C

Die Schritte 2-4 wurden insgesamt 40mal nacheinander durchlaufen, bevor nach dem letzten Zyklus die abschließende, dreieinhalbminütige DNA- Amplifikation bei 70°C erfolgte.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in vertikal angeordneten, 6%igen Polyacrylamidgelen. Die Herstellung der Gele erfolgte durch Zusammenführung der folgenden Vorratslösungen:

48ml Sequagel XR extended range
12ml Sequagel complete

Die Polymerisation wurde durch Zusatz von 450µl Ammoniumperoxidsulfat initiiert. 5µl PCR-Produkt wurden durch ca. 45minütiges Trocknen in der Kühlzentrifuge mit Vakuumpumpe, durch nachfolgende Resuspension in je 3µl Probenpuffer und durch 10minütiges Kochen vorbereitet, bevor das Gel beladen werden konnte.

Die Elektrophorese wurde mit 1xTBE- Laufpuffer bei 40-60 Watt durchgeführt. Anschließend wurde das Gel auf ein Whatman-Papier überführt und das Ergebnis mittels Autoradiographie visualisiert.

2.6.2 Isolation der differentiell exprimierten Banden

Der entwickelte Film wurde mit Hilfe der radioaktiven Markierungen auf dem getrockneten Gel ausgerichtet und die ausgewählten, differentiellen Banden nach Markierung mit sterilen Nadeln präzise aus dem Gel ausgeschnitten. Dies war insbesondere wichtig, um die Harnstoffmenge gering zu halten, die zu einer verminderten Aktivität der Polymerase führen konnten.

Das Papier wurde in 100 µl deionisiertes Wasser aufgenommen und 15 Minuten bei 100°C im PCR Cyler gekocht.

Anschließend wurde bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Tube überführt. Die Proben wurden bei -20°C eingefroren.

2.6.3 Reamplifizierung der differentiell exprimierten Banden

Die Amplifikation wurde mit dem gleichen Primerpaar, welches zuvor in der Differential Display PCR verwandt worden war, durchgeführt.

Ein Ansatz setzte sich zusammen aus:

1µl DNA
2µl Zufallsprimer
5µl 10xPuffer
3,75µl MgCl₂
4µl dNTPs (250µM)
2µl Ankerprimer
0,2µl DNA-Polymerase „GoldStar“

ad 50µl H₂O

Die PCR wurde bei folgendem Temperaturstufen durchgeführt:

1min bei 96°C
30s bei 94°C
1min bei 42°C
30s bei 70°C

Die Schritte 2-4 wurden 40 mal durchlaufen.

Danach konnte das PCR Produkt wie im folgenden beschrieben, kloniert, transformiert, plasmidisoliert und letztendlich sequenziert werden.

2.6.4 T/A- Klonierung und Transformation kompetenter E.coli

Die Ligation der Subtraktions-Produkte in den pCR[®]2.1-Topo Vektor und die Transformation in kompetente E.coli erfolgten mit Hilfe des Topo[™] TA Kloning Kits und des One Shot Kit[™] nach Angaben des Herstellers:

- 2-4µl Subtraktions-Produkt und 1µl Vektor wurden in einem Gesamtvolumen von 5µl je Ansatz 5min bei Raumtemperatur ligiert.

- Zur Transformation wurde den Bakterien 2µl 0,5M β-Mercaptoethanols und anschließend 2µl des Ligationsansatzes hinzugefügt.
- Nach einer 30minütigen Inkubationsphase bei 0°C wurden die Zellen bei 42°C 30s Hitzeschock behandelt und wiederum 2min bei 0°C inkubiert, bevor 250µl SOC Medium hinzugefügt werden konnten.
- Danach schloss sich eine 30minütige Inkubationphase bei 37°C an.
- Zuletzt wurde der Transformationsansatz auf Ampicillin haltige LB-Agarplatten - hierdurch konnten dank der Resistenz des Vektors gegenüber Ampicillin die plasmidtragenden Klone selektiert werden - gegeben, mit einem sterilen Glasspatel ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Kolonien rekombinanter Klone konnten anhand ihrer weißen Farbe erkannt werden, da durch die Unterbrechung des β-Galaktosidasegens bei Insertion die Umsetzung von X-Gal zu einem blauen Farbstoff verhindert wird. Außerdem erlaubte die Begrenzung der Polylinker-Region des Plasmids durch unterschiedliche Primersequenzen eine Sequenzierung des Inserts nach erfolgter Klonierung.

2.6.5 Präparation der Plasmid DNA

Die Isolierung von bis zu 20 µg Plasmid DNA erfolgte durch Anwendung des QIAprep-Spin-Miniprep-Kit (Qiagen, Hilden).

Ein weiße Bakterienkolonie des transformierten *E-coli*-Stammes wurde mit einer sterilen Impföse gepickt, in 3 ml LB-Ampicillin Medium angeimpft und 15 h bei 37°C mit 220 Upm im Thermoschüttler geschüttelt.

Die Suspension wurde für 3 min bei 2000 Upm zentrifugiert und das Bakterienpellet in 250 µl P1 Puffer mit lysophilisierter RNase (100 µl/ml) resuspendiert. Es erfolgte die alkalische Lyse der Zellen durch Zugabe von 250 µl P2 Puffer.

Nach Neutralisation des Lysats durch 350 µl des Puffers N3 wurden in einer 10-minütigen Zentrifugation Zelltrümmer von der DNA getrennt. Der Überstand, der die erwünschte DNA enthält, wurde auf eine QIAprep-Säule gegeben und bei 13,000 für 1 min zentrifugiert, wodurch eine Bindung an die Säulenmembran erfolgte. Die Säule wurde mit 750 µl PE Puffer gewaschen, bei 13000 zentrifugiert, und der Durchfluss verworfen. Zur Trocknung der Säulenmembran wurde erneut bei 13,000 1 min zentrifugiert und die Säule anschließend auf ein sauberes Eppendorf-Röhrchen

gesetzt. Zur Elution wurde 50 µl H₂O auf die Säule pipettiert und erneut 1 min bei 13,000 zentrifugiert.

Anschließend wurde nach der Hydrolyse ein Agarose-Gel zur Kontrolle angefertigt und die DNA zur Sequenzierung weitergeleitet.

2.6.6 Restriktionsverdau

Ein Restriktionsansatz bestand aus 3µg Plasmid-DNA, 1µl Restriktionsendonuklease - hier EcoR1 - und 1µl EcoR1-Puffer. Der Ansatz wurde mit Waaser auf ein Endvolumen von 10µl aufgefüllt und 1-2h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit sollte das Insert aus dem Plasmid enzymatisch herausgeschnitten worden sein und mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden können.

2.6.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Fragmente wurde mit Hilfe des ABI PRIS-Big Dye-Terminator-Cycle-Sequenzierung-Ready-Reaktion Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt), nach der Methode von Sanger durchgeführt (Sanger et al.1977).

Die Sequenzierungen wurden freundlicherweise von Herrn A. Hunziker in der Abteilung von Prof. Franke, DKFZ, Heidelberg durchgeführt.

Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe des Programms BLAST mit Gendatenbanken verglichen.

2.7 Subtraktive Hybridisierung

Das Grundprinzip der subtraktiven Hybridisierung besteht darin, dass cDNA zweier zu vergleichender Zellpopulationen hybridisiert werden. Die cDNA der Zellpopulation, in der differentiell exprimierte Sequenzen erwartet werden, wird als Tester bezeichnet, die andere als Treiber. Während der Hybridisierung liegt die sogenannte Treiber cDNA im Vergleich zur Tester cDNA im vielfachen Überschuss vor. Dabei bildet die cDNA, die in Tester und Treiber vertreten ist, Mischhybride (Tester-Treiber Doppelstrang-DNA). Diese Mischhybride können über physikalische Verfahren (z.B. mit Hydroxyapatit) abgetrennt und die verbleibende unhybridisierte cDNA, die differentiellen Sequenzen entspricht, angereichert werden.

In neu entwickelten PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierungen werden differentiell exprimierte Gene nicht physikalisch getrennt, sondern mittels Suppressions-PCR spezifisch angereichert (Diatchenko *et al.*, 1996), (Gurskaya *et al.*, 1996).

Das Verfahren besteht aus mehreren Schritten:

- Der Erststrang- und Zweitstrang cDNA Synthese mit Tester und Treiber RNA
- Dem Restriktionsverdau mit RsaI
- Der Adaptorligation an die Tester cDNA
- Die erste und zweite Hybridisierung
- Die erste und zweite PCR-Amplifikation zur Anreicherung der differentiellen Genprodukte

Aus den zu vergleichenden Zellen, in diesem Fall unbehandelte KS-Mammakarzinom-Zellen und mit Chemotherapie behandelte KS-Zellen, wurde nach bereits beschriebener Methode RNA isoliert (siehe Kapitel 2.3.1.).

Aufgrund der leicht verfügbaren Menge an Zellen, konnte eine ausreichende Menge von 0,5-2 µg RNA eingesetzt werden.

In der ersten Versuchsanordnung wurden behandelte Zellen als Tester cDNA benutzt, um so Gene zu finden, die durch chemotherapeutische Behandlung stärker exprimiert werden. Umgekehrt fungierte in der zweiten Versuchsanordnung die cDNA

der unbehandelten Zellen als Tester, um so Gene zu identifizieren die durch Behandlung mit Chemotherapie herabreguliert wurden.

Es folgte mit Hilfe des PCR Select cDNA Substraktionskits die Erst- und Zweitstrang cDNA Synthese. Hier wurden Primer verwandt, die in ihrer Sequenz RsaI Schnittstellen enthalten. Anschließend wurden die cDNAs mit dem Restriktionsenzym RsaI verdaut, so dass Enden ohne Überhang erzeugt wurden, die im nächsten Schritt für die Adaptorligation nötig waren. Diese Adaptern dienten in den folgenden PCR's als Primeransatzstellen.

Nach Teilung der Tester DNA in zwei Fraktionen wurden die Adaptern ligiert (Adaptor 1 bzw Adaptor 2R).

In der ersten Hybridisierung wurde ein Überschuss an Treiber cDNA jeweils mit Tester cDNA hybridisiert. Existiert komplementäre cDNA in Tester und Treiber entstehen Mischhybride. Differentielle Transkripte verbleiben einzelsträngig oder als Homohybride.

Bei der zweiten Hybridisierung wurden beide Tester Fraktionen vermischt. Nur differentielle Transkripte, die einzelsträngig in beiden Tester Fraktionen vorkommen konnten Doppelstranghybride mit unterschiedlichen Adaptern bilden. Diese wurden als einzige über diese unterschiedlichen Adaptern in einer PCR exponentiell amplifiziert. Häufiger auftretende, nur im Tester vorkommende cDNA konnten wie bereits erwähnt als Homohybride mit sich selber hybridisieren. Eine Amplifikation mit identischen Primern an beiden Enden wurde jedoch in der PCR supprimiert.

Insgesamt wurde am Ende der Subtraktiven Hybridisierung cDNA, die in Tester und Treiber vorkommen, eliminiert.

Anschließend wurde eine zweite PCR Amplifikation mit sogenannten nestet Primern durchgeführt, um die gewünschten Sequenzen weiter anzureichern und Hintergrund PCR Produkte zu reduzieren und im weiteren die erhaltene cDNA dann in einen Vektor kloniert.

Um zu bestätigen, dass die erhaltenen Gene wirklich differentiell exprimiert wurden, erfolgte die Durchführung eines sogenannten differentiellen Screenings. Bei dem Vergleich sehr ähnlicher Zellpopulationen und nur wenig anzunehmenden differentiell exprimierten Genen, ist mit dem häufigen Auftreten von falsch positiven Klonen zu rechnen. Die subtrahierte cDNA Bibliothek wurde mit p32-gelabelten Proben aus Tester und Treiber cDNA hybridisiert. Die gewünschten Klone hybridisierten nur mit der Tester cDNA und konnten anschließend der Sequenzierung zugeführt werden.

Die folgende Abbildung 4 erläutert schematisch den Ablauf der subtraktiven Hybridisierung.

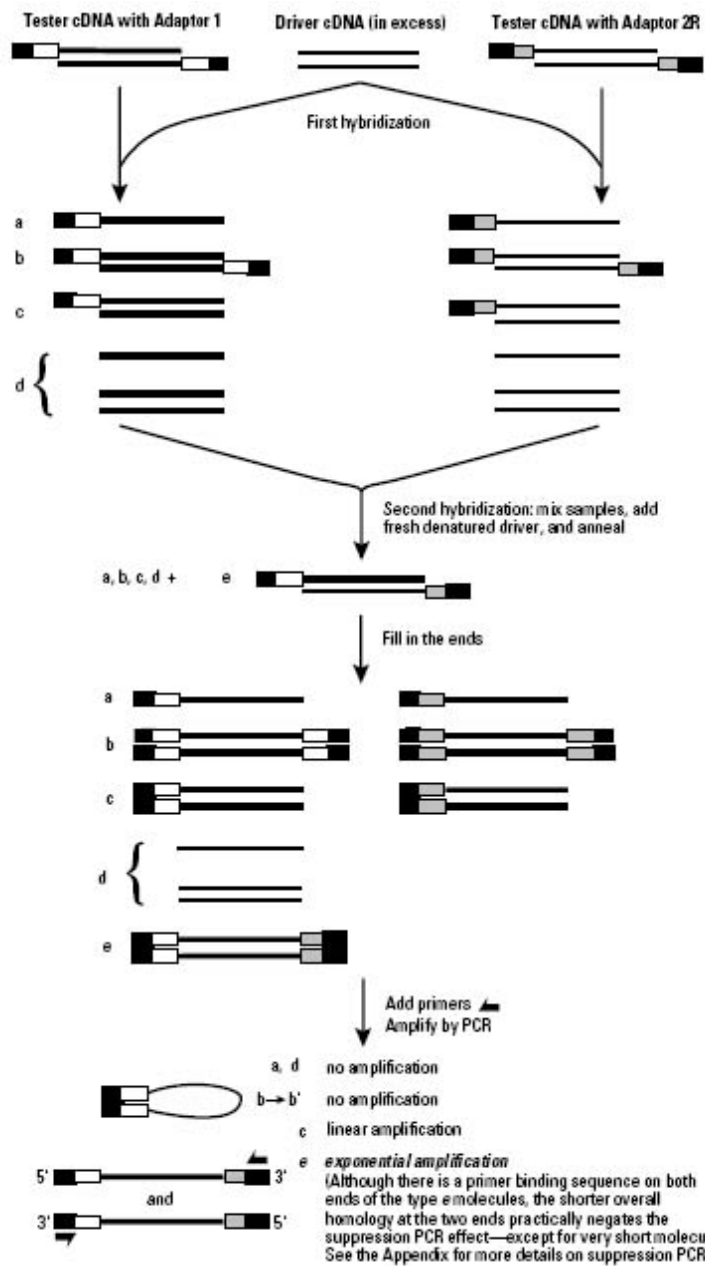


Abbildung 4: Subtraktive Hybridisierung

Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene (Clontech 2004, Gebrauchsanleitung PCR-Select cDNA Subtraction Kit)

2.7.1 Doppelsträngige cDNA Synthese

So weit nicht anders aufgeführt, entstammen die Materialien dem PCR-Select™ Subtraction Kit und dem Advantage™ cDNA Polymerase Mix (beide Clontech), die Sequenzen der Oligonukleotide werden in Kap. 2.2. gesondert aufgeführt.

Die Durchführung der einzelnen Schritte entspricht dem Hersteller-Protokoll.

cDNA-Synthese

- Zunächst wurde von jeweils 2µg mRNA unbehandelter KS-Zellen (Driver-Population) als auch behandelter KS-Zellen (Tester-Population) die entsprechende doppelsträngige cDNA hergestellt.

Erststrangsynthese: 2µg mRNA
 1µl cDNA-Synthese Primer

ad 5µl H₂O

Nach zweiminütiger Inkubation des Ansatzes bei 70°C und nachfolgender Eiskühlung wurden folgende Substanzen zugefügt:

2µl 5x First-Strand-Puffer
1µl dNTP-Mix (10mM)
1µl H₂O
1µl AMV Reverse Transkriptase

Die Reaktion wurde für 90min bei 42°C inkubiert und die Erststrangsynthese durch Abkühlen auf Eis beendet.

- Im zweiten Schritt der cDNA-Synthese wurden dem Ansatz weitere Komponenten zugesetzt:

48,4µl H₂O
16µl 5x Zweitstrangpuffer
1,6µl dNTP Mix (10mM)
4µl 20x Zweitstrang-Enzymcocktail

Die Synthese erfolgte innerhalb von 2 Stunden bei 16°C.

Danach wurden 2µl T4 DNA Polymerase zugegeben und die Inkubation für weitere 30min bei gleicher Temperatur fortgesetzt. Mit 4µl des 20x EDTA/Glykogen Mixes wurde die Zweitstrang-Synthese unterbunden.

- Es schloss sich eine zweistufige Phenol-/Chloroform-Extraktion mit je 100µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol an, bevor die cDNA mit 40µl 4M Ammoniumacetat und 300µl 95% Ethanol durch einen 20min dauernden Zentrifugationsschritt bei 14000 Umdrehungen/min gefällt werden konnte.
- Das Präzipitat wurde in 50µl Wasser resuspendiert und 43,5µl der gelösten cDNA für den nachfolgenden Restriktionsverdau eingesetzt, der zur Bildung kürzerer cDNA-Fragmente mit glatten Enden führte - eine Voraussetzung für die Adapterligation.

2.7.2 RsaI Restriktionsverdau

Es erfolgte das Zusammenfügen der folgenden Reagenzien in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß:

43,5µl cDNA
5µl 10xRsa I Restriktions Puffer
1,5µl des Restriktionsenzym RsaI (10U/µl)

- Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wurde vermischt und bei 37°C 1,5 Stunden inkubiert.
- Vor Abbruch der Reaktion mit 2,5 µl 20 EDTA / Glykogen wurden 5 µl Probe entnommen und auf einem 1%igen TAE Agarosegel aufgetragen.
- Die Proben wurden anschließend wie oben beschrieben extrahiert, gefällt und in 5,5 µl H₂O resuspendiert.

2.7.3 Adaptorligation

Zur Gewinnung des Testers wurde die verdaute cDNA mit Adaptoren ligiert. Jede Tester cDNA wurde in zwei Mengen unterteilt. Es wurden je 1,5 µl mit 7,5 µl Wasser

verdünnt und für die Adapterligation mit Adapter 1 bzw. in einem zweiten Reaktionsansatz mit Adapter 2 eingesetzt:

3µl H₂O
2µl 5 x Ligationspuffer
1µl T4 DNA Ligase (400U/µl)
2µl Tester-cDNA
2µl Adapter1 bzw. Adapter2

Die Ligation erfolgte über 12 Stunden bei 16°C, schließlich wurde die Reaktion mit 1 ml 20x EDTA/Glycogen Mix unterbunden und das Enzym durch 5-minütiges Erhitzen bei 72°C inaktiviert.

2.7.4 Tester-Treiber Hybridisierung

In der folgenden ersten Hybridisierung wurden beide Tester-cDNAs verschiedene Adapter tragend in getrennten Reaktionen mit einem Überschuss an Treiber cDNA versetzt. Nach der Denaturierung der Proben kam es zur Ausbildung von Hybriden zwischen Tester- und Treiber-cDNAs. Auf diese Weise kam es zur Anreicherung von einzelsträngigen cDNAs, die in den zu vergleichenden Populationen unterschiedlich exprimiert sind. Weiterhin sollte so ein Ausgleich zwischen häufigen und seltenen cDNAs erreicht werden.

Die Reaktionen setzten sich folgendermaßen zusammen:

Hybridisierungsreaktion 1
1,5µl Treiber-cDNA
1µl 4x Hybridisierungspuffer
1,5µl Tester-cDNA1 (mit Adapter1)

Hybridisierungsreaktion 2

1,5µl Treiber-cDNA

1µl 4x Hybridisierungspuffer

1,5µl Tester-cDNA1 (mit Adapter2)

Nach 1,5min Denaturierung bei 98°C wurden die Reaktionen für 8 Stunden bei 68°C belassen.

- Die beiden Proben wurden für den zweiten Hybridisierungsschritt vereinigt und 1,5µl des folgenden frisch denaturierten Treiber-Gemisches zugefügt:

1µl Treiber-cDNA

1µl 4x Hybridisierungspuffer

2µl H₂O

Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 68°C vollzogen, bevor sie durch Zugabe von 200µl Verdünnungspuffer und 7 min Erhitzen auf 75°C abgeschlossen wurde.

2.7.5 Anreicherung der differentiellen cDNAs mittels PCR-Amplifikation

Diese PCR-Reaktion ermöglichte die selektive Vervielfältigung der differentiell exprimierten cDNA.

Ein Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

subtrahierte cDNA	1 µl
10 x PCR Reaktionspuffer	2,5 µl
dNTP Mix (10mM)	0,5 µl
PCR Primer1	1 µl
50 x Advantage cDNA Polymerase Mix	0,5 µl
<hr/>	
H ₂ O	ad 25 µl

Zunächst wurden die Adapter durch 5min Inkubation bei 75°C aufgefüllt, um Bindungsstellen für den PCR-Primer zu schaffen.

Die anschließende PCR bestand aus 30 Zyklen mit folgenden Temperatur- und Zeitstufen:

30 sek bei 96°C

30 sek bei 66°C

1,5 min bei 72°C

Die zweite PCR diente zur weiteren Reduktion des unspezifischen Hintergrundes.

Es wurde das PCR-Produkt der 1. Reamplifikation im Verhältnis 1:10 verdünnt und 1 µl dieser Verdünnung verwandt.

In einem Reaktionsgefäß wurden folgende Reagenzien gemischt:

verdünntes PCR-Produkt	1 µl
10x KlenTag-PCR-Reaktions Puffer	2,5 µl
Nested PCR Primer1	1 µl
Nested PCR Primer2R	1 µl
dNTP Mix (10mM)	0,5 µl
50 x Advantage Klen Taq Polymerase Mix	0,5 µl
<hr/>	
H ₂ O	ad 25 µl

Es folgte die Amplifikation in 15 Zyklen bei folgenden Temperaturschritten :

30 sek bei 94°C

30 sek bei 68°C

1,5 min bei 72°C

Die PCR-Reaktion wurde mit einem weiteren Extensionsschritt für 5 min abschlossen.

Die PCR-Produkte wurden für eine T/A-Klonierung eingesetzt (Kap. 2.6.4-2.6.6), um zu untersuchen, ob die aus der Subtraktiven Hybridisierung hervorgegangen PCR-Produkte tatsächlich in unterschiedlicher Häufigkeit in den untersuchten Ausgangspopulationen vorlagen.

2.7.6 T/A Klonierung

Die Ligation der Subtraktions-Produkte in den pCR2.1-Topo Vektor und die Transformation in kompetente *E.coli* erfolgten mit Hilfe des Topo T/A Kloning Kits und des One Shot Kit nach Angaben des Herstellers (siehe Kapitel 2.6.4- 2.6.6).

2.7.7 Kolonie-PCR

Die mit einem sterilen Zahnstocher gepickten Kolonien, 96 je Subtraktionsansatz, wurden zur Vervielfältigung des im jeweiligen Plasmid inserierenden cDNA-Fragments in einem Reaktionsgefäß in dem anschließend aufgeführten Ansatz aufgenommen und mittels folgender PCR-Reaktion amplifiziert:

1µl Primer M13s
1µl Primer M13as
0,15µl Taq-Polymerase (Promega)
0,5µl dNTPs Mix (10mM)
3,1µl 10x KCL-Reaktionspuffer

ad 25µl H₂O

Die PCR wurde bei folgenden Temperaturstufen durchgeführt:

10min bei 94°C
1min bei 94°C
1min bei 55°C
1min bei 72°C
10min bei 72°C

Die Temperaturstufen 2 bis 4 wurden 30mal durchlaufen

2.7.8 Dot-Blot Analyse

Je Reaktionsansatz wurden 12µl PCR-Produkt, mit H₂O auf ein Volumen von 60µl verdünnt, durch Kapillarblot punktförmig auf eine Nylonmembran überführt, welche nacheinander mit Denaturierungspuffer, Neutralisierungspuffer und 4x SET durchsaugt und nach dem Trocknen durch UV-Bestrahlung mit der Membran kreuzvernetzt wurde.

Für das Screening wurden Sonden, die Tester- und die Driver-Population repräsentieren, wie nachfolgend beschrieben synthetisiert und diese für die Hybridisierung der Membranen verwandt. Da die Filter jeweils in doppelter Ausführung zur Verfügung standen, konnte einer der beiden Filter mit der Tester-Sonde, der andere mit der Driver-Sonde hybridisiert werden. Ein Vergleich der durch Autoradiographie erhaltenen Signale sollte Aufschluss über die differenzielle Expression eines Gens geben.

2.7.9 Radioaktiv markierte cDNA-Sonden (alpha 32 d CTP)

Je 40ng mit Methotrexat behandelte und unbehandelte cDNA wurden durch Einbau von [α -³²P]-dCTP unter Verwendung des Megaprime Labelling Systems wie folgt radioaktiv markiert:

- Zunächst wurden 40ng cDNA mit sterilem Wasser auf ein Volumen von 28µl Wasser eingestellt
- Nach Zugabe von 5µl des Randomnonamerprimers erfolgte eine Denaturierung für 5 min bei 95°C.
- Je Ansatz erfolgte der Zusatz von 10µl labelling buffer, 5µl [α -³²P]-dCTP und 2µl Enzym-Lösung.
- Die Reaktion wurde für 45 min bei 37°C belassen und zuletzt mit 5µl EDTA (0,2M) abgestoppt.
- Anschließend erfolgte die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide durch Säulenchromatographie mit Nick-Columns (Sephadex G-50) nach Angaben des Herstellers.
- Die Proben wurden nach einem letzten Denaturierungsschritt über 5min bei 95°C bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt.

2.7.10 Hybridisierung

Die Membranen wurden in Hybridisierungslösung und 30µg Lachssperma DNA/ml Lösung für 1-4 Stunden bei 65°C prähybridisiert. Die Hybridisierung mit den radioaktiven Sonden erfolgte über Nacht bei gleicher Temperatur. Anschließend wurden die Membranen zweimal für je 15min mit Waschpuffer1 und Waschpuffer2 bei 65°C gewaschen, mit Folie abgedeckt und die radioaktiv markierten cDNA-Hybride durch Autoradiographie bei -80°C sichtbar gemacht. Wurden differenziell exprimierte cDNA-Hybride erkenntlich, so wurde der das inserierende PCR-Fragment enthaltende Vektor erneut mittels Topo™ TA Kloning Kit und One Shot Kit™ kloniert und in E.coli transformiert. Anschließend erfolgte die Plasmidisolierung, Restriktionsanalyse und Sequenzierung der erhaltenen Inserts.

2.7.11 Strippen der Membranen

Die Hybridisierung konnte wiederholt werden, nachdem die Membranen wie folgt gestrippt worden war: Eine Mischung von 0,1fach SSC und 0,5% SDS wurde erhitzt, und die Membranen darin 15min unter Erkalten geschüttelt. Nachdem dieser Schritt ein zweites Mal wiederholt worden war, standen die Membranen zur weiteren Verwendung bereit.

2.7.12 Semiquantitative PCR

Der Ansatz für dieses Kontrollexperimentes bestand aus

10µl cDNA,
1µl Primer Genspezifischer_Primer_s (20pmol/µl)
1µl Primer Genspezifischer_Primer_as (20pmol/µl)
5µl 10x KlenTag-PCR-Reaktions Puffer
1µl dNTP-Mix (10mM)
1µl Advantage™ Klentaq-Polymerase Mix

ad 50ml H₂O.

Die PCR lief bei folgenden Temperaturstufen ab:

4min bei 96°C

1min bei 96°C

30s bei 63°C

1min 72°C

Nach 21, 24, 27 und 31 Zyklen der Temperaturstufen 2 bis 4 wurden je 10µl PCR-Produkt entfernt und für die spätere DNA-Gelelektrophorese asserviert. Die unterschiedlich lange reamplifizierten Fragmente wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels UV-Licht visualisiert. Zum semiquantitativen Vergleich wurde aus jeder Probe zusätzlich eine PCR mit genspezifischen Primern eines Housekeeping Genes, in diesem Falle β -Aktin durchgeführt.

2.8 Zytomorphologische Beurteilung der Zellen mit DAPI-Färbung

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzmarker, der an DNA bindet und in der Fluoreszenzmikroskopie verwendet wird. DAPI kann intakte Zellmembranen durchwandern und ist so zur Färbung lebender Zellen geeignet. In der Fluoreszenzmikroskopie wird DAPI ultraviolettem Licht ausgesetzt. Wenn es an zweisträngige DNA gebunden ist, liegt das Absorptionsmaximum bei 358, das Emissionsmaximum bei 461 Nanometern. Dadurch leuchtet mit DAPI angefärbte Erbsubstanz mit einer blau bis cyanen Farbe.

Sterile 8-Mulden-Objektträger wurden in Petrischalen gelegt und mit 18 ml Zellkulturmedium bedeckt. In jede Mulde wurde ein Tropfen Zellsuspension pipettiert, der nach Auszählung in der Neubauerzählkammer ca 250.000 Zellen pro ml enthielt. Diese Konzentration hatte in einem Vorversuch nach einer Zeitspanne von 48 Stunden einen semikonfluenten Zellrasen gezeigt.

Nach 40 Stunden Anwachsungszeit wurde das Zellmedium (RPMI) entfernt, das mit Chemotherapeutikum versetzte Medium zugegeben, und nach Ablauf der Inkubationszeit unter den vorgeschriebenen Vorsichtsmaßnahmen entfernt.

Es wurden folgende Schritte angeschlossen:

- Abspülen der Objektträger mit PBS, um überschüssiges Chemotherapeutikum zu entfernen
- Fixierung: eine Lösung aus 3,7% Formaldehyd in PBS mit einem pH von 7,2 wurde auf 37°C erwärmt und in dieser die Objektträger 3x für 5 Minuten inkubiert. Dabei wurde es vermieden, den Zellrasen zu verletzen.

- Entwässern: ein Objektträgerständer wurde mit einer Mischung aus Methanol und Aceton im Verhältnis 1:3 gefüllt und auf -20°C gekühlt. Die Präparate wurden für 3 Minuten in die gekühlte Lösung gestellt.
- Rehydratisierung: die Präparate wurden 3x für 5 Minuten in PBS Puffer bei Raumtemperatur gewaschen. Die Präparate wurden als nächstes mit PBS 0,01% Tween/DAPI/Bisbenzimid für 5 Minuten behandelt.
- Ein erster Waschschrift wurde mit PBS 0,01% Tween/DAPI/Bisbenzimid für 5 Minuten durchgeführt. Anschließend folgte ein 10 minütiger Waschschrift mit einer 1:10000 Mischung aus PBS-Puffer und Bisbenzimid, sowie zwei 5 minütige Waschschriffe mit reinem PBS-Puffer.
- Nach Spülung in H₂O für circa 1 Minute wurden die Objektträger getrocknet.
- Die Einbettung erfolgte mit 40 µg Moviol pro Objektträger und Auflage eines 24x36 mm Deckglässchen.

Im Hellfeld des Mikroskops wurden die Zellen morphologisch beurteilt. Bei 400facher Vergrößerung wurde die Rate der Mikrokerne auf 100 Zellen pro Versuchsansatz bestimmt. Die Größe eines Mikrokernes durfte maximal 1/3 des Durchmessers vom Hauptkern betragen.

3. Ergebnisse

Mittels Isolierung und Charakterisierung von differentiell exprimierten Genen chemotherapeutisch behandelter Zellen besteht die Möglichkeit, weitere Mechanismen des Chemotherapie induzierten Zelltodes aufzuklären. Auch liessen sich unter Berücksichtigung unterschiedlicher Wirkungsmechanismen effizientere Therapiekombinationen erstellen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mittels Differential Display und Subtraktiver Hybridisierung die mRNA-Populationen einer Brustkrebszelllinie vor und nach chemotherapeutischer Behandlung mit Paclitaxel verglichen.

3.1 DNA Färbungen

Mittels zytomorphologischer Beurteilung der Zellen nach DNA-Färbung sollte anhand der Beurteilung der Ausbildung von Mikrokernen ein geeigneter Zeitpunkt sowie eine Paclitaxelkonzentration für die Differenzanalyse festgelegt werden. Chromosomen, die auf Grund einer Störung im Spindelapparat nach Paclitaxelbehandlung nicht in einen der beiden Tochterkerne gezogen werden, erscheinen im Zytoplasma als Mikrokerne und werden als Zeichen der Apoptoseinduktion interpretiert (Fenech & Morley, 1985).

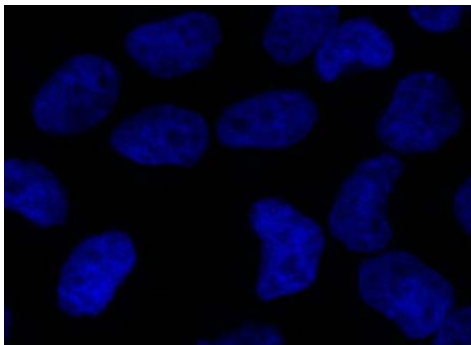
Es erfolgte die Behandlung der KS-Zellen mit unterschiedlichen Paclitaxel-Konzentrationen. Es wurden Vervielfachungen des Plasma-Spitzen-Spiegels von 1,875 µg/ml eingesetzt (0,5x, 1x, 4x, 8x 1,875 µg/ml) und mit Inkubationszeiten von 8, 12 und 24 Stunden kombiniert. Es zeigte sich eine zeit- und dosisabhängige Bildung von Mikrokernen (Siehe Tabelle 1). Die Auswertung erfolgte anhand des Zählens von 100 Zellen und der prozentualen Angabe von Mikrokernen pro Zelle.

Es wurde postuliert, dass eine nahezu vollständige Umwandlung in Mikrokerne bereits mit einem Abschluß verschiedener apoptotischer Kaskaden einhergeht. Ein Vorliegen von 50-60% Mikrokernen im Zellbild wurde als optimal für die Isolation zur Differenzanalyse gewertet. Diese Prozentzahl (ca 60%) zeigte sich bei einer Paclitaxeldosierung von 7,5 µg/ml bzw. 8,7 µM. Die Konzentration von 15 µg/ml wurde aufgrund der zuvor angeführten Literatur als zu hoch gewertet, und deswegen nicht für die weiteren Versuche der vorliegenden Arbeit herangezogen.

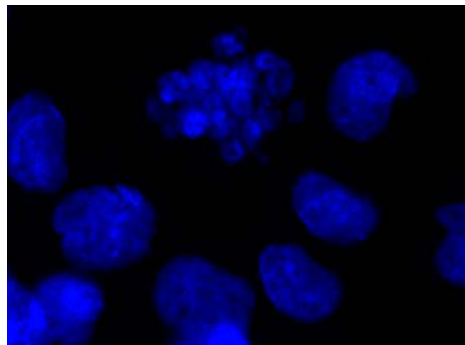
	INKUBATIONSZEITEN		
PACLITAXELDOSIERUNG [µg/ml]	8 STUNDEN	12 STUNDEN	24 STUNDEN
Unbehandelte Zellen	Keine Mikrokernbildung		
0,5 x 1,875 = 0,9375 µg/ml	Keine Mikrokernbildung	Keine Mikrokernbildung	Ca.20% Mikrokern, strahlenförmige Mitosen
1 x 1,875 = µg/ml	Ca.20 % Mikrokern, strahlenförmige Mitosen	Ca. 40% Mikrokern	Ca. 40% Mikrokern
4 x 1,875 = 7,5 µg/ml	60 % Mikrokern	80% Mikrokern	80% Mikrokern
8 x 1,875 = 15 µg/ml	80 % Mikrokern	>80% Mikrokern	>80%Mikrokern

Tabelle 1: prozentualer Anteil von Mikrokernen am Gesamtzellbild nach Inkubation von KS-Zellen mit Paclitaxel in Abhängigkeit von Inkubationsdauer und Paclitaxeldosierung.

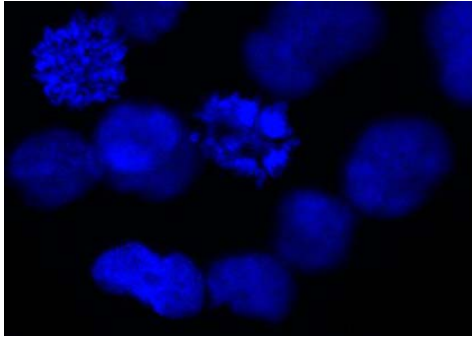
In Abbildung 5-10 werden exemplarische Bilder der DAPI Färbungen abgebildet.



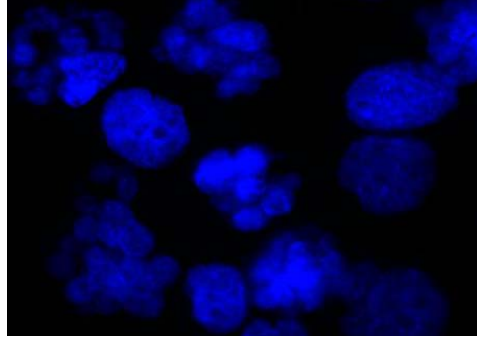
unbehandelte KS-Zellen



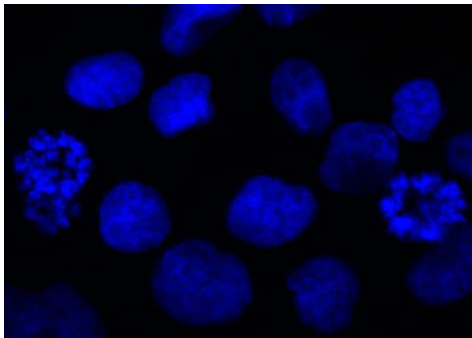
1,875 = µg/ml , 8h, ca.20 % Mikrokern



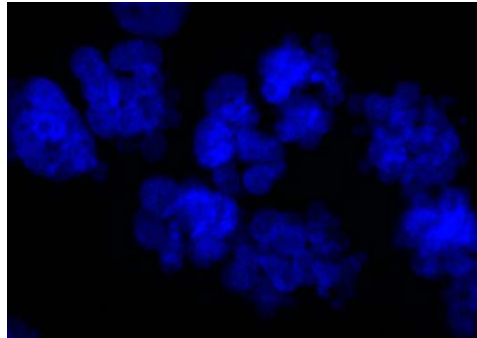
0,9375 µg/ml, 24h, ca. 20 % Mikrokerne,
strahlenförmige Mitosen



7,5 µg/ml , 8h, ca.60 % Mikrokerne



1,875 = µg/ml, 8h, ca. 20 % Mikrokerne,



15 µg/ml, 8h, >80 % Mikrokerne

Abbildungen 5-10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach DAPI-Färbung paclitaxel-behandelter KS-Zellen. Die Anzahl der Mikrokerne ist konzentrations- und zeitabhängig.

3.2 Differential Display

3.2.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Ausgangspunkt des Differential Display war die Isolierung reiner, intakter RNA aus den zu vergleichenden Zellpopulationen.

Nach Absorptionsspektrometrie ergab sich durchschnittlich aus der Zellmenge einer Kulturflasche eine Gesamt RNA-Menge von 60 µg.

Zur Überprüfung der Qualität der RNA wird 1 µg RNA auf einem 1% igen Argarose MOPS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 11).

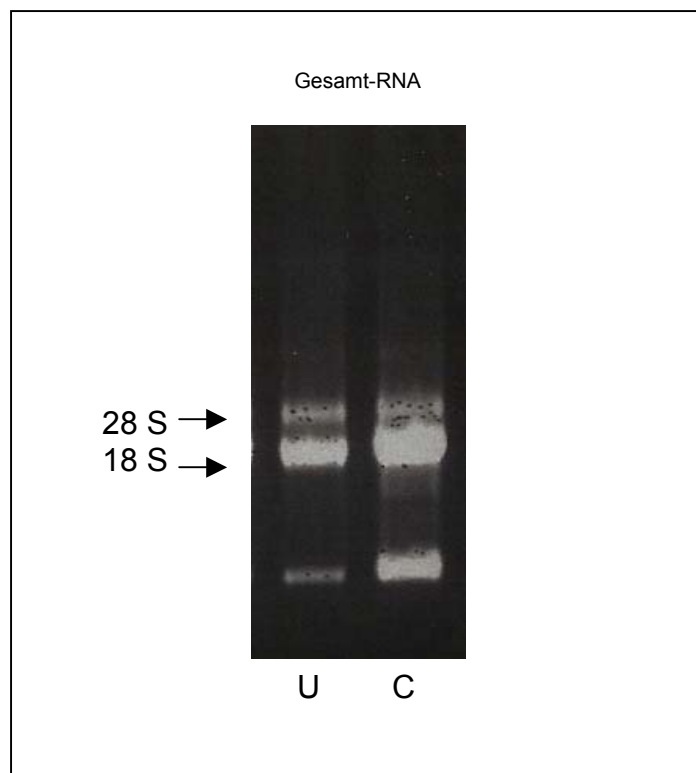


Abbildung 11: Gesamt-RNA aus unbehandelten (U) und mit Taxol behandelten (C) KS-Zellen. Das Gel zeigt die typischen 28S und 18S rRNA Banden.

Um eine starke Verunreinigung der RNA mit DNA zu verhindern, werden die Proben einem DNase-Verdau zugeführt. So kann im Anschluss eine Amplifikation genomischer DNA verhindert werden.

Die Qualität der DNase behandelten RNA wird wieder in einem 1%igen Argarose MOPS Gel überprüft.

3.2.2 Doppelansatz

Ein Hauptkritikpunkt an der Methode des mRNA-Differential-Display ist das Auftreten sogenannter falsch-positiver Banden. Gemeint sind Banden, die im Differential-Display Gel zwar unterschiedlich erscheinen, in Wirklichkeit aber nicht unterschiedlich reguliert sind, das heißt sich in der semiquantitativen PCR nicht bestätigen lassen. Ein Großteil dieser Banden kann dadurch eliminiert werden, dass alle Experimente doppelt durchgeführt und in benachbarten Bahnen des Gels aufgetragen werden. Dem weiteren Versuch wurden nur Unterschiede zugeführt, die sich identisch über alle vier Bahnen verfolgen ließen.

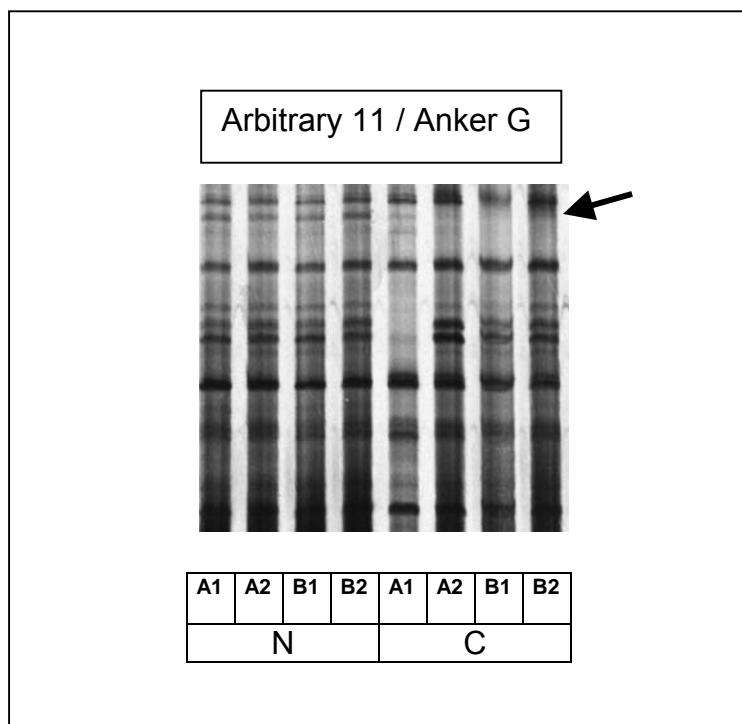


Abbildung 12: Polyacrylamid-Gel nach DD-PCR

Auf das Gel wurden pro unbehandelter und chemotherapeutisch behandelter Zellen vier parallele DD-PCR Ansätze (A1, A2, B1, B2) aus zwei parallelen reversen Transkriptionen (A, B) aufgetragen. Wie ersichtlich zeigen sich die meisten Banden in allen acht Bahnen identisch. Verglichen und isoliert wurden Banden, die Unterschiede zwischen unbehandelten (N) und mit Taxol behandelten Zellen (C) zeigten, jedoch innerhalb der vier Bahnen einheitlich waren (siehe Markierung Pfeil).

3.2.3 Polyacrylamid DD-Gel

Ziel der Methode der Differential Display PCR war es, möglichst alle differentiell exprimierten Transkripte zu amplifizieren. Es wurden Ankerprimer und willkürliche Arbitraryprimer verwendet, die eine Länge von 10 bp haben.

Nach Literaturangaben sind etwa 50-60 verschiedene Kombinationen von Anker und Arbitraryprimern nötig, um die gesamte RNA einer Zellpopulation auf differentielle Transkripte zu untersuchen.

Die DD-PCR mit 0,5 ng unbehandelter MCF-7-cDNA und 0,5 ng mit Taxol behandelter cDNA erfolgte mit den den Ankerprimern VG und VC sowie den Arbitraryprimern 1-25. Die Proben wurden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf unterschiedliche Banden untersucht. Im Laufe der gesamten Versuche konnten 4 Unterschiede isoliert werden, von denen exemplarisch drei (C/G11/1, N/G11/2, N/G11/3) in Abbildung 13 dargestellt sind.

Die Abbildung 13 zeigt das Ergebnis der DD-PCR des Ankers G sowie des Arbitraryprimers 11. Das Bandenmuster lässt drei Unterschiede erkennen.

Zur Bezeichnung der Banden wurde folgende Nomenklatur festgelegt.

1. N bzw C für unbehandelte bzw mit Taxol behandelte Zellen
2. G bzw C für den verwendeten Ankerprimer sowie die 1-25 für den verwendeten Arbitraryprimer
3. Reihenfolge der isolierten Bande, absteigend nach der Größe

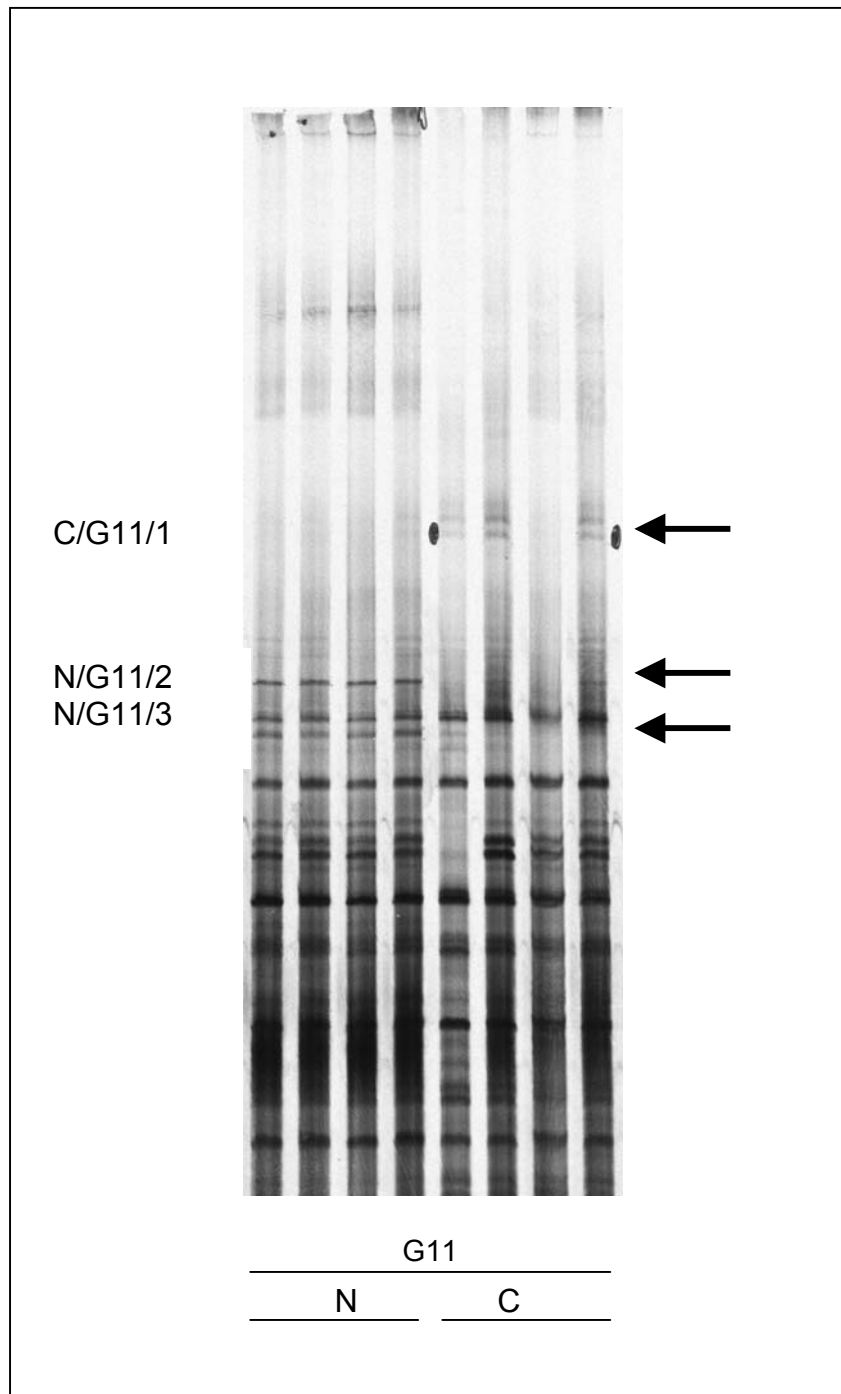


Abbildung 13: Polyacrylamid-Gel nach DD-PCR, AnkerG / Arbitrary 11

Das Bandenmuster lässt drei differentiell exprimierte Banden erkennen (C/G11/1, N/G11/2, N/G11/3), die markiert und extrahiert wurden.

3.2.4 Reamplifikation ausgeschnittener Banden

Die präzise ausgeschnittenen Banden wurden in 100 µl deionisiertem Wasser 15 Minuten gekocht. Anschließend wurde 1 µl dieses Ansatzes für die Reamplifikations-PCR eingesetzt.

Im Rahmen von anschließend durchgeführten Gendatenanalysen zeigte sich, dass es sich bei allen vier im Differential Display isolierten Klonen um ribosomale Gene handelt, so dass diese nicht weiter verfolgt wurden (siehe Diskussion 4.4.1).

3.3 **Subtraktive Hybridisierung**

3.3.1 Analyse des RsaI-Restriktionsverdau

Zur Isolierung differentiell exprimierter Gene nach chemotherapeutischer Behandlung wurde die PCR amplifizierte subtraktive Hybridisierung verwendet (Diatchenko *et al.*, 1996). Die Methode wurde nach Anleitung des PCR-Select cDNA Subtraktion Kit durchgeführt.

Die cDNA der unbehandelten und mit 7,5 µg/ml Paclitaxel 8 Stunden inkubierten KS-Zellen wurden nach Erst- und Zweitstrang cDNA Synthese über einen RsaI-Restriktionsverdau in kleinere Produkte geschnitten, die die Adaptorligation bei der anschließenden PCR amplifizierten subtraktiven Hybridisierung ermöglichte.

Zur Kontrolle des Restriktionsverdau der einzelnen cDNAs wurde unverdaute cDNA neben RsaI-verdaute cDNA auf einem 1%igen TAE Agarosegel aufgetragen und die Größenverteilung miteinander verglichen (Abbildung 14).

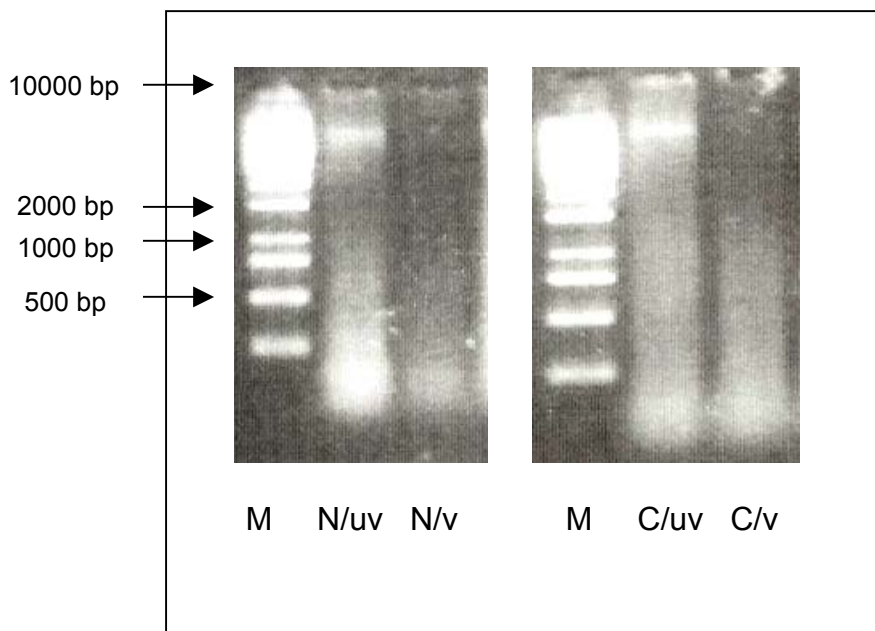


Abbildung 14: Effizienz der RsaI Restriktionsverdau.

M = Marker (1kb), N = unbehandelte KS-Zellen, C = Taxolbehandelte Zellen. Unverdaute (UV) cDNA wurde neben RsaI-verdauter (V) cDNA aufgetragen.

Unverdaute cDNA sollte im Bereich zwischen 0,5 und 10 kb, verdaute cDNA im Bereich zwischen 0,1 und 2 kb liegen. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, war der RsaI Restriktionsverdau bei beiden Proben erfolgreich, da ein Shift in der Größenverteilung nach dem Verdau zu erkennen ist.

Die durch den RsaI-Verdau entstandenen glatten Enden fungierten als Ansatzstellen für die anschließende Adaptorligation, die nur an der Tester cDNA erfolgte.

Anschließend wurden die beiden Hybridisierungsschritte, gefolgt von der PCR-Amplifikation über die adaptorspezifischen Primer, durchgeführt.

3.3.2 Analyse der Subtraktionsbanken mittels Kolonie-PCR

Die subtrahierten nested PCR-Produkte wurde in den pCR 2.1 Vektor kloniert und dieser in kompetente Bakterien transformiert.

Insgesamt wurden je 96 Bakterienklone gepickt, um sie anschließend über Kolonie-PCR zu amplifizieren. Dabei diente die Kolonie PCR der Anreicherung der klonierten cDNA über die an den Adaptoren ansetzenden Primer.

In Abbildung 15 ist exemplarisch eine Kolonie PCR einiger Klone der mit Taxol behandelten und im Vergleich dazu in Abbildung 16 unbehandelter Zellen aufgezeigt.

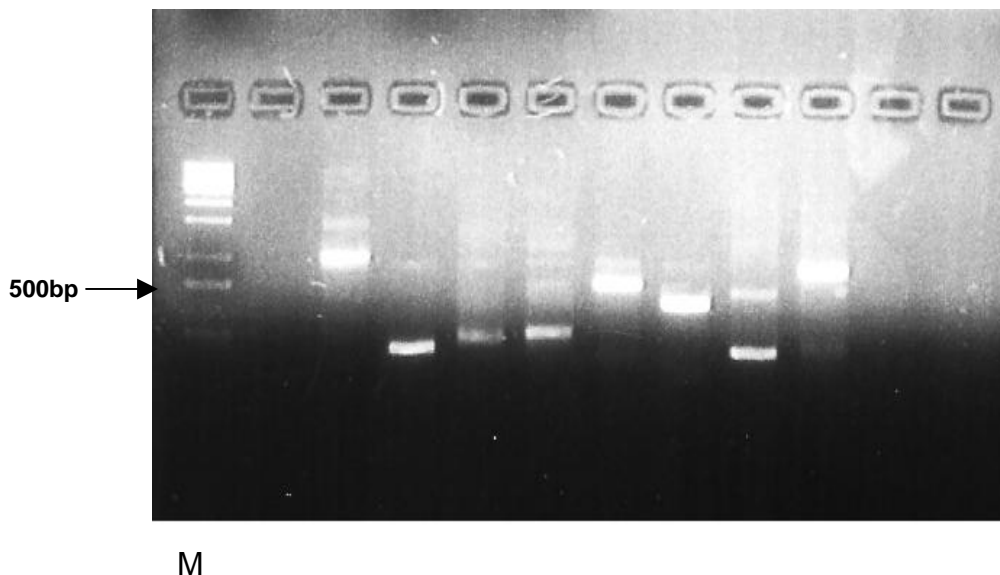


Abbildung 15: Exemplarische, mittels Kolonie PCR amplifizierte Inserts der Subtraktions cDNA Bank der mit Pacitaxel behandelten KS-Zelle.

M = Marker (1kb)

Es sind sehr variable Insertgrößen zu erkennen, dabei lagen die Größen in der Regel zwischen 100-1000 Basenpaaren.

Waren mehrere Banden zu sehen, so war dies darauf zurückzuführen, dass die gepickte Kolonie nicht nur aus einem, sondern aus zwei oder mehreren Klonen bestanden. Ein hoher Anteil an verschiedenen großen Transkripten wies darauf hin, dass durch chemotherapeutische Behandlung unterschiedliche Gene aktiviert worden waren.

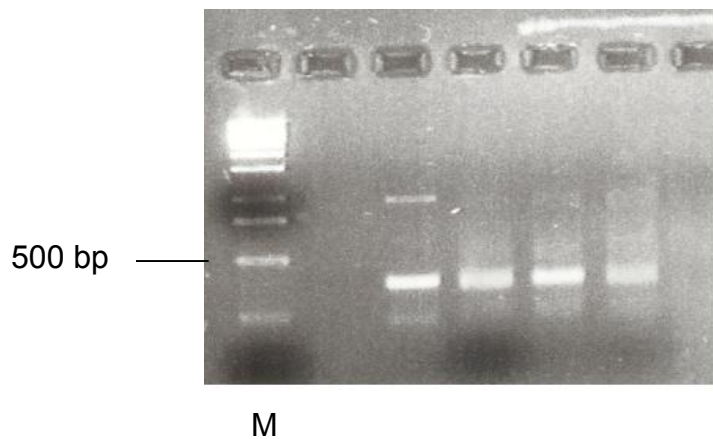


Abbildung 16: Exemplarische über Kolonie PCR amplifizierte Insert der Subtraktions cDNA Bank der unbehandelten KS-Zellen.

M = Marker (1kb)

Abbildung 16 zeigt, dass die Größe der differentiell exprimierten Transkripte in unbehandelten Zellen im Vergleich zu denen der behandelten Zellen in identischen Bereichen lag. Die Insertgrößen lagen dabei in der Regel zwischen 400 und 500 Basenpaaren. Dies deutete darauf hin, dass in der cDNA Bank keine wesentliche Heterogenität vorhanden war.

3.3.3 Hybridisierung der subtrahierten cDNA-Banken

Die einzelnen Klone aus der PCR-amplifizierten subtraktiven Hybridisierung wurden geblottet und jeweils mit behandelten und unbehandelten Zellen hybridisiert.

Abbildung 17 zeigt, wie die Auswertung der einzelnen Signale erfolgte.

















Sonde Taxol			Sonde unbehandelt	
Taxol	unbehandelt		Taxol	unbehandelt
		<u>Bestätigt</u>		
		Negativ •••••		
		Falsch positiv		
		Verkehrt positiv		

Abbildung 17: Übersicht der Auswertung bei der Array Hybridisierung

Die vier verschiedenen Interpretationsmöglichkeiten der Signale werden als bestätigt (dicke, durchgezogene Linie), negativ (gepunktete Linie), falsch positiv (hellgestrichelte Linie) und verkehrt positiv (durchgezogene, dünne Linie) bezeichnet. (weitere Erklärungen im Text)

Wie dargestellt, wurden Klone, die gleich intensive Signale aufwiesen als falsch positive Klone gewertet und ebenso wenig weiter verfolgt, wie Klone, die bei beiden Sonden ein Signal zeigten, und als negative Klone bezeichnet wurden.

Falls ein Klon der mit Taxol behandelten Zellen nach Hybridisierung mit behandelten Zellen ein eindeutig stärkeres Signal zeigte, so war dies ein bestätigt differentieller Klon. Umgekehrt wurde er als verkehrt positiver Klon gewertet und nicht weiter verfolgt. Zur Anwendung der Legende in den folgenden exemplarischen cDNA-Arrays wurden die vier möglichen Ergebnisse unterschiedlichen Linienformen zugeordnet.

Die 192 über Kolonie PCR amplifizierte Klone wurden mit den Sonden aus behandelten und unbehandelten KS-cDNA hybridisiert. Hierzu wurden die Inserts auf eine Nylonmembran aufgebracht, fixiert und anschließend die Hybridisierungsreaktion durchgeführt.

In den Abbildungen 18- 20 werden exemplarische Ausschnitte der Filme gezeigt. Es wird deutlich, dass auf den jeweils zwei zu vergleichenden Filmen eine hohe Anzahl an identischen Signalen vorkommt, die falsch positiven Ergebnissen entsprechen

und mit gelb gestrichelter Linie markiert sind. Die Zahl der falsch positiven Klone ist also sehr hoch. Mit durchgezogener, blauer Linie sind die bestätigt differentiell exprimierten Klone markiert.

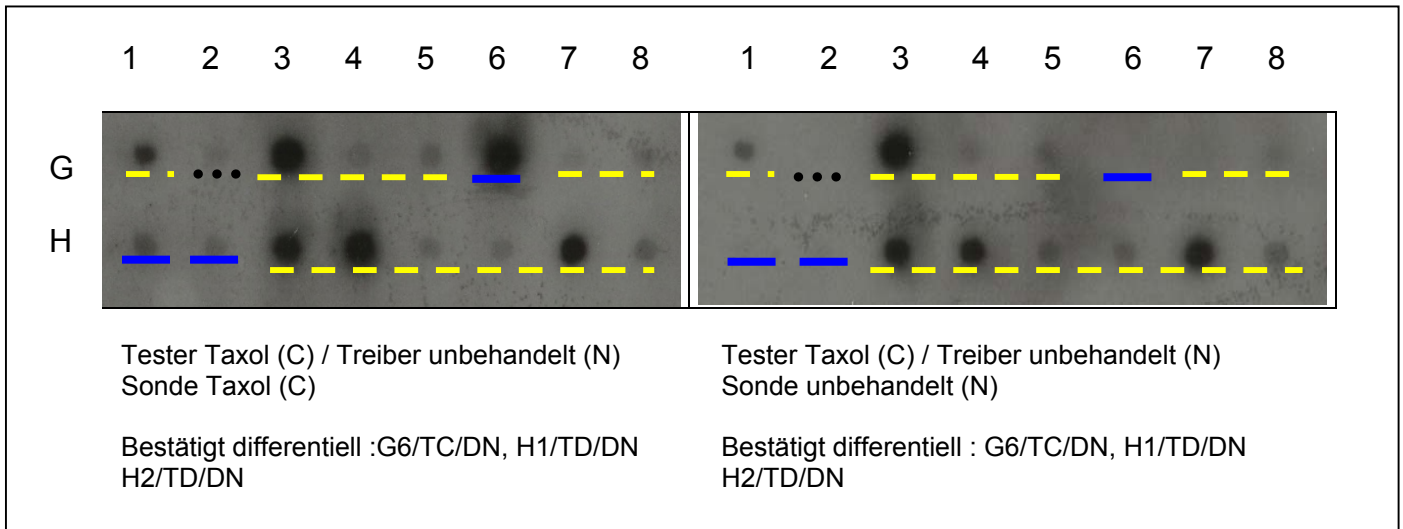


Abbildung 18: Exemplarische cDNA Arrays: Kapillarblots der Klone aus SSH (Tester: mit Taxol behandelte Zellen, Treiber: unbehandelte Zellen) wurden mit cDNA-Sonden behandelter und unbehandelter KS-Zellen hybridisiert.

Die einzelnen Signale wurden mit einem dreistelligen Code bezeichnet:

- 1.Stelle: Koordinatenposition im Kapillarblot, z.B. A1
- 2.Stelle: Verwandte Zellen für Tester-Population (T): mit Taxol behandelt (C), oder unbehandelte Zellen (N)
- 3.Stelle: Verwandte Zellen für Treiber-Population (D) : mit Taxol behandelt (C), oder unbehandelte Zellen (N)

Es wurden drei Klone als differentiell exprimiert gewertet: G6/TC/DN, H1/TD/DN, H2/TD/DN (blaue, durchgezogenen Linie)

Dass heißt, drei in der mit Taxol behandelten Population vorhandene cDNAs, bildeten nach Hybridisierung mit der Sonde aus Taxol behandelten Zellen ein Signal und galten somit als bestätigt differentiell exprimiert.

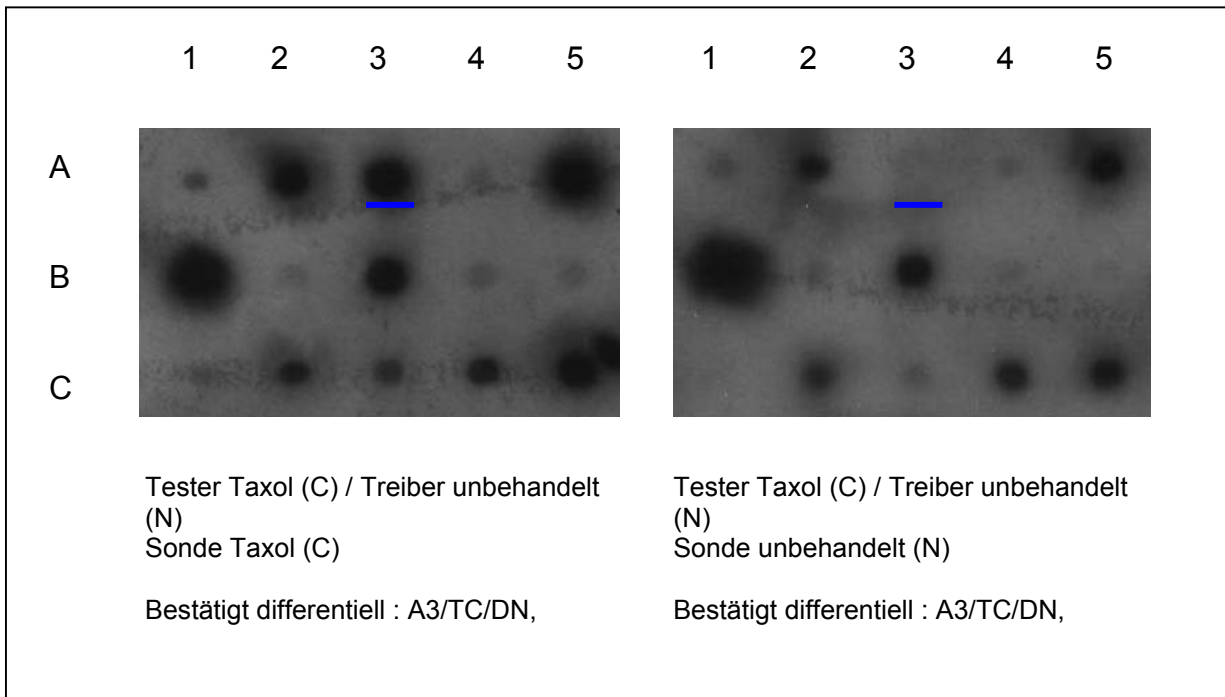


Abbildung 19: Exemplarische cDNA Arrays: Kapillarblots der Klone aus SSH (Tester: mit Taxol behandelte Zellen, Treiber: unbehandelte Zellen) wurden mit cDNA-Sonden behandelter und unbehalteter KS-Zellen hybridisiert.

Es wurde ein Klon als differentiell exprimiert gewertet: A3/TC/DN, das heißt, die nur in der mit Taxol behandelten Population vorhandene cDNA, bildete nach Hybridisierung mit der Sonde aus Taxol behandelten Zellen ein Signal, und galt somit als bestätigt differentiell.

Die übrigen Signale dieses Array-Ausschnitts wurden als falsch positiv bzw. als negativ gewertet (in dieser Abbildung nicht markiert).

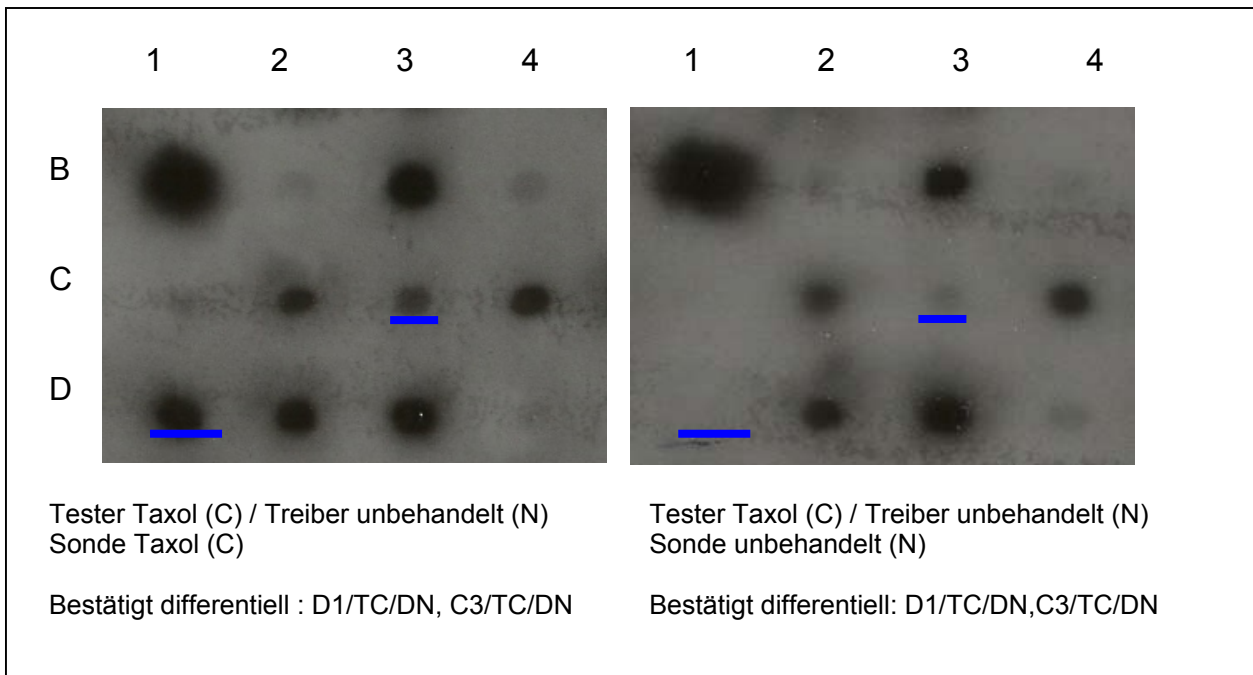


Abbildung 20: Exemplarische cDNA Arrays: Kapillarblots der Klone aus SSH (Tester: mit Taxol behandelte Zellen, Treiber: unbehandelte Zellen) wurden mit cDNA-Sonden behandelter und unbehaltener KS-Zellen hybridisiert.

Es wurden zwei Klone als differentiell exprimiert gewertet: D1/TC/DN, C3/TC/DN, das heißt, zwei nur in der mit Taxol behandelten Population vorhandenen cDNA, bildeten nur in der Hybridisierung mit der Sonde aus Taxol behandelten Zellen ein Signal und galten somit als bestätigt differentiell. Die übrigen Signale sind in dieser Abbildung nicht markiert.

3.4 Sequenzierung und Datenbankanalyse

Mit der DNA-Sequenzierung nach Sanger wurden die differentiell exprimierten Fragmente in ihrer Basensequenz lesbar gemacht und durch den Vergleich mit einer etablierten Genbibliothek bereits identifizierten Gene zugeordnet.

Die Ergebnisse der Datenbankanalysen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

<u>Fragmente</u> <u>Methode</u>	<u>SSH-</u> <u>Produkt</u>	<u>Daten mit Proteinen</u>	<u>Locus</u>	<u>mRNA (nt)</u>	<u>Bedeutung</u>
A3 SSH Tester Taxol/ Treiber unbehandelt, Sonde :Taxol	100bp	Homo sapiens hypothetical protein FLJ10276, mRNA Accession BC026322 gi:20072857		2941 bp	Unbekanntes Gen
D1 SSH Tester Taxol/ Treiber unbehandelt, Sonde :Taxol	157bp	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5), mRNA AccessionNM_000599 gi:46094066	chromosom e="2" /map="2q3 3-q36"	6316 bp	Insulin-like Growth- Faktor- binding Protein 5
G6 SSH Tester Taxol/ Treiber unbehandelt, Sonde :Taxol	500bp	Homo sapiens mRNA for H2A histone family, member Y isoform 2 variant protein. Accession AB209490 gi:62088559		10982 bp	Histon makro H2a.I

Tabelle 2: Datenbankanalysen der in SSH identifizierten differentiell exprimierten Gene

3.5 Semiquantitative PCR

Die identifizierten Gene wurden anschließend mit der Methode der semiquantitativen PCR auf Unterschiede in der Genexpression überprüft. Dies war erforderlich, um positive Ergebnisse aus der Subtraktiven Hybridisierung zu bestätigen.

Es wurde für die PCR jeweils 0,5 ng cDNA eingesetzt.

Für die Amplifikation wurden genspezifische Primer verwendet. Zum Vergleich der Proben wurde als sogenanntes House-Keeping-Gen β -Aktin verwandt.

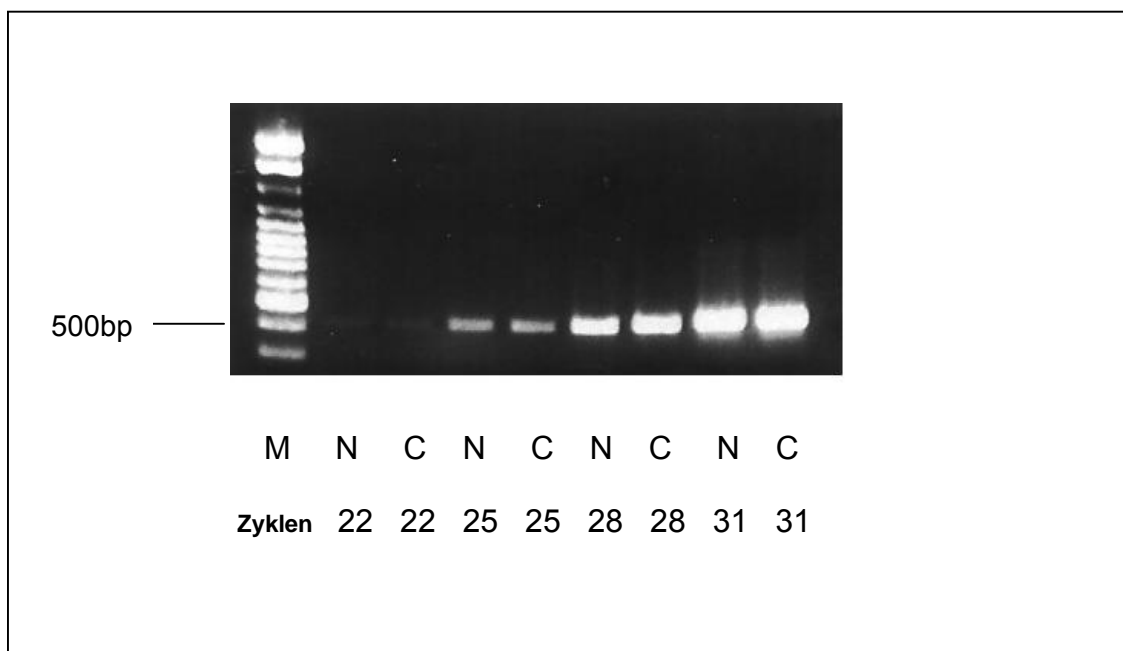


Abbildung 21: β -Aktin Kontrolle, semiquantitative PCR, unbehandelte (U) und mit Taxol behandelte (C) KS-Mammakarzinom-Zellen

In unbehandelten und mit Taxol inkubierten Zellen finden sich identische Bandenstärken von β -Aktin.

Abbildung 22 zeigt eine verstärkte Expression des Insulin-like-Growth-faktor Binding Proteins- 5 in mit Taxol behandelten KS-Zellen. Die jeweilige Bande der chemotherapeutisch behandelten Zellen (mit C beschriftet) ist stärker als die der unbehandelten Zellen. Abbildung 23 zeigt ein entsprechendes Ergebnis für die Expression von H2A- Histon bei behandelten Zellen.

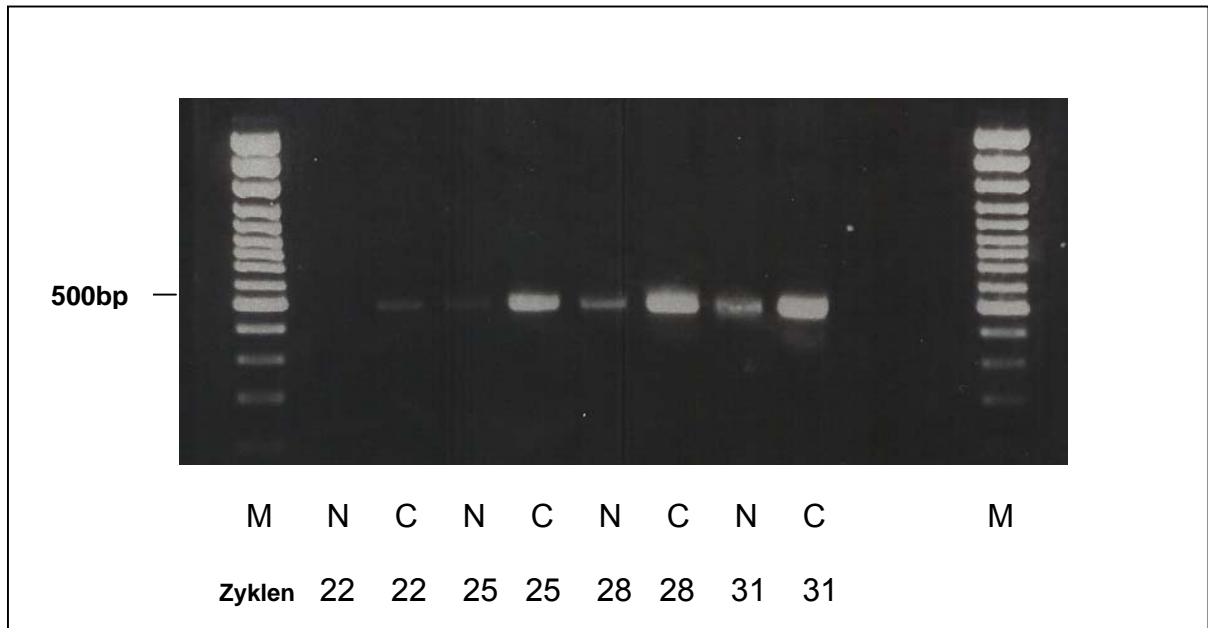


Abbildung 22: IGFBP-5-semiquantitative PCR, unbehandelte (U) und mit Taxol behandelte (C) KS-Mammakarzinom-Zellen.

Es zeigt sich bei Taxol-behandelten Zellen eine höhere Expression von IGFBP-5, als bei unbehandelten KS-Mammakarzinomzellen.

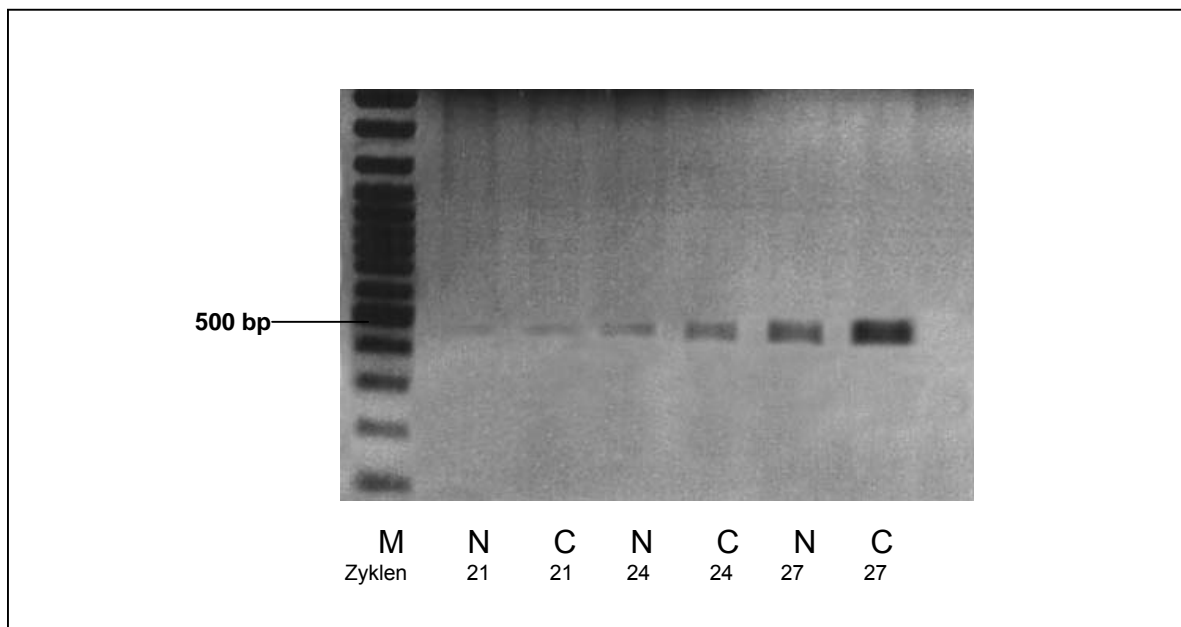


Abbildung 23: H2A Histone-semiquantitative PCR, unbehandelte (U) und mit Taxol behandelte (C) KS-Mammakarzinom-Zellen.

Es zeigt sich bei Taxol-behandelten Zellen eine höhere Expression von H2A-Histon als bei unbehandelten KS-Mammakarzinomzellen.

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mittels Differential Display und der Methode der Subtraktiven Hybridisierung die mRNA-Populationen einer Brustkrebszelllinie vor und nach chemotherapeutischer Behandlung mit Paclitaxel, einem in der gynäkologischen Onkologie verwendeten Chemotherapeutikum, verglichen.

Ziel war es, differentiell exprimierte Gene zu identifizieren, und mit deren Hilfe weitere Mechanismen des Chemotherapie induzierten Zelltodes aufzuklären.

Unter Verwendung der Methode des Differential Displays konnten keinerlei differentiell exprimierte Gene identifiziert werden.

Mit der Methode der Suppression Subtractive Hybridisierung gelang es, sechs differentiell exprimierte Gene zu ermitteln, von denen sich zwei in der semiquantitativen PCR bestätigen ließen. Hierbei handelt es sich um ein Bindungsprotein der Insulin-ähnlichen-Wachstumsfaktoren, „insulin-like-growth-factor-binding-protein-5 genannt, sowie ein Protein der Histon-Familie, das H2A histone family, memberY, isoform2.

4.1 *Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren*

In vielzelligen Organismen wird die Homöostase im Gewebewachstum durch ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose aufrechterhalten. Die Apoptose ist eine hochregulierte, spezifische Art des Zelltodes, die durch eine Anzahl von morphologischen und biochemischen Merkmalen charakterisiert wird (Wyllie *et al.*, 1980).

Dysregulation des Zellwachstums oder der Zelltodesrate kann zum Auftreten zahlreicher Krankheiten, unter anderem neurodegenerativen Krankheiten oder malignen Tumoren, führen (Thompson, 1995).

Das Insulin-like-Growth-Factor-System, im folgenden IGF-System genannt, besteht aus den Liganden IGF-I und IGF-II, ihren Rezeptoren und der Gruppe der IGF-bindenden Proteine 1-6.

IGF sind wichtige Wachstumsfaktoren und potente Stimulatoren von Zellüberleben und Wachstum (Jones & Clemmons, 1995).

Ihre Verfügbarkeit wird durch die Bindung an IGF- Bindungs Proteine beeinflusst.

Über IGF-BP-Interaktionen kann die Konzentration der IGF an ihrem Rezeptor erhöht, und somit deren Aktivität verstärkt werden. Verschiedene Mechanismen können die Affinität der IGF-BP zu IGF modulieren, zum Beispiel deren Proteolyse, Phosphorylierung und Adhärenz zu Zelloberflächenproteinen oder extrazellulärer Matrix (Nam *et al.*, 1997).

IGF-binding Proteine modulieren einerseits die Überlebenssignale der IGF, sowohl stimulatorisch als auch inhibitorisch, können aber nach neueren Erkenntnissen auch IGF unabhängig Einfluss auf Zellwachstum und -tod nehmen (Firth & Baxter, 2002).

So wurde beschrieben, dass IGFBP-5 IGF-unabhängig zu einer Aktivierung der Caspase 9 führen und so Apoptose beeinflussen kann (Cobb *et al.*, 2004). Durch Versuche mit nicht IGF-bindenden Mutanten von IGFBP-3, konnte eine IGF-unabhängige Induktion von Apoptose bewiesen werden (Perks *et al.*, 2002).

Da IGF-BP Zellfunktionen durch diverse Mechanismen regulieren, erhofft man sich von der Manipulation der IGFBP-regulierten Signalwege therapeutische Möglichkeiten bei der Bekämpfung von Tumorerkrankungen.

Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeiten, hat jedes IGF-BP eigene Charakteristiken und Funktionen.

4.1.1 IGFBP-5 und seine Rolle in der Apoptose

Bei dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach Paclitaxelinkubation verstärkt exprimierten Gen handelt es sich um das Insulin-like growth factor-Binding Protein-5, welches über lange Zeit als stimulatorisch wirkendes IGF-BP betrachtet wurde. Kürzliche Beobachtungen zeigten beispielsweise, dass es als Wachstumsfaktor auf Knochenzellen (Miyakoshi *et al.*, 2001) sowie als Promotor für Tumorstadium in verschiedenen Tiermodellen wirkt (Miyake *et al.*, 2000).

Perks *et al.* zeigten, dass IGFBP-5 in Brustkrebszelllinien deren Zellüberleben durch Apoptosereduktion erreicht, eine Funktion, die sich IGF-unabhängig vollzieht (Perks *et al.*, 2000).

Neuere Veröffentlichungen stellen jedoch insbesondere in Zusammenhang mit Brustkrebs eine proapoptotische Wirkung in den Vordergrund.

Butt *et al.* beschrieben einen inhibitorischen Effekt von Insulin- like Growth Factor-Binding Protein-5 auf humane Brustkrebszellen in vivo und in vitro (Butt *et al.*, 2003) (Butt *et al.*, 2005).

IGFBP-5 Expression führte zu einem Zellzyklusarrest in der in G2/M-Phase und Apoptoseinduktion, sowie vermehrter Expression von BAX und Verminderung der Expression des antiapoptotischen bcl-2. Bei IGFBP-5 exprimierenden Tumoren konnte ein signifikant erhöhter Spiegel von BAX mRNA und ein erniedrigter Spiegel von bcl-2 mRNA festgestellt werden, so dass dessen Rolle als Wachstumsinhibitor und proapoptotisch wirkender Modulator untermauert wird.

Tonner *et al.* zeigten, dass IGFBP-5 eine Rolle bei der Involution der weiblichen Brustdrüse spielt, ein Vorgang, der über den Mechanismus der Apoptose reguliert wird (Tonner *et al.*, 1997; Tonner *et al.*, 2000).

Flint *et al.* beschrieben hier die Rolle des IGFBP-5 als Inhibitor der Zellproliferation, die durch eine Verhinderung der Interaktion von IGF-I mit dem Rezeptor bewirkt wird (Flint *et al.*, 2000).

Die Effekte von IGFBP-5 sind also Zelltyp-spezifisch und stadienabhängig entweder proliferativ oder antiproliferativ.

In diesem Zusammenhang wurde interessanterweise gezeigt, dass die Effekte von IGFBP-5 je nach Vorhandensein von Komponenten der extrazellulären Matrix, zum Beispiel dem Vorhandensein von Fibronectin, eher proapoptotisch oder antiapoptotisch wirken (McCaig *et al.*, 2002).

In der aktuellen Literatur finden sich keine Daten, die eine Verbindung zwischen chemotherapeutischer Noxe und Induktion des IGF-Systems, insbesondere IGFBP-5 belegen. Beschrieben wurde eine Regulation des IGF-Systems insbesondere unter erhöhter Expression von IGFBP-5 nach Verabreichung von Humanem Chorion Gonadotropin an Ratten, so dass auch die Induktion durch andere chemische Substanzen denkbar ist.

Anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten ist zu postulieren, dass die Behandlung mit Paclitaxel bei Mammakarzinomzellen zur Induktion von Apoptose über IGFBP-5 einschließende Signalwege führt.

4.2 Histon-macro H2A

Histone stellen den Proteinanteil des Chromatins dar. Durch Acetylierung und Desacetylierung wird das Ablesen der Gene an der DNA, die mit ihren Windungen den Histonen aufliegt, reguliert. Diese Vorgänge werden von zwei Enzymen, Histon-Acetyltransferase und Histon-Deacetylase, ausgeführt.

Histone spielen in der Apoptose-Induktion eine Rolle. Eine Hemmung der Histon-Deacetylase und damit eine Hyperacetylierung der Histone führt in der Regel zu einer Genaktivierung und kann in Differenzierung und/oder Apoptose von Tumorzellen resultieren (Mork *et al.*, 2005). Histon-Deacetylase werden bereits in Phase I und II Studien zur Chemotherapie und Chemoprävention von Tumoren erfolgreich und mit erstaunlich wenigen Nebenwirkungen eingesetzt.

Weiterhin konnte mehrfach ein Zusammenhang zwischen aberranter Histon-Acetylierung und Krebserkrankungen belegt werden,

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für ein spezifisches Histon Protein, das macro-h2a, nach Behandlung mit Paclitaxel eine stärkere Expression nachgewiesen. Wie aufgeführt spielen Histone eine Rolle in der Genregulation und Apoptose-induktion von Tumorzellen. Auch eine Auswirkung verstärkter Expression des macro-h2a-Gens auf Apoptoseinduktion in Tumorzellen ist denkbar. In der Literatur konnten keine Daten gefunden werden, die einen Zusammenhang zwischen verstärkter Expression des macro-h2a-Gens und Chemotherapie belegen. Zukünftige Arbeiten sollten die Rolle von macro-h2a in der Rolle der Apoptoseinduktion untersuchen.

4.3 Subtraktive Hybridisierung

4.3.1 Gründe für gehäuftes Auftreten falsch positiver Befunde

Wie bei der Methode des Differential Displays lag auch bei der Subtraktiven Hybridisierung die Zahl der falsch positiven Ergebnisse nach der Dot-Blot Analyse mit ca 80% sehr hoch. Zudem konnten nur 1/3 der nach der Dot-Blot Analyse als differentiell exprimiert interpretierten Sequenzen in der semiquantitativen PCR bestätigt werden.

In vergleichbaren Studien über subtraktive Hybridisierung wurden bei Birch et al., sowie Stein et al. Anteile von 25-50% falsch positiver SH Klone gefunden, so dass das Ergebnis der vorliegenden Arbeit deutlich ungünstiger war (Birch et al., 1999, Stein et al., 1997).

Gründe für gehäuftes Auftreten falsch positiver Befunde konnten wie bei der Differential Display Methode in Kontamination mit genomischer DNA liegen.

Die insgesamt geringe Ausbeute an differentiell exprimierten Sequenzen kann bei der Subtraktiven Hybridisierung daran liegen, dass seltene, differentiell exprimierte Transkripte in zu geringem Masse angereichert werden.

Weiterhin muss als mögliche Ursache für die geringe Anzahl identifizierter differentiell exprimierter Gene nach Behandlung mit Paclitaxel in der vorliegenden Arbeit, eine fehlende oder zumindest geringe Induktion differentieller Gene diskutiert werden.

4.3.2 Einfluss der Konzentration von Paclitaxel auf apoptotische Vorgänge

Eine mögliche Erklärung für fehlende differentielle Geninduktion kann in der Inkubationszeit und Konzentration des applizierten Chemotherapeutikums liegen.

Die untersuchten Mammakarzinomzellen wurden nach 8-stündiger Behandlung mit Paclitaxel den Versuchen zugeführt. Verschiedene Autoren beschreiben eine frühe Induktion von Apoptose nach Paclitaxelbehandlung, z.B. beobachteten Allman *et al.* Induktion von Apoptose nach 8-stündiger Inkubation einer B-Lymphomzelllinie mit Paclitaxel (Allman *et al.*, 2003). Nach gleicher Zeitspanne konnten Huisman et al mittels Annexin-Labeling Apoptoseinduktion nachweisen (Huisman *et al.*, 2002).

Bei längerer Inkubation der Zellen mit Paclitaxel (>24 h) ist davon auszugehen, dass an Apoptose-Signalwegen beteiligte Gene nicht mehr in veränderter Expression nachzuweisen sind.

Die Konzentration von 7,5 µg Paclitaxel /ml, entsprechend 8,7µM (Molekulargewicht Paclitaxel 853,93 g), die in Differential Display und SSH angewandt wurde, orientiert sich an sogenannten Plasma Peak Konzentrationen, also nach Chemotherapieinfusion in vivo gemessene Plasmakonzentrationen des Medikamentes. Man geht davon aus, dass die höchste Plasmakonzentration als Noxe in stärkerem Ausmaß als die nachfolgenden abfallenden Konzentrationen Auswirkungen auf die Zelle hat und somit bei Untersuchungen vorrangig zu berücksichtigen ist.

Viele vergleichbare, neuere Studien zu Paclitaxelwirkungen arbeiten mit Konzentrationen im nanomolaren Bereich. Begründet wird dies durch die kurze Zeitspanne der hohen, im μ -molaren Bereich liegenden Konzentrationen, die deswegen von manchen Autoren als klinisch irrelevant beurteilt werden (Allman *et al.*, 2003). Blagosklonny argumentiert, dass durch Plasma Peak Konzentrationen von 5-10 μ M eventuell direkte Effekte vermittelt werden können, die nicht mit einem Mitoseblock in Verbindung stehen, zum Beispiel TNF ähnliche Effekte (Blagosklonny & Fojo, 1999).

Diese Argumentation könnte erklären, warum die Versuchskonstellation der vorliegenden Arbeit, die ja Konzentrationen im Bereich zwischen 5-10 μ M anwendet, zur Identifikation einer nur geringen Anzahl von differentiell exprimierten Genen geführt hat.

4.3.3 Mikrokernnachweis zur Optimierung der Inkubationszeit und Konzentration

Um eine geeignete Konzentrations- und Inkubationsspanne zu ermitteln wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die Apoptoseinduktion der untersuchten Zellen durch zytomorphologische Veränderung, der Bildung von Mikrokernen nachzuweisen. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen nach Färbung mit DAPI beurteilt. Die auffälligen, teils blasenartigen Zellkernveränderungen mit stark kondensiertem Chromatin waren eindeutig konzentrations- und zeitabhängig und wurden als Mikrokerne interpretiert.

Die Differenzierung mikronukleärer Zellkerne von sogenannten "apoptotischen Körpern", die im Rahmen der Apoptose durch Freisetzung von Kernfragmente, die sich mit einer Kernmembran umgeben, entstehen, kann im Einzelfall schwierig sein. Collins *et al.* zeigten, dass durch Kernfragmentierung entstehende apoptotische Körper nach Behandlung von Taxol auftreten. In diesem Stadium sind DNA-Brüche nachweisbar, die ebenfalls als Indikator für Apoptose gelten (Collins *et al.*, 1997). Dass im Rahmen des Versuchaufbaus mit einer Inkubationszeit von 8h und einer Konzentration von 9 μ M (bzw 8,7 μ M)eine Apotoseinduktion stattfindet, lässt sich, wie bereits aufgeführt, anhand vieler Studien belegen, und wurde zudem in dieser Arbeit mittels zythomorphologischer Veränderungen belegt.

4.4 Differential Display PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der *Differential Display PCR* zur Untersuchung der RNA unbehandelter und 8-stündig mit Paclitaxel inkubierter MCF-7 Mammakarzinomzellen angewandt. Nach Auftrennung der PCR-Produkte zeigte die Intensität der Banden korrespondierender Primerpaare die konstante bzw. differentielle Expression des entsprechenden Genes an.

4 PCR-Amplifikate wurde als differentiell eingestuft und mit den entsprechenden Primer-Paaren reamplifiziert.

Anhand von Sequenzanalysen der klonierten Fragmente sollte eine Auswahl für die notwendige Bestätigung der differentiellen Expression mit der sich anschließenden Northern-Blot-Analyse getroffen werden. Die zu den Differential Display Fragmenten korrespondierenden cDNAs wiesen ausschließlich Homologien zu ribosomalen RNA-Sequenzen auf, so dass keine Northern-Analysen angeschlossen wurden.

4.4.1 Gründe für gehäuftes Auftreten falsch positiver Befunde

Für die Tatsache, dass sich in der vorliegenden Arbeit mit der Methode des Differential Displays keine verwertbaren Resultate erzielen liessen, sind verschiedene Erklärungen zu diskutieren.

Prinzipiell ist die Methode für die Analyse der differentiellen Genexpression bei humanen Mammakarzinomzellen geeignet. Dies konnten verschiedene Studien belegen (N.Maass 2000).

Nagel et al. geben an, dass es sich bei der Analyse falsch positiver Ergebnisse im Differential Display in der Mehrzahl um ribosomale Gene handelt (Nagel *et al.*, 2001). Auch in der vorliegenden Arbeit waren die zunächst als differentiell reguliert beurteilten PCR-Amplifikate als ribosomale. Sequenzen, und somit als falsch positive Ergebnisse einzustufen.

Generell stellt das Auftreten falsch positiver Banden das größte Problem der Methode des Differential Displays dar, dementsprechend zeitintensiv ist die

Identifikation der richtig positiven Fragmente, wodurch der Vorteil des initial geringen Aufwandes relativiert wird.

Zur Reduktion der falsch positiven Ergebnisse wurde der bereits aufgeführte Doppelansatz in der DD-PCR durchgeführt (Kapitel 3.2.2).

Mögliche Fehlerquelle für die trotzdem auftretenden falsch positiven Resultate war, wie bereits in Abschnitt 4.3.1 erläutert, eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA, die auch durch Behandlung mit DNase nicht komplett verhindert werden kann.

Miele *et al* geben als Erklärung für falsch positive Ergebnisse die Amplifikation von cDNA an, die mit der gesuchten cDNA im DD-Gel auftaucht, aber nicht das ursprünglich selektierte Transkript repräsentiert (Miele *et al.*, 1998).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit könnte die sein, dass seltene Transkripte nicht amplifiziert und identifiziert werden konnten. Die zu diesen Genen korrespondierenden Fragmente blieben im Vergleich zu abundanten Genen im Polyacrylamidgel unsichtbar bzw. wurden von Fragmenten gleicher Größe überdeckt. Die Anzahl der eingesetzten Primerkombinationen war möglicherweise nicht ausreichend um das gesamte Spektrum induzierter Gene, insbesondere seltene Gene, zu identifizieren.

Es existieren diverse Optimierungsvorschläge der Methode des Differential Displays, die die Reproduzierbarkeit erhöhen und die Zahl der falsch positiven Ergebnisse verringern sollen. Diese sind nach Veröffentlichung der Originalmethode 1992, auch von Seiten der Originalautoren, vorgestellt worden. So wurde das Primer-Design verändert oder die Verarbeitung und Analyse der Banden optimiert. Eine Weiterentwicklung der Methode ist die sogenannte Enhanced DD-PCR, die eine Zweischnitt PCR-Amplifikation mit hohen Annealingtemperaturen beinhaltet (Linskens *et al.*, 1995).

5. Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist mit über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr weltweit die häufigste bösartige Tumorerkrankung der Frau.

Die chemotherapeutische Behandlung des Mammakarzinoms stellt ein langjährig angewandtes Verfahren dar, das durch klinische und experimentelle Forschung stetigem Wandel unterlegen ist.

Paclitaxel, ein Vertreter der Taxane, ist eine der vielversprechendsten Antitumorsubstanzen in der gynäkologischen Onkologie.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, differentiell exprimierte Gene zwischen unbehandelten und chemotherapeutisch behandelten Mammakarzinom-Zelllinien zu finden. Mittels solcher Daten lassen sich neue Erkenntnisse über Wirkungsweisen von Chemotherapeutika gewinnen, z.B. über deren Einbindung in die Apoptoseinduktion, die eine wichtige Rolle im Chemotherapie-induzierten Zelltod spielt. Diese Erkenntnisse können in vielerlei Hinsicht relevant sein. Es ließen sich zum Beispiel neue Kombinationstherapien entwickeln, die sich dann auch bezüglich ihrer molekularbiologischen Wirkungsweisen ergänzen.

Durch den Vergleich der Genexpression mit dem Verfahren des Differential Display und der Subtraktiven Hybridisierung gelang es, als differentiell exprimiertes Gen, das Insulin-like Growth Factor Binding Protein-5 (IGFBP-5) zu identifizieren. Der Expressionsunterschied wurde durch ein Southern-Blot Verfahren und semiquantitative PCR verifiziert.

Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren gehören zu den vorherrschendsten Wachstumsfaktoren des Körpers. Sie sind potente Stimulatoren von Zellüberleben und Wachstum. IGFBP-5, als eines ihrer Bindungs-Proteine ist mit pro-apoptotischer Wirkung in Zusammenhang gebracht worden. Der Expressionsunterschied von IGFBP-5 nach Behandlung mit Paclitaxel lässt die Interpretation zu, dass das Chemotherapeutikum bei Mammakarzinomzellen zur Apoptose-Induktion führt und hierbei IGFBP-5 beeinflusste Signalwege eine Rolle spielen.

6. Anhang

6.1 Vollständige cDNA-Sequenz von IGFBP-5

Das IGFBP-5-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 2 (2q31-2q24) lokalisiert und besitzt eine Größe von 33kb. Die Anzahl der Exons beträgt 4.

Im folgenden Abschnitt ist das PCR Produkt der Subtraktiven Hybridisierung mit Primerbindungsstellen der nestet Primer dargestellt (mit Balken hinterlegt), das zur Identifizierung von IGFBP-5 geführt hat.

GAATTCGCCCTT **TCGAGCGGCCCGCCGGCAGGT** ACTTAAGGAAATAAAAAACCAACAAAGGATCTC
 ACATTTTCTTAAAAAGTGAAGATTGCTGTATACTATTTATTCAACTTATAATTTATGTTACTCCTTG
 ATCTTTGTCTTTTGTTCATGACAAAGCATTATTTAATAAAGTTATGCATTTCAGTTAAAAAAAAAAAA
 AA **ACCTCGGCCGCGACCACGC** TA
 AGGCGAATTC

Nested PCR Primer1	TCG AGC GGC CGC CCG GGC AGGT
Nested PCR Primer2R	TCG GTG GTC GCG GCC GAG GT

Vollständige cDNA-Sequenz des Insulin-like Growth Faktor Binding Protein-5

```

1 tagtctcttt ggaaacttct gcaggggaaa agagctagga aagagctgca aagcagtgtg
61 ggctttttcc cttttttgct ccttttccatt acccctcctc cgttttcacc cttctccgga
121 cttcgcgtag aacctgcgaa tttcgaagag gaggtggcaa agtgggagaa aagaggtggt
181 agggtttggg gtttttttgt ttttgttttt gttttttaat ttcttgattt caacattttc
241 tcccaccctc tcggctgcag ccaacgcctc ttacctgttc tgcggcgccg cgcaccgctg
301 gcagctgagg gttagaaagc ggggtgtatt ttagatttta agcaaaaatt ttaaagataa
361 atccatthtt ctctcccacc cccaacgcca tctccactgc atccgatctc attatthtcg
421 tggttgcttg ggggtgaaca atthttgtggc tttttttccc ctataattct gaccgcgctca
481 ggcttgaggg tttctccggc ctccgctcac tgcgtgcacc tggcgctgcc ctgcttcccc
541 caacctgttg caaggcttta attcttgcaa ctgggacctg ctgcgaggca cccagaccct
601 ccacctctct ctacatthtt gcaagtgtct gggggagggc acctgctcta cctgccagaa
661 atthttaaac aaaaacaaaa acaaaaaaat ctccgggggc cctcttgccc cthttatccc
721 tgcactctcg ctctcctgcc ccaccccgag gtaaaggggg cgactaagag aagatggtgt
781 tgctcaccgc ggtcctcctg ctgctggccg cctatgcggg gccggcccag agcctgggct
841 ccttcgtgca ctgcgagccc tgcgacgaga aagccctctc catgtgcccc cccagcccc
901 tgggctgcca gctggtcaag gagccgggct gcggctgctg catgacctgc gccctggccc
961 aggggcagtc gtgcggcgtc tacaccgagc gctgcgccc ggggctgcgc tgcctcccc
1021 ggcaggacga ggagaagccg ctgcacgccc tgcgtgcacgg ccgcgggggt tgcctcaacg
1081 aaaagagcta ccgcgagcaa gtcaagatcg agagagactc ccgtgagcac gaggagccca
1141 ccacctctga gatggccgag gagacctact ccccaagat cttccggccc aaacacacc
1201 gcatctccga gctgaaggct gaagcagtga agaaggaccg cagaaagaag ctgaccagct

```

1261 ccaagtttgt cgggggagcc gagaacactg cccacccccg gatcatctct gcacctgaga
1321 tgagacagga gtctgagcag ggcccctgcc gcagacacat ggaggcttcc ctgcaggagc
1381 tcaaagccag cccacgcatg gtgccccgtg ctgtgtacct gcccaattgt gaccgcaaa
1441 gattctacaa gagaaagcag tgcaaacctt cccgtggccg caaacgtggc atctgctggt
1501 gcgtggacaa gtacgggatg aagctgccag gcatggagta cgttgacggg gactttcagt
1561 gccacacctt cgacagcagc aacgttgagt gatgcgtccc cccccaacct ttccctcacc
1621 ccctcccacc cccagccccg actccagcca gcgcctccct ccaccccagg acgccactca
1681 tttcatctca ttttaaggaa aatatatat ctatctattt gaggaaactg aggacctcgg
1741 aatctctagc aagggctcaa cttcgaaaaat ggcaacaaca gagatgcaa aagctaaaaa
1801 gagaccccc ccctttaaact ggttttcttt ttgaggcaag ttggtagaac agagaagggg
1861 agagaggaag aacgagagga agagaagggg aggaagtgtt tgtgtagaag agagagaaag
1921 acgaatagag ttaggaaaag gaagacaagc aggtgggagc gaaggacatg caccgagacc
1981 aggcaggggc ccaactttca cgtccagccc tggcctgggg tggggagagg tgggcgctag
2041 aagatgcagc ccaggatgtg gcaatcaatg acactattgg ggtttcccag gatggattgg
2101 tcagggggag aaaggaaaag gcaaaacact ccaggacctc tcccggatct gtctcctcct
2161 ctagccagca gtatggacag ctggaccctc gaacttcctc tcctcttacc tgggcagagt
2221 gttgtctctc cccaaattta taaaaactaa aatgcattcc attcctctga aagcaaaaca
2281 aattcataat tgagtgatat taaatagaga ggttttcgga agcagatctg tgaatatgaa
2341 atacatgtgc atatttcatt ccccaggcag acatttttta gaaatcaata catgcccaca
2401 tattggaaag acttgttctt ccacggtgac tacagtacat gctgaagcgt gccggttcag
2461 ccctcattta attcaatttg taagtagcgc agcagcctct gtgggggagg ataggctgaa
2521 aaaaaaaagt gggctcgtat ttatctacag gactccatat agtcatatat aggcataata
2581 atctattctt tttctttggt tttttctttc ttctttctt tcaaagggtt gcattaactt
2641 ttcaaagtag ttctataggg ggcattgagg agcttcctca ttctgggaaa actgagaaaa
2701 cccatattct cctaatacaa ccogtaatag catttttgcc tgctcgagg cagagtttcc
2761 cgtgagcaat aaactcagct tttttgtggg gcacagtact ggatttgaca gtgattcccc
2821 acgtgtgttc atctgcacc accgagccag gcagaggcca gccctccgtg gtgcacacag
2881 caccgctctc agtccatccc attttagctc ttaaaccctc aggaagtcaac cctctccgga
2941 caccacacca catgagccca acaggctcac gatggatcca ccagtcccac ccagccttt
3001 tcctttcacc tgaacagaat gtgcattttt ggaagcctcc ctactctcc atgctggcag
3061 agcaggaggg agactgaagt aagagatggc agaggggagat ggtggcaaaa aggttttagat
3121 gcaggagAAC agtaagatgg atggttccgg ccagagtcga tgtggggagg aacagagggc
3181 tgaagggaga gggggctgac tgttccattc tagctttggc acaaagcagc agaaaggggg
3241 aaaagccaat agaaatttcc ttagcttccc caccatatgt attttctagg atttgagagg
3301 aaagagagga aatgggggga atggggtgca aatagaaat gagcttaac caggccgcag
3361 agccagggaa ggtgagtaac tttaggaggg tgctagactt tagaagccag ataggaagaa
3421 tcagtctaaa ctggccatgc tttggaaggg acaagactat gtgctccgct gccaccttc
3481 agcctgcaat gagggactga ggcccacgag tctttccagc tcttcccca ttctggccag
3541 tccctgcacc ctccctgggg tggaggatgg aaggaaagct gggacaagca gggaaacgcat
3601 gattcagggg tgctgtcaact cggcagccag attccgaaac tcccattctc caatgacttc
3661 ctcaaccaat ggggtggcctt gtgactgttc ttttaaggctg aagatatcca ggaaaggggg
3721 cttggacact ggccaaggag accccttctg gctgtggaca cagctctctt cactctttgc
3781 tcatggcatg acacagcggg gaccgctccc aacaacgaat ttggggctac gaagaggaat
3841 agcgaaaaag caaatctggt tcaactgatg ggaaccctat agctatagaa cttgggggct
3901 atctcctatg cccctggaca ggacagtgtg ctggggacag gagaagtgtc caatctcat
3961 gatcaaaagg gggccgatag ggccagcagc cacaaggcct tgacctgccc agtcagcatg
4021 ccccatctct ctgcacagct gtcccctaaa **cccaactcac gtttctgtat gtcttaggcc**
4081 agtatcccaa acctcttcca cgtcactggt ctttccacc attctccctt tgcactctga
4141 gcagttatcc aactaggatc tgccaagtgg atactggggg gccactcccc tgagaaaaaga
4201 ctgagccagg aactacaagc tccccccaca ttctccag cctggacctc attcttgaga
4261 ggggctctct cttcacggac tgtgtctgga ctttgagcag gcttctgccc cttgctgttg
4321 ctctttgctg ccagccatca ggtgggggat tagagcctgg tgtaagtgcg ccagactctt
4381 cgggtttcca aagttcgtgc ctgccaagc aaacctgtga gtctctctg catgcaggag
4441 tttctcctgg gcagctggtc actcccaga gaagctgggc cttcatggac acatggaact
4501 aagcctccca aatgggagtt ctggctgagc ccaggggtggg gagatcctgg **gaagggaggc**
4561 **actggaggaa gacggcac** cttcccccat ggcaggggtg gaggggaggca ggtttggaat
4621 ggtgcgagta tggcaatcta agcaggggtc tgggtctctt gactccaggc tggcctttgg
4681 ccgactgtct gctcaccag agaccttggc ctccggacta tccatggctc cgaatctaag
4741 tgctgcccac tcccatgctc acaccacag aaggtcttcc catcccctt agattcgtgc
4801 ctactccac cagtgaggaa gatgctctg tctttcccac gactgccagg agatagggaa
4861 gccagccag gactgacct ccttctcca gctgcccctg acccactgg caaagcaggg
4921 cacatgggga ggaagagact ggaaccttc tttgacagcc aggcctagac agacaggcct
4981 ggggacactg gcccctagag gggaggaagg caggcgcacg aggtccaggg aggcctttt

```

5041 ctgatcatgc cccttctctc ccaccccatc tccccaccac cacctctgtg gcctccatgg
5101 tacccccaca gggctggcct cccctagagg gtgggcctca accacctgct cccgccacgc
5161 accggttagt gagacagggc tgccacggca accgccaaagc cccctcaag gtgggacagt
5221 accccggacc catccactca ctctgagag ggctccggcc cagaatggga acctcagaga
5281 agagctctaa ggagaagaaa ccccatagcg tcagagagga tatgtctggc ttccaagaga
5341 aaggaggctc cgttttgcaa agtggaggag ggacgagggga caggggtttc accagccagc
5401 aacctggggc ttgtactgtc tgtgttttta aaaccactaa agtgcaagaa ttacattgca
5461 ctgtttctcc actttttatt ttctcttagg cttttgtttc tatttcaaac atactttctt
5521 ggttttctaa tggagtatat agtttagtca tttcacagac tctggcctcc tctcctgaaa
5581 tccttttggg tggggaaagg gaaggtgggg aggggtccgag ggggaagggga cccagcttc
5641 cctgtgcccg ctcacccac tccaccagtc cccggtcgcc agccggagtc tcctctctac
5701 cgccactgtc acaccgtagc ccacatggat agcacagtgtg tcagacaaga ttccttcaga
5761 ttccgagttg cctaccgggtt gttttcgttg ttgttgttgt tgtttttctt tttctttttt
5821 tttttgaaga cagcaataac cacagtacat attactgtag ttctctatag ttttacatac
5881 attcatacca taactctgtt ctctctctt ttttgtttc aactttaaaa acaaaaaataa
5941 acgatgataa tctttactgg tgaaaaggat ggaaaaataa atcaacaaat gcaaccagtt
6001 tgtgagaaaa aaaaaaaaaa gccgaaaaaa aaaaaaaaaa cacctgaatg cggaaagagc
6061 cggctcccgt ttagcatttt gtacttaagg aaataaaaaa ccaacaaagg atctcacatt
6121 ttcttaaaaa gtgaagattg ctgtatacta tttattcaac ttataattta tgttactcct
6181 tgatctttgt cttttgtcat gacaaagcat ttatttaata aagttatgca ttcagttaaa
6241 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
6301 aaaaaaaaaa aaaaaa

```

Abbildung 24:cDNA-Sequenz von IGFBP-5

Darstellung der cDNA Sequenz von IGFBP-5.

Das ursprüngliche RDA-PCR-Produkt ist fett dargestellt. Die Positionen der Amplifikationsprimer für die genspezifische PCR sind unterstrichen.

6.2 Vollständige cDNA Sequenz von H2A Histon Protein

Im folgenden Abschnitt ist das PCR Produkt der Subtraktiven Hybridisierung mit Primerbindungsstellen der nestet Primer dargestellt, das zur Identifizierung von H2A Histon geführt hat.

GAATTCGCCCTT **AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT** ACCCCACCTTCAGTTTAAAAGA
 AAAAAAATCCCCTTCACTCCTACTGGGAGGTGGGACCCCTTTCATTTTCAGTT
 TTGCTCATCTAGGGAAAATAAGGCTTTGTTTTCCAGTTTAATTGTTTTTACCTT
 CTA AAATGTTTTTATGTTAGCACTGATAGTTGGCATTACTGTTGTTAAGCACTGT
 GTTCCAGACCGTGTCTGACTTAGTGTAACCTAGGAGATTTTATAGTTTTATTTTA
 ATGAAACCCTGATTGACGCACAGCAGTGGGGAGAACAGCGTCTTTTACCTGTC
 ACCGAAGCCAGGAAGCCCGTTTGTAAAGCGTGTGTTGTGGTGCTTTATTGT **AC**
CTGCCCGGGCGGCCGCTCGA AAGGGCGAATTC (411bp)

Unterstrichen dargestellt ist die multiple cloning site des pCRII-Topo-Vektors.
 Mit Grauen Balken hinterlegt nested primer 1 und 2.

Nested PCR Primer1	TCG AGC GGC CGC CCG GGC AGGT
Nested PCR Primer2R	TCG GTG GTC GCG GCC GAG GT

ORIGIN

```

1  cttttgcttg  cccacaaaac  tttcatctta  atgtaacaca  tttctattct  attttttagt
61  tctgcaacaa  aaataatgta  tataaatbbc  aattttgaaa  aagtgttttt  tgacttttat
121  aaaagcatta  agtagtagat  tctacaagat  tggatagtta  gcacatttat  taataatata
181  caattgatca  aactgacaaa  tgcattacaa  attctaataa  ctgttaagga  aaaggtaaaa
241  ttttattgga  aaaacatctt  gtaatgggct  ggggtggattt  tttcccccta  actagttcag
301  gtatcctcag  atgaatatta  cttattgctt  aaatgaaaca  gggccttagca  tcctatTTTT
361  atatatttct  aggtatgaat  gtctggaaaa  tcttgttcac  taaaaaaaaat  tgaaatggaa
421  agggttttgt  tatagcaaca  tcattcagtc  ctctgaactc  tttgatatat  gccaacaata
481  catagtgtaa  tctcatcaat  ttgttttaat  aaacatttta  gaatagtgtt  agatttcat
541  agcgttacaa  agatagtaca  gagagtctct  gaataccct  caccagttt  cccattggt
601  aacatctcac  ataaccgtgg  tacacatggt  cacaacaagg  aaatcaaac  tgggccatta
661  ctgttaactt  caccagtcta  tttctggaag  atctatcagc  tgtaactca  attaggtatt
721  gcttcagttt  tgttgaaagc  acaggattaa  aaacacctga  cttgtgaaag  tctgttatgc
781  agcctttcct  attcctggct  cctgaaaagt  atatcaaaaa  gggccttact  aagatttacc
841  atataattgt  tgattatacc  tgtttctctt  tcaactcatca  aatgttaaac  actcagtagg
901  aaaatcaaaa  tagtgataat  ttgtaatgta  tatttgccag  tactataatt  cttgataaag
961  tgctttttct  cttacttata  gcataacctt  ggaacttgag  atttagctca  ctaaatttag
1021  aaaaaatggt  tgccatataa  cctaattgct  aaagcagccc  ttattgttaa  aagccattag
1081  caaaagtaga  ccttactttt  cattgtaagt  aaaaaatggt  aatatgctcc  tgtaaatgaa
  
```


1141 tttgaatcct aaataggcaa atggatagga cacaggcctt gccagagtt tattcagatt
1201 taticctcag gaaagcatgg ccactctgtaa tatttctcac cccttctttc tggattttct
1261 cccactagac cctccctcag gagtgaagta ctttttatta ataatttggg gaagggaaaag
1321 gtgaagtgtc taaatgaaaa ccaatgttgt tctcactatc cttactctac aatttatttg
1381 aatgcagaaa atctccaaat tagccaaagt atccatttct aatacaggct ttgtccttaa
1441 tagaaataty ccaaaaacac gcatccctac tcccacagtg gtgtgccata ttagtattta
1501 ctctgggaag tgggaggagg gtatgtatga aaggagctct ggcgtggcac cttgaccaca
1561 ggtgtacttc ttacggcaga tcagtgttag gaaaatgtta ggaagtagag gatcggaaaag
1621 ttgttttctt aaactctcca tgtcatgtac ctctctcaga agttccttgg gaactccagg
1681 gcatacaat ttcagtctta ataagtctga ggaagaagct gaagaccaag ccaagaacca
1741 tgggtcaagg ggtctgcagg gagacagatg gttcatcaca gccaccacat gcgtccttct
1801 ctaacactgg ctttaaggaa ggaaggggtg aagcagctct gaccttctgg agtcaggaag
1861 gttagagggt tatagtcctt agtcggcttt ttgagaatta gtgacctaga acagtttttc
1921 ttcttaagct tgaatagtat tacagacatc tagaaaggaa agacacttaa agatccttaa
1981 ttaagagaca tttacttggg ctgaatttat gaaaatgggt ctattctaaa tgatcactgt
2041 aaagtgaagt tttaccttta agtggctggg ttttttttac gatcataaag tgattaacat
2101 ataacttaac aactccaca gaactcttgt acctcaaat gactctgagc tcccccttgg
2161 agaaacgctg agaactgggt gtggtttagt ttctgtttc cccttgggtg ttatgggtga
2221 ggcttgggag ctgcctctct attaggatgc ctgtgtctgt gtggccaca ttctgaccct
2281 tccgtctgtg caagaagaag caggggtgag tcagtaaggc agccagcgc gacagcaaa
2341 ccgagggcac acctgccgac ggcttcacag tctctccac caagagcctc ttcttggcc
2401 agaaggtagg cagatgcgag gcctcagctc actcaggggc cccaagggac aggtgggcac
2461 aggtacttc cactggaagg ctggggggat cccgggggac actcccagcc tcgtgggtag
2521 acagagtggg ctgtgagctt tgggagtggc ctcagggagg gctagatgct ggggaggcca
2581 caatgctgag ggaggacctt ggcagctggg gaagggagac agtggtaaaa aagaagaggg
2641 caggcagctc ctgtgggaga tggggacctt tggtagtctt ggaggaggag ctgcttctgt
2701 ggggaaact ggtcatcaga tagcaccagc cagggaaatca ggcagaagt aagccttggg
2761 ggtgaaaggt gaacaaccta gccggcagcc tggctgtcct ggggggact aacgttagag
2821 cctcaggtct gattcagggc tctacagggg attgttttca gactgtactg atgggtgcac
2881 tgggtttctt cactgaacca ccagatgact cttccagcta attgtttgtt tgttttaacc
2941 atgggcaata tattttcagc cgccccagtg atgcaacttt gccaggacgc catggttttg
3001 taaaagacaa ttcactttta ttgaaaataa aaatgatgca aaggctttta agacctgaga
3061 atgagagtta actaatatatt ctttattgac atcaaaaagg ggtgggaaga aagaattaaa
3121 ctcttcttaa ttttttaatc ctatacttaa agaattaaag gaatgaattt gacgttcaa
3181 gttaatctgt gtttagtttg agtgtggtaa caaacttggg tctgaagctg catcattttt
3241 aaacctcac tgtcaatttc ttttgcac caagtgacag gttccctcgc tcacgtcatt
3301 gcaagttctc ctccctcccc tttccctctt tctgtcacta attgactctc ctctcatgat
3361 gcaattcctg tgggtggactc tgtgttccag aaaataacca ttactgttta catttttaac
3421 cattctttgt attttgtatg catttttcaa aagaaaaagt agcactagtt gtcatcttaa
3481 ggtctgggga tttgaaagtt tttgttttaa aatatttttt gttcctttta aaatttcgac
3541 tcagcagtgag agacaactgc ctgggtctac tttcaccctt gtaacatatt ccttgggtaa
3601 tgtattgaaa gttaacgtga cccatccaca ttacttccat ttgaaataca gagcagttca
3661 gcccttgggg tcaccttctc cctcttttcc cactctgccc cttaggcact cccaccctgg
3721 cctctcccc gcctatgttc ttgttacctc ctgcccagcca ctccaaaggc agcctcagat
3781 cagaattcct catactccc ttgtcagatg aactaaaata ttccaaaggc agcagcaaat
3841 atggctgtaa aaatgtccat gcaaaatgca gatgcccttc ttgtgtctgt gatcttctga
3901 aagaaatggg atcacggcct cctctgggct ctgtttgtta gccctggagg ggaggggggca
3961 aacaccacag acatcttget agcttctccc aagagccagg aacatgtcag ctctcagcaa
4021 ctcaactctt ctttttcaga tacatctggg ctcagggcca ggcatcacac gaataaaaaat
4081 aaagtacagt agagtaaaat tttggcta ataatgactgt ccctactcag agttggtagg
4141 gtgaggatac aaaaagccat agaaaagtat tgatactcta taataaatta caaacatctc
4201 atttaagtgt atttttaaaa atggagaatg aaagcagtg acttagctta acagtgaat
4261 taatgtgctt atcttgactt ttggaaggaa aatttgaaag gaatggtaa gctgccacc
4321 agtataaaat ggtcagccat aagaggggct gaatgtagac ccagacagac cacctagcct
4381 tctttcccat atcaccctct ttttagtggg gaaaacaaaa caccaggcta ccaagaaact
4441 gcccttctctg tttaatgtgc ttgtgacttt atgatccaag agtcacatat ccaggaagag
4501 gtacccaaaa atctagtget gcagacactg ttttagcagaa taaactccat gtttccaaaa
4561 taaagcagca tcttaagtca gcctaagcac cagtgttaga aactagggtt ccaactgccc
4621 tttctggaat cctacacccc tgcagcatga gacggagtga gcattgatac attagagcat
4681 tttttgaag cattactttc tggcttttta ttggctatta ctgtcaggtg aaaatcatgg
4741 catatagtgt aaaaaaggca aaaatcatga aactaacaca cagtttttac aaaaagcaca
4801 tttaaaatat tatagacatt aattttgact tggattttag gaaatgtttc aaaaggggta
4861 ctttagaatg gtgactatat ggtaccctgt gtcctatgaa tctcattttt ctatctgtga

4921 cactgaaacc agtgcttgaa gattgcaagc aagctggggg ggagaaaggt gatattgtgc
4981 atgctacagc cctgtaaggg atgggttgcta agctactcag gaagcatggc ccaggcttag
5041 gagcctgacc attgatgtta atgatgtatt tcacatactg aagtctcagg agtcatcata
5101 gccattactc tctgattttg cccaatgttc acacacattg ttgaattggt ttaaaaaaga
5161 aatcagtgct gtgaatctga gtcaactaaa tgcttttgct ttgtgttcag ccaagatttg
5221 cagccttttt tcagaggttt taaaattttc agaaaaaaca tttctaagt gtctaagtgt
5281 tcagtggtaa cactgactta atggtaaagt gtaaagtatt taagtttctc tgtcagagtc
5341 agtattattt gaaggagtta ggaaggcagt ctgaggctgt gatgagtctc cttacctccc
5401 aaatgatcaa gatggcaacc ccagctcgca agccattcaa ggcgggcata acgtaccatg
5461 ggttttctcc ctttgatcca catacccttc tcccgggagc tggaaagact gtgaggagaa
5521 agggagctct tgaagttgaa gcatcagtga ggagaaaaac cattcacccc tccccccac
5581 tatggctgag gactggcttc tgagacagtt taggaaactg acaaagccat gaaggaatgg
5641 ctcagctatc gaccatctgg acatccagca gtatctatcc atgtccttat ctttgtgggg
5701 ctctttctag ctggacacac tagattctgc ccggcccaag gcctctggag aaatccagct
5761 tgggcatgca tgcattgcagg gagagccaca cagcacagct gtgagggcag gagccagccc
5821 tggagtgtgc cccagggag acacagctct caggaggaga ctggaaaggg tcttatggaa
5881 gacattgccc tccccattcc cctcgttgaa gtgaactttg gggacaggaa aataactgca
5941 ttttaggtgg tcagccaggc ttccttctct atctgttatg agaaaatgag agacacaaa
6001 atctgacagt tacaggctag atttaacata ctactcaggc actatcttta acagccactt
6061 tcattaacta aaattgggtt tctaatacata tttttttaa agaaccaaga aggaatgtac
6121 tatttctctg agccaagtag gtcaggtcag gcagctctgca tgtccatcca gacactcctt
6181 ccctgtcacc atcgacagac cgcctcctgc cctgcctcaa atgggtggggg ccagcctccc
6241 atccaggcga ggacagcttg gctctgagcc acctcagata caagccaggc ccagggtca
6301 atttctgagc tctggcattt ccattaacaa tgccttaaag gaaagcaagc aggggcagtc
6361 attttatgag ttatatctaa ggatgtttga tgttcagttc taactctaca tggccagggg
6421 aaccccagca ctggcttagg cactgtgcag cactcagggt tagggggcca caccactcc
6481 tgccttcaaa gagattatc tctgatgag atataccatg agtaagaac aagggtttcc
6541 agccgacatcc tcaccacagg gaagactcgg gtactgcttg tatcagaagc tggcccagca
6601 gagccagtga ggttaggatt atcggatccc agtgcaggaa gggatcttga aggtcccttg
6661 gctacgacct tttctgcca ctgtgcagcc acgcgggggac ccccttctgc tctataactg
6721 gcagtgcctt atgattactt tcctcagtg ctaacagctc tcatagctgc tttaaattcc
6781 tcatgctgtg gtttaaaact tagttttcca tctttcctaa cgacggtaca aagaagcagt
6841 caccttattc aaattctgaa accattaatg atccttattc ctcccagaaa atcagactaa
6901 ttttgggaat ttttacagtt cccagaaatc tgatttccta acccacaagg accacttctc
6961 tgccatgtac ttcagatgga cacacacccc tctggctgat aaaccccact ggatctgacc
7021 ctggctgggt ggagggggacc ctggggcctc ctaggactgg acctctgtct tggctctatc
7081 tcgcttattc atttgtgact ggacagtggg agcctgtcca gacacatgtg tacctggtcc
7141 atttgcacgc tatgctcatg ggctttcttc tgtatagtgg agctactgtc ttcgctcatg
7201 atcatctcac tgtcagcttc tgcccactgg cccacctgcc aagctgatta cccatttgtc
7261 cttccaaagt acttgaatta atttgtcttc tccccttccc attctcttcc cctgatgcac
7321 acatcccaag cacacacttt ctagtcaaga ttgtttaaaa atacataatt gtacacattt
7381 tacagcaaaa aaacttttgt ggctcagctg cataccctga ggacttctgc tgagccccag
7441 tgcatagcag agcatagtgt gaaaatcaca gctctagcct catccacaga tgtgaagagt
7501 gaaacagcag ttggttggca ggaatcctc aatgctgagt agtagtggct cctgaggtta
7561 ctgtagtctg cacttccaag agtggggatg cctctggtca gaaggaagg tagtgagctc
7621 aaaggaagct gagaattctc catgagcttg agttctgttc gcaactgctc ccttcttca
7681 gcaaatccaa gtttccccca gagaatocca tccccctaga cagagcagggt ggttctcccg
7741 cgaagagagt cagatacagg cactgaggg ggtcttctct gctagctgaa gcagagccccg
7801 ccaaaatagc tttttttcca atgaaacatt tctgaatata acaccagaag catctataca
7861 attggaaaaa attgctgtaa ttttaaggat tgaacatgta ttgttttaa cataggaatt
7921 tatagggtgcc ttaaaagcat acacatccac attacactga gtagatcgag tctttttctc
7981 ctttgcctgc cttctcacc aacctcctgc ctcttcacac tgtgtggggg gtgttttggg
8041 ggtgtgtggg ggggagttat ggcttaattt gagtttttgt aaatagcatt tgcctggagc
8101 caaatgcaga actaaataat agagtaaaat ctttgcctt gttctaaatc ctgagagttc
8161 acttgcctta ccctaaggcc cccgactctg tgcccaccca ccccctact cccagtgggc
8221 agcagtcagg ccccagcccc catgctgtct cttttctgtg cctctgtcct ggtgccaggg
8281 ctctgagctg ctgagagctt cgctttgtga gatcaccccc atggcttctc tcagcttcaa
8341 ggggtgtggg ggccctctaa tcaactctata gtgcgaggag caataaccca gaaagtccat
8401 atgaataata cttggctctc ttctctgagt ctttaaccaa aaatgaagtc cactgccctg
8461 gccagaattc ttccttggct gtttgacaaa acttaattcc acaactggtt cctcccagag
8521 gatgactctt agtgaagca catcctctt tgagaatctg actgtttctg ggaatcaaaa
8581 atgtgggttt atatttccga tacttctgga gtgccagggt gtttggtttt gttttcaaca
8641 aatgttttgg ccctagaaat gcagcaactt gctctgttgc caggagcttc cctgccaagt

```

8701 gtcttgtgca cagccctctc ctgggtgagc tcctggacaa agcctcatgc cctggtaaac
8761 cctgcagact gcagccacta ttctggccta ggtcatagtc ttgagcacca gctctgctag
8821 ggctactcag gcattgcact tgtctgcagg tgtaggaat ttatgttact gaagagtgag
8881 caatgtcatt gtgagagcat gtgcaagagc aagctttcct gcaataccta aagaaaagca
8941 aggggaatag taggacctgg gacagcagtc ctaggcccac taattcccct tgcccctctg
9001 acagaatrtc gaactcagta ttcttcgaat actcagatgc cagggttgcc attgtaacag
9061 aataacagtg gctgggggac acccattcag tggctcttca gaaagaacaa attcactggg
9121 tggatataac acttaaggaa aatgctcaat aagccacca ttgagtctca gagcaacctg
9181 accaacaagg tgaaaacct ttaaaagaca cattgtcttg ctggagaacc ttctcccct
9241 gggtttcacc atggaacttc agcattacat gactaatggg cacgtaaatt aatgttact
9301 aagcaagaga ctattctcac ttcttgccac cctgagcagg gcagggaaag cagccagcag
9361 tcacagtgat ggggacagcc ttaaaggccc atagtcactt ggaagacaat ggcagagccc
9421 ttaggggttt gcccaagcca ggtaggatgt tagcaccagc ctagtgtctca aggatgagga
9481 cagtcacatc caccagcccc caaccctcag caatgagtac tcattctagg tctctgatagc
9541 tgccttactt tggccccag atcacaagtc ctttaaaagg aaagctgac tctctgtcca
9601 ctgtggcttg tgcctccttt tgtcccaggt gccaccacag ggctctgaac attcatccta
9661 gtttgccttg tcccgcaccc cgagcagcat ttgagtctta tgtttgaaat gggttcattt
9721 gagccagcaa ctcccctgctt cctttttgtg cctcgtgcac ttggagtgtc cactgtcctt
9781 tacctgtatc ccaaggctcc ttctctgaga cttcccagct ctctgttat ttcccacctc
9841 atgcttttct ttgcagctga acctattca cagtgaaatc agtaatttag ccggcttga
9901 ggtggaggcc ataataaatc ctaccaatgc tgacattgac cttaaagatg acctaggaaa
9961 cacgctggag aagaaagggt gcaaggagtt tgtggaagct gtcctggaac tccggaaaaa
10021 gaacgggccc ttggaagtag ctggagctgc tgcagcgcga ggccatggcc tgccctgcca
10081 gtttgtgatc cactgtaata gtccagtttg ggtgagcagc aagtgtgaag aacttctgga
10141 aaagacagtg aaaaactgct tggccctggc tgatgataag aagctgaaat ccattgcatt
10201 tccatccatc ggcagcggca ggaacggttt tccaaagcag acagcagctc agctgattct
10261 gaaggccatc tccagttact tctgtctac aatgtcctct tccatcaaaa cgggtgactt
10321 cgtgcttttt gacagcgaga gtataggcat ctatgtgcag gaaatggcca agctggcgc
10381 caactaggct gagcaatgac agaaccagct gcaccatgta ccccaccttc agtttaaaag
10441 aaaaaaaaaa tccccttcac tcctactggg aggtgggacc cttttcattt tcagttttgc
10501 tcacttaggg aaaataaggc tttggtttcc agtttaattg tttttgacct tctaaaatgt
10561 ttttatgtta gcactgatag ttggcattac tggttgtaag cactgtgttc cagaccgtgt
10621 ctgacttagt gtaacctagg agattttata gttttatfff aatgaaacce tgattgacgc
10681 acagcagtg gggagaacagc gtcttttacc tgtcaccgaa gccaggaagc cccgtttgta
10741 agcgtgtgtt gtgggtgcttt attgtacatc ctccagtggc gttcttttta ctctaagt
10801 cttttggttt cccccctcag aagaatcatg aatttgcaac agacctaat tttggttact
10861 ttttgtctta ttgatggatt tgaaaatgaa agatttaata aggcaaagca gaatctgttg
10921 tccttaatta tatttgcaat ttggaatttg tgtgagttga tttagtaaaa tgttaaaccc
10981 tt

```

Abbildung 25: cDNA-Sequenz von IGFBP-5

Darstellung der cDNA Sequenz von IGFBP-5.

Das ursprüngliche RDA-PCR-Produkt ist fett dargestellt. Die Positionen der Amplifikationsprimer für die genspezifische PCR sind unterstrichen.

7. Literaturverzeichnis

Abal, M., Andreu, J. M. & Barasoain, I. (2003). Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action. *Curr Cancer Drug Targets* **3**, 193-203.

Allman, R., Errington, R. J. & Smith, P. J. (2003). Delayed expression of apoptosis in human lymphoma cells undergoing low-dose taxol-induced mitotic stress. *Br J Cancer* **88**, 1649-1658.

Antonia, L., Antonia, P., Benvenuti, S., Ioal, Egrave, Massa, B. & Bonadonna, F. (1995). The homing behaviour of Cory's shearwaters (*Calonectris diomedea*) studied by means of a direction recorder. *J Exp Biol* **198**, 359-362.

Armstrong, K., Eisen, A. & Weber, B. (2000). Assessing the risk of breast cancer. *N Engl J Med* **342**, 564-571.

Barry, M. A., Behnke, C. A. & Eastman, A. (1990). Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* **40**, 2353-2362.

Baselga, J., Perez, E. A., Pienkowski, T. & Bell, R. (2006). Adjuvant trastuzumab: a milestone in the treatment of HER-2-positive early breast cancer. *Oncologist* **11 Suppl 1**, 4-12.

Blagosklonny, M. V. & Fojo, T. (1999). Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review). *Int J Cancer* **83**, 151-156.

Bonneterre, JM (2001) Benefit of a high-dose epirubicin regimen in adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer patients with poor prognostic factors: 5-year follow-up results of French Adjuvant Study Group 05 randomized trial. *J Clin Oncol* **19**, 602-611.

Butt, A. J., Dickson, K. A., McDougall, F. & Baxter, R. C. (2003). Insulin-like growth factor-binding protein-5 inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **278**, 29676-29685.

Butt, A. J., Dickson, K. A., Jambazov, S. & Baxter, R. C. (2005). Enhancement of tumor necrosis factor-alpha-induced growth inhibition by insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5), but not IGFBP-3 in human breast cancer cells. *Endocrinology* **146**, 3113-3122.

Cianfrocca, M. & Goldstein, L. J. (2004). Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* **9**, 606-616.

Cobb, L. J., Salih, D. A., Gonzalez, I., Tripathi, G., Carter, E. J., Lovett, F., Holding, C. & Pell, J. M. (2004). Partitioning of IGFBP-5 actions in myogenesis: IGF-independent anti-apoptotic function. *J Cell Sci* **117**, 1737-1746.

Collins, J. A., Schandi, C. A., Young, K. K., Vesely, J. & Willingham, M. C. (1997). Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem* **45**, 923-934.

Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P. & other authors (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6025-6030.

Duffy, M. J. (2005). Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem* **51**, 494-503.

Ehrlich P, H., S (1910). Die experimentelle Chemotherapie der Spirillosen. *Julius Springer*.

Eiermann W, E. J., Gauwerky J, Hölzel D, Kessler M, Mahl G, Sittek H, Sommer H. Strigl R, Untch M (2001). *Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Mammakarzinome*: Tumorzentrum München: Sauer H-J.

Eisen, M. B. & Brown, P. O. (1999). DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods Enzymol* **303**, 179-205.

Engel J, S.-F. G., Hölzel D (2001). *Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Mammakarzinome*: Tumorzentrum München: Sauer H-J.

Epstein, R. J. (1990). Drug-induced DNA damage and tumor chemosensitivity. *J Clin Oncol* **8**, 2062-2084.

Fenech, M. & Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* **147**, 29-36.

Ferlay, J. e. a. (2000). Cancer, Incidence, mortality and Prevalence worldwide, pp. <http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.htm>.

Firth, S. M. & Baxter, R. C. (2002). Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* **23**, 824-854.

Fisher (1992). Recent developments in the use of systemic adjuvant therapy for the treatment of breast cancer. *Semin Oncol Jun*; **19 (3)**, 263-277.

Fisher, B., Bauer, M., Wickerham, D. L. & other authors (1983). Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* **52**, 1551-1557.

Fisher, B. & Wolmark, N. (1985). Limited surgical management for primary breast cancer: a commentary on the NSABP reports. *World J Surg* **9**, 682-691.

Fisher, B., Brown, A., Mamounas, E. & other authors (1997). Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Clin Oncol* **15**, 2483-2493.

Fisher, B., Bryant, J., Wolmark, N. & other authors (1998). Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* **16**, 2672-2685.

Fisher, E. R., Costantino, J., Fisher, B., Palekar, A. S., Redmond, C. & Mamounas, E. (1995). Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) Protocol B-17. Intraductal carcinoma (ductal carcinoma in situ). The National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborating Investigators. *Cancer* **75**, 1310-1319.

Friesen, C., Herr, I., Krammer, P. H. & Debatin, K. M. (1996). Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med* **2**, 574-577.

Genestie, C., Zafrani, B., Asselain, B., Fourquet, A., Rozan, S., Validire, P., Vincent-Salomon, A. & Sastre-Garau, X. (1998). Comparison of the prognostic value of Scarff-Bloom-Richardson and Nottingham histological grades in a series of 825 cases of breast cancer: major importance of the mitotic count as a component of both grading systems. *Anticancer Res* **18**, 571-576.

Gherzi, D., Wilcken, N., Simes, J. & Donoghue, E. (2005). Taxane containing regimens for metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003366.

Gianni, L., Baselga J (2002). effects of PST on local-regional disease. *Proc ASCO* **21**, abstr 132.

Gonzalez-Angulo, A. M., Hortobagyi, G. N. & Esteva, F. J. (2006). Adjuvant therapy with trastuzumab for HER-2/neu-positive breast cancer. *Oncologist* **11**, 857-867.

Green, D. R. (2005). Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* **121**, 671-674.

Guckel, B., Stumm, S., Rentzsch, C., Marme, A., Mannhardt, G. & Wallwiener, D. (2005). A CD80-transfected human breast cancer cell variant induces HER-2/neu-specific T cells in HLA-A*02-matched situations in vitro as well as in vivo. *Cancer Immunol Immunother* **54**, 129-140.

Guo, W., Zeng, C., Dong, F. & Lei, W. (2002). Paclitaxel-induced apoptosis in osteosarcoma cell line U-2 OS. *Chin Med J (Engl)* **115**, 1796-1801.

Gurskaya, N. G., Diatchenko, L., Chenchik, A. & other authors (1996). Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem* **240**, 90-97.

Hahnel, R. & Spilsbury, K. (2004). Oestrogen receptors revisited: long-term follow up of over five thousand breast cancer patients. *ANZ J Surg* **74**, 957-960.

Hanke, J., Solinas-Toldo & Hoheisel, J. (1997). Genomanalyse und Gendiagnostik. In *Molekular- und Zellbiologische Grundlagen*, pp. 74-75. Edited by D. Ganten & K. Ruckpaul. Berlin Heidelberg New York: Springer - Verlag,.

Heinemann, V., Artmann, A., Beinert, H (2003). *Manual Mammakarzinom Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie*. München.

Henderson, I. C., Berry, D. A., Demetri, G. D. & other authors (2003). Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol* **21**, 976-983.

Hermanek, P., Scheibe, O., Spiessl, B. & Wagner, G. (1987). [TNM classification of malignant tumors: the new 1987 edition]. *Chirurg* **58**, 182.

Hickman, J. A., Potten, C. S., Merritt, A. J. & Fisher, T. C. (1994). Apoptosis and cancer chemotherapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **345**, 319-325.

Horwitz, S. B., Cohen, D., Rao, S., Ringel, I., Shen, H. J. & Yang, C. P. (1993). Taxol: mechanisms of action and resistance. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 55-61.

Horwitz, S. B. (1994). Taxol (paclitaxel): mechanisms of action. *Ann Oncol* **5 Suppl 6**, S3-6.

Hubank, M. & Schatz, D. G. (1994). Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* **22**, 5640-5648.

Huisman, C., Ferreira, C. G., Broker, L. E., Rodriguez, J. A., Smit, E. F., Postmus, P. E., Kruijt, F. A. & Giaccone, G. (2002). Paclitaxel triggers cell death primarily via caspase-independent routes in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. *Clin Cancer Res* **8**, 596-606.

Institut, A. b. K. i. D. i. Z. m. d. R. K. (2002). *Krebs in Deutschland - Häufigkeit und Trends*.

Joensuu, H., Isola, J., Lundin, M. & other authors (2003). Amplification of erbB2 and erbB2 expression are superior to estrogen receptor status as risk factors for distant recurrence in pT1N0M0 breast cancer: a nationwide population-based study. *Clin Cancer Res* **9**, 923-930.

Jonat W, H. M. (2001). *Mammakarzinom- aktuelle Diagnostik und Therapie*. Bremen: Uni-Med Verlag AG.

Jones, J. I. & Clemmons, D. R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* **16**, 3-34.

Jordan, M. A., Wendell, K., Gardiner, S., Derry, W. B., Copp, H. & Wilson, L. (1996). Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res* **56**, 816-825.

Kahlert S, B. J., Bismarck v.F, Eiermann W (2003). *Manual MAMmakarzinome*. München: Tumorzentrum München und Zuckschwerdt Verlag München.

Kim, R., Tanabe, K., Uchida, Y., Emi, M., Inoue, H. & Toge, T. (2002). Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* **50**, 343-352.

Kirkin, V., Joos, S. & Zornig, M. (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* **1644**, 229-249.

Krebsgesellschaft, D. G. f. S. u. D. (2003). Erhebungsbogen zur Zertifizierung, pp. 17/30.

La Porta, C. A. (2004). Cellular targets for anticancer strategies. *Curr Drug Targets* **5**, 347-355.

Lang, I. & Hitre, E. (2006). [Trastuzumab (Herceptin) in the adjuvant treatment of HER-2-positive early breast cancer]. *Magy Onkol* **50**, 293-302.

Le Doussal, V., Tubiana-Hulin, M., Friedman, S., Hacene, K., Spyrtos, F. & Brunet, M. (1989). Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer* **64**, 1914-1921.

Lerebours, F., Bieche, I. & Lidereau, R. (2005). Update on inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res* **7**, 52-58.

Liang, P. & Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-971.

Liang, P. & Pardee, A. B. (1995). Recent advances in differential display. *Curr Opin Immunol* **7**, 274-280.

Liang, P. & Pardee, A. B. (1998). Differential display. A general protocol. *Mol Biotechnol* **10**, 261-267.

Linskens, M. H., Feng, J., Andrews, W. H., Enlow, B. E., Saati, S. M., Tonkin, L. A., Funk, W. D. & Villeponteau, B. (1995). Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. *Nucleic Acids Res* **23**, 3244-3251.

Lissauer, H (1865). Zwei Fälle von Leucaemie. *Berl Klin Wochenschr* **1865**;2, 403-405.

Lovat, P. E., Oliverio, S., Corazzari, M., Ranalli, M., Pearson, A. D., Melino, G., Piacentini, M. & Redfern, C. P. (2003). Induction of GADD153 and Bak: novel molecular targets of fenretinide-induced apoptosis of neuroblastoma. *Cancer Lett* **197**, 157-163.

Lüscher B., N. A. (2006). Zellproliferation, Zellzyklus und Apoptose. In *Kompendium internistische Onkologie*, pp. 6-17: Schmoll.

Maier-Lenz, H., Hauns, B., Haering, B. & other authors (1997). Phase I study of paclitaxel administered as a 1-hour infusion: toxicity and pharmacokinetics. *Semin Oncol* **24**, S19-16-S19-19.

Martin, M., Pienkowski, T., Mackey, J. & other authors (2005). Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *N Engl J Med* **352**, 2302-2313.

McCaig, C., Perks, C. M. & Holly, J. M. (2002). Intrinsic actions of IGFBP-3 and IGFBP-5 on Hs578T breast cancer epithelial cells: inhibition or accentuation of attachment and survival is dependent upon the presence of fibronectin. *J Cell Sci* **115**, 4293-4303.

Miele, G., MacRae, L., McBride, D., Manson, J. & Clinton, M. (1998). Elimination of false positives generated through PCR re-amplification of differential display cDNA. *Biotechniques* **25**, 138-144.

Milross, C. G., Mason, K. A., Hunter, N. R., Chung, W. K., Peters, L. J. & Milas, L. (1996). Relationship of mitotic arrest and apoptosis to antitumor effect of paclitaxel. *J Natl Cancer Inst* **88**, 1308-1314.

Miyake, H., Pollak, M. & Gleave, M. E. (2000). Castration-induced up-regulation of insulin-like growth factor binding protein-5 potentiates insulin-like growth factor-I activity and accelerates progression to androgen independence in prostate cancer models. *Cancer Res* **60**, 3058-3064.

Miyakoshi, N., Richman, C., Kasukawa, Y., Linkhart, T. A., Baylink, D. J. & Mohan, S. (2001). Evidence that IGF-binding protein-5 functions as a growth factor. *J Clin Invest* **107**, 73-81.

Mork, C. N., Faller, D. V. & Spanjaard, R. A. (2005). A mechanistic approach to anticancer therapy: targeting the cell cycle with histone deacetylase inhibitors. *Curr Pharm Des* **11**, 1091-1104.

Mouridsen, H. T. & Robert, N. J. (2005). Benefit with aromatase inhibitors in the adjuvant setting for postmenopausal women with breast cancer. *MedGenMed* **7**, 20.

Moy, B. & Goss, P. E. (2006). Lapatinib: Current Status and Future Directions in Breast Cancer. *Oncologist* **11**, 1047-1057.

Mross, K., Hollander, N., Hauns, B., Schumacher, M. & Maier-Lenz, H. (2000). The pharmacokinetics of a 1-h paclitaxel infusion. *Cancer Chemother Pharmacol* **45**, 463-470.

- N.Maass , K. N., C. Mundhenke, W. Jonat (2000).** Beschreibung der Differenzial Display Methode anhand unterschiedlich exprimierter Gene in humanen Brustkrebszellen. *Geburtsh Frauenheilk* **60**, 191-198.
- Nabholtz, J. M. & Gligorov, J. (2005).** The role of taxanes in the treatment of breast cancer. *Expert Opin Pharmacother* **6**, 1073-1094.
- Nagel, A. C., Fleming, J. T., Sayler, G. S. & Beattie, K. L. (2001).** Screening for ribosomal-based false positives following prokaryotic mRNA differential display. *Biotechniques* **30**, 988-990, 992, 994-986.
- Nam, T. J., Busby, W., Jr. & Clemmons, D. R. (1997).** Insulin-like growth factor binding protein-5 binds to plasminogen activator inhibitor-I. *Endocrinology* **138**, 2972-2978.
- Noronha, V. (2005).** Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *N Engl J Med* **353**, 954-955; author reply 954-955.
- Osborne, K. (1991).** *Breast Diseases 2nd ed.* Philadelphia.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. (2001).** Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* **94**, 153-156.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. (2005).** Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**, 74-108.
- Perks, C. M., McCaig, C. & Holly, J. M. (2000).** Differential insulin-like growth factor (IGF)-independent interactions of IGF binding protein-3 and IGF binding protein-5 on apoptosis in human breast cancer cells. Involvement of the mitochondria. *J Cell Biochem* **80**, 248-258.
- Perks, C. M., McCaig, C., Clarke, J. B., Clemmons, D. R. & Holly, J. M. (2002).** A non-IGF binding mutant of IGFBP-3 modulates cell function in breast epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **294**, 988-994.
- Peto, R., Boreham, J., Clarke, M., Davies, C. & Beral, V. (2000).** UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20-69 years. *Lancet* **355**, 1822.
- Piccart-Gebhart, M. J., Procter, M., Leyland-Jones, B. & other authors (2005).** Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* **353**, 1659-1672.
- Rack, B., Janni, W (2006).** *Biologics... Gynäkologie und Geburtshilfe 1-2006.*
- Romond, E. H., Perez, E. A., Bryant, J. & other authors (2005).** Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* **353**, 1673-1684.
- Rowinsky, E. K., Onetto, N., Canetta, R. M. & Arbuck, S. G. (1992).** Taxol: the first of the taxanes, an important new class of antitumor agents. *Semin Oncol* **19**, 646-662.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470.

Sinn, H. P., G. Bastert, A. Schneeweiss² (2004). Anwendung der neuen TNM-Klassifikation: Stadiengruppierung und Überlebensraten. In *Brennpunkt: Disease Management Mammakarzinom*.

Stumm, S., Meyer, A., Lindner, M., Bastert, G., Wallwiener, D. & Guckel, B. (2004). Paclitaxel treatment of breast cancer cell lines modulates Fas/Fas ligand expression and induces apoptosis which can be inhibited through the CD40 receptor. *Oncology* **66**, 101-111.

Takemura, K., Noguchi, M., Ogi, K., Tokino, T., Kubota, H., Miyazaki, A., Kohama, G. & Hiratsuka, H. (2005). Enhanced Bax in oral SCC in relation to antitumor effects of chemotherapy. *J Oral Pathol Med* **34**, 93-99.

Taylor, S. S. & McKeon, F. (1997). Kinetochores localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell* **89**, 727-735.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462.

Tonner, E., Barber, M. C., Travers, M. T., Logan, A. & Flint, D. J. (1997). Hormonal control of insulin-like growth factor-binding protein-5 production in the involuting mammary gland of the rat. *Endocrinology* **138**, 5101-5107.

Tonner, E., Allan, G., Shkreta, L., Webster, J., Whitelaw, C. B. & Flint, D. J. (2000). Insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5) potentially regulates programmed cell death and plasminogen activation in the mammary gland. *Adv Exp Med Biol* **480**, 45-53.

Traut, W. (1991). In *Chromosomen: klassische und molekulare Cytogenetik*. Berlin: Springer Verlag.

Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* **270**, 484-487.

Verhoog, L. C., Berns, E. M., Brekelmans, C. T., Seynaeve, C., Meijers-Heijboer, E. J. & Klijn, J. G. (2000). Prognostic significance of germline BRCA2 mutations in hereditary breast cancer patients. *J Clin Oncol* **18**, 119S-124S.

Weise, W., Schiller, S. (2003). Das Mammakarzinom, Empfehlungen zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge. In *Empfehlungen zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Magdeburg: Universitätsfrauenklinik Magdeburg.

Wittekind Ch, M. H.-J., Bootz F (Hrsg.) (2002). *TNM Klassifikation maligner Tumoren*, TNM 6. Auflage UICC edn. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.

Wyllie, A. H., Kerr, J. F. & Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**, 251-306.

Yalcin, B., Buyukcelik, A., Yalcin, S., Utkan, G., Doruk, H., Dogan, M. & Altan, M. (2005). Re: Continuing outcomes relevant to Evista: breast cancer incidence in postmenopausal osteoporotic women in a randomized trial of raloxifene. *J Natl Cancer Inst* **97**, 542; author reply 542-543.

Yoshida, K. & Miki, Y. (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci* **95**, 866-871.

8. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Herwig Ponstingel, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, für die Bereitstellung des interessanten Themas und die optimalen Bedingungen die ich unter seiner Leitung in der Abteilung Molekulare Biologie der Mitose vorfand.

Bei Frau Dr. Brigitte Gückel möchte ich mich ganz besonders herzlich für ihre Bereitschaft bedanken, diese Dissertation vor der Fakultät in Tübingen zu vertreten.

Herrn Dr. Alexander Marme danke ich für die gelungene Organisation und engagierte Betreuung der Arbeit.

Ich danke den Mitarbeitern des Labors der Abteilung Prof Dr. Herwig Ponstingl , allen voran Herr. PD. Dr. Ralph Bischoff, für Anregung, Hilfe und die eine oder andere Audienz.

Die Mitarbeiter des Onkologischen Labors der UFK Heidelberg , allen voran Frau Dr. Susanne Stumm und Herr Dr. Matthias Lindner haben mich während meiner Labortätigkeit freundlich unterstützt. Dafür möchte ich mich sehr herzlich bei ihnen bedanken.

Die freundschaftliche Zusammenarbeit mit meiner „Mitdotorandin“ Frau Karin Schmitt hat bedeutend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank Karin!

Herr Dr. med Jan Lars Rybniker ist ein hartnäckiger Mensch und ein großartiger Wissenschaftler, und für diese Kombination bin ich ihm sehr dankbar.

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Großmutter Frau Erna Boschke, die mir das Studium und die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

9. Lebenslauf

Name: Claudia Boschke
Geburtstag: 29.07.1976
Eltern: Ulrike Boschke, geb. Wiese
Wolfram Boschke
Geburtsort: Heidelberg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

1982 - 1995 Grundschole und Gymnasium, Meckenheim/ Bonn, Abschluss:
Abitur
10/1995 bis 11/2002 Studium der Humanmedizin an der Ruprecht- Karls- Universität
Heidelberg
15/11/2002 Ärztliche Prüfung
09/2004 Vollapprobation als Ärztin

Klinischer Werdegang

03/2003 – 03/2005 Ärztin im Praktikum und Assistenzärztin Innere Medizin, Sana
Klinik Hürth/Köln
08/2005 - heute Assistenzärztin, Abteilung für Kardiologie, Sankt Katharinen
Krankenhaus Frankfurt a.M.