**Aus der Universitäts-Frauenklinik mit Poliklinik Tübingen**

**Abteilung Allgemeine Geburtshilfe und Frauenheilkunde**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Wallwiener**

# Einfluss von 5' –Fluorouracil und Methotrexat auf die Genexpression in Mammakarzinom-Zelllinien

**Inaugural-Dissertation**
**zur Erlangung des Doktorgrades**
**der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät**
**der Eberhard-Karls-Universität**
**zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Karin Dagmar Hildegard Schmitt**

**aus**

**Homburg/Saar**

**2008**

| | |
|---|---|
| Dekan: | Professor Dr. I. B. Autenrieth |
| 1. Berichterstatter: | Privatdozentin Dr. B. Gückel |
| 2. Berichterstatter: | Privatdozent Dr. F. Mayer |

## Inhaltsverzeichnis

**Inhaltsverzeichnis……1**
**Abkürzungsverzeichnis……..3**
**1 Einleitung und Zielsetzung……8**
**1.1 Das Mammakarzinom……8**
1.1.1 Die Epidemiologie des Mammakarzinoms……8
1.1.2 Ätiologie und klinisches Erscheinungsbild des Mammakarzinoms……8
1.1.3 Behandlungsstrategien des Mammakarzinoms……9
1.1.3.1 Die kurative Therapie……9
1.1.3.2 Die palliative Therapie……13
**1.2 Zytostatika……14**
1.2.1 Methotrexat……14
1.2.2 5'-Fluorouracil……16
1.2.3 Zytostatika und Genexpression……18
**1.3 Kleine G-Proteine……19**
1.3.1 Struktur und Funktion……19
1.3.2 Kleine G-Proteine und die β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors - ein Vergleich……21
**1.4 Signalerkennung und Signalerkennungspartikelrezeptor……26**
1.4.1 Das Prinzip der Signalerkennung……26
1.4.2 Die β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors……28
**1.5 Zielsetzung……29**
**2 Materialien und Methoden……30**
**2.1 Materialien……30**
2.1.1 Chemikalien……30
2.1.2 Häufig verwandte Puffer……32
2.1.3 Filter und Membranen……34
2.1.4 Radiochemikalien……34
2.1.5 Molekularbiolgische Kits……34
2.1.6 Enzyme……34
2.1.7 Nukleinsäurenstandards……35
2.1.8 Oligonukleotide……35
2.1.9 Kulturmedien……37
2.1.10 Antikörper……37
2.1.11 Geräte, Zubehör und Verbrauchsmaterialien……38
2.1.12 Software……39
**2.2 Methoden……40**
2.2.1 Zellkultur……40
2.2.2 Inkubation……41
2.2.3 Isolierung der RNA……41
2.2.4 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit……43
2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese……43
2.2.6 DNAse-Verdau……44
2.2.7 Reverse Transkription……44
2.2.8 Methoden zur Detektion der differenziellen Genexpression……45
2.2.8.1 Die Differential-Display-PCR……46
2.2.8.2 Die Subtraktive Hybridisierung……49
2.2.9 T/A-Klonierung und Transformation kompetenter E. coli……56
2.2.10 Kolonie-PCR……57
2.2.11 Dot-Blot-Analyse und Herstellung radioaktiv markierter cDNA-Sonden……58
2.2.12 Strippen der Membranen……59
2.2.13 Plasmidisolation aus E. coli……60
2.2.14 Restriktionsanalyse……60
2.2.15 Sequenzierungen……60

2.2.16 Semiquantitative PCR ... 61
2.2.17 Quantitative PCR ... 61
2.2.18 FACS-Analyse ... 62
**3 Ergebnisse ... 64**
**3.1 Untersuchungen zum Einfluss von 5'-FU und MTX auf die Genexpression ... 64**
3.1.1 Auswahl der zu untersuchenden Zelllinien ... 64
3.1.2 Inkubationen ... 65
3.1.3 Isolierung der RNA ... 65
3.1.4 Reverse Transkription ... 66
**3.2 Einfluss von 5'-FU auf die Genexpression in MCF7-Zellen ... 67**
3.2.1 Differential-Display-PCR von cDNA ... 67
3.2.2 Klonierung der PCR-Produkte in den pCR®2.1-Topo-Vektor und Restriktionsanalyse ... 69
3.2.3 Sequenzanalyse ... 70
3.2.4 Validierung des Ergebnisses aus der Differential-Display-PCR ... 72
**3.3 Einfluss von MTX auf die Genexpression in KS-Zellen ... 74**
3.3.1 Subtraktive Hybridisierung von cDNA unter Verwendung des PCR-Select™ Subtraction Kits ... 74
3.3.2 Klonierung der subtrahierten PCR-Produkte in den pCR®2.1-Topo-Vektor ... 74
3.3.3 Southern-Blot-Analyse ... 75
3.3.4 Restriktionsanalysen ... 78
3.3.5 Sequenzanalyse ... 80
3.3.6 Validierung der differenziellen Expression von SRβ ... 81
3.3.7 Lokalisation und Charakterisierung des APMCF1-Gens ... 85
3.3.8 Untersuchungen zum Zelltod mittels Durchflusszytometrie ... 88
**4 Diskussion ... 93**
**4.1 Auswirkungen von 5'-FU auf MCF7-Zellen ... 94**
**4.2 Auswirkungen von MTX auf KS-Zellen ... 95**
4.2.1 Funktion des Signalerkennungspartikelrezeptors mit besonderem Hinblick auf die β-Untereinheit. ... 96
4.2.2 Die Rolle der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors für die Regulation des Zelltods ... 97
**5 Zusammenfassung ... 102**
**6 Literaturverzeichnis ... 104**
**7 Danksagung ... 113**
**8 Lebenslauf ... 114**

Allgemeine Abkürzungen

| | |
|---|---|
| Abb. | Abbildung |
| AGO | Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie |
| ARF | ADP-Ribosylation Factor |
| APS | Ammoniumperoxidsulfat |
| [$\alpha$-$^{33}$P]-dATP | Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat, mit Phosphor 33 radiokativ markiert |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserum-Albumin (bovine serum albumine) |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| CCD-Kamera | charged coupled device |
| cDNA | komplementäre DNA (complemtary desoxyribonucleic acid) |
| cm | Zentimeter (centimetre) |
| CMBI | Centre for Molecular and Biomolecular Information |
| CMF-Schema | Cyclophosphamid-Methotrexat-5'-Fluorouracil-Schema |
| $CO_2$ | Kohlendioxid (carbon dioxide) |
| [$\alpha$-$^{32}$P]-dCTP | mit radioaktivem Phophor 32 markiertes Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat |
| DEPC | Diethyl Pyrocarbonate |
| DKFZ | Deutsches Krebsforschungszentrum |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid) |
| dNTP | Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| dTTP | Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat |
| dUMP | Desoxy-Uridin-5'-Monophosphat |
| E. coli | Escherichia coli |
| EDTA | Dinatriumsalz der Ethylendiaminotetraessigsäure (-acid) |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |

| | |
|---|---|
| FACS | Fluoreszenz-aktivierte Zelltrennung (fluoreszence-activated cell sorting) |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| FCS | Fötales Kälberserum (fötal calf serum) |
| 5'-FU | 5'-Fluorouracil |
| FtsY | Prokaryotischer Signalerkennungspartikelrezeptor |
| GAP | GTPase aktiverendes Protein |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| G-Domäne | Guanosintriphosphat-bindende Domäne |
| GDF | Guanylnukleotid-Dissoziations-Faktor |
| GDI | Guanylnukleotid-Dissoziations-Inhibitor (Guanine nucleotid dissociation inhibitor) |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GEF | Guanylnukleotid-Austauschfaktor (Guanine nucleotide exchange factor) |
| GnRH | Gonodotropin-freisetzendes Hormon (Gonodotropin-Releasing-Hormone) |
| G-Protein | Guanylnukleotid-bindendes Protein |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| GTPase | Guanosintriphosphatase |
| h | Stunde(n) (hour[s]) |
| $H_2O$ | Wasser |
| HER2 | Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin N'-2-Ethansulfonsäure |
| Ig | Immunglobulin |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactosid |
| kDa | kiloDalton |
| LB | Luria Boveri |
| M | Molar |
| MAC | Macintosh Computer |
| $MgCl_2$ | Magnesiumchlorid |
| µg | Mikrogramm |

| | |
|---|---|
| µl | Mikroliter |
| µM | Mikromolar |
| ml | Milliliter |
| min | Minute(n) |
| mV | Millivolt |
| MOPS | 3-N-Morpholino-Propan-Sulfonsäure |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure (messanger ribonucleic acid) |
| MTX | Methotrexat |
| n | nicht zu sequenzierende Nukleinsäuren-Base |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOH | Natronlauge |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| $^{32}P$ | radioaktiver Phophor 32 |
| $^{33}P$ | radioaktiver Phophor 33 |
| MAP-Kinase | Mitogenaktivierte Proteinkinase |
| PAI-1 | Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 |
| PBS | Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (phosphate buffered saline) |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction) |
| pH | Pondus Hydrogenii (entspricht dem negativen dekadischen Logarithmus der Wasserstoff-Ionenkonzentration) |
| pT3 | Primärtumor >5cm in der größten Ausdehnung |
| pT4 | Primärtumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut |
| RNA | Ribonukleinsäure (ribonucleic acid) |
| 18S rRNA | ribosomale Ribonukleinsäure mit einem Sedimentationskoeffizienten von 18 |
| 28S rRNA | ribosomale Ribonukleinsäure mit einem Sedimentationskoeffizienten von 28 |
| RT-Produkt | Produkt der reversen Transkription |

| | |
|---|---|
| s | Sekunde |
| S. cerevisiae | Saccharomyces cerevisiae |
| SDS | Natriumdodecylphosphat (sodium dodecyl sulfate) |
| Sec61 | zentrale Komponente des eukaryotischen ER-Translokationsapparates |
| SET-Puffer | Natrium (Sodium)-Ethylendiaminotetraessigsäure Tris-(hydroxymethyl)aminomethan-Puffer |
| S-Phase | Synthese-Phase |
| SR | Signalerkennungspartikelrezeptor |
| SRα | α-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors (α-subunit of the signal recognition particle receptor) |
| SRβ | β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors (β-subunit of the signal recognition particle receptor) |
| SRP | Signalerkennungspartikel (Signal Recognition Particle) |
| SRP54 | 54-kDa Untereinheit des Signalerkennungspartikels |
| SRX | Aminoterminale Interaktionsdomäne von SRα |
| SSC | Standard Saline Citrate |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Elektrophoresepuffer |
| TBE | Tris-Borsäure-EDTA-Elektrophoresepuffer |
| Tris | Tris-(Hydroxymethyl)Aminomethan |
| U | Enzymeinheiten (Units) |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| uPA | Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp |
| u. U. | unter Umständen |
| UV | Ultraviolett |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid |
| z. B. | zum Beispiel |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

Nukleinsäure-Basen

| | |
|---|---|
| A | Adenin |
| C | Cytosin |
| G | Guanin |
| T | Thymin |
| U | Uracil |

Aminosäuren

| | | |
|---|---|---|
| A | Ala | Alanin |
| C | Cys | Cystein |
| D | Asp | Aparaginsäure |
| E | Glu | Glutaminsäure |
| F | Phe | Phenylalanin |
| G | Gly | Glycin |
| H | His | Histidin |
| I | Ile | Isoleucin |
| K | Lys | Lysin |
| L | Leu | Leucin |
| M | Met | Methionin |
| N | Asn | Asparagin |
| P | Pro | Prolin |
| Q | Gln | Glutamin |
| R | Arg | Arginin |
| S | Ser | Serin |
| T | Thr | Threonin |
| V | Val | Valin |
| W | Trp | Tryptophan |
| Y | Tyr | Tyrosin |

# 1 Einleitung und Zielsetzung

## *1.1 Das Mammakarzinom*

### 1.1.1 Die Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom stellt mit einer jährlichen Inzidenz von einer Million weltweit den häufigsten malignen Tumor der Frau dar (McPherson et al. 2000). In Deutschland ist nach Angaben des Robert-Koch-Institutes von 47 500 Neuerkrankungen jährlich auszugehen. Das mittlere Lebenszeitrisiko an Brustkrebs zu erkranken beträgt für eine deutsche Frau 9,2 %. Das bedeutet, dass statistisch gesehen jede 11. Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom erkrankt. Alleine in Deutschland sind nach Angaben des Statistischen Bundesamtes im Jahre 2004 17 592 Frauen an einem Mammakarzinom verstorben.

### 1.1.2 Ätiologie und klinisches Erscheinungsbild des Mammakarzinoms

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt; neben dem Alter wird ein lange andauernder Östrogeneinfluss verantwortlich gemacht. So steigt das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, bei Patientinnen mit früher Menarche und später Menopause – also bei Frauen, die im Laufe ihres Lebens eine große Anzahl ovulatorischer Zyklen durchlaufen. Ähnlich wird das Erkrankungsrisiko von Nulliparität und einer relativ späten ersten Schwangerschaft beeinflusst. Es wird außerdem diskutiert, dass der iatrogen verursachte Einfluss von Östrogenen, wie bei der postmenopausalen Östrogensubstitution oder der Einnahme Östrogen-haltiger Kontrazeptiva, das Brustkrebsrisiko steigert (Sasco 2001). Als weitere Risikofaktoren gelten Adipositas, Diabetes mellitus, Genussgifte wie Tabak und Alkohol, das Vorhandensein eines Karzinoms der kontralateralen Brust sowie eine vorherige gutartige Erkrankung der Mamma. Auch bislang unbekannte Faktoren wie z. B. Ernährungsgewohnheiten und Umwelteinflüsse scheinen das Brustkrebsrisiko zu erhöhen, wie ein Vergleich der hohen Inzidenzen in den westlichen Ländern

mit den deutlich niedriger liegenden Inzidenzen fernöstlicher Länder zeigt (Sasco 2001). Insgesamt scheinen beim sporadischen Mammakarzinom die genetischen Veränderungen eine Folge der Summation endogener und exogener Einflüsse zu sein, welche sich unter sukzessiver Aquisition von genetischen Veränderungen, wie der Amplifikation des Protoonkogens HER2 und dem Verlust des Tumorsupressors p53, entwickeln (Braun et al. 2002). 5 bis 10% aller Mammakarzinome sind primär mit einer genetischen Prädisposition assoziiert (Braun et al. 2002). So konnten bei Patientinnen mit hereditärem Mammakarzinom in 30-40% der Fälle Mutationen in den beiden Brustkrebsgenen BRCA 1 und 2 identifiziert werden (Braun et al. 2002). Trägerinnen dieser Veränderungen weisen schätzungsweise ein um 80 bis 87% erhöhtes Risiko auf, im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom zu erkranken (Struewing et al. 1997, Couch et al. 1997, Krainer et al. 1997).

Als relatives Frühsymptom gilt der kleine, noch frei bewegliche tastbare Knoten der Mamma. Größere, fixierte Raumforderungen und Hautveränderungen wie Warzeneinziehungen und Ödeme (Peau d'orange) weisen oft auf ein bereits fortgeschritteneres Tumorstadium hin. Dyspnoe, Knochen- und Leberkapselschmerzen sind Zeichen einer fortgeschrittenen Fernmetastasierung in die entsprechenden Organe.

### 1.1.3 Behandlungsstrategien des Mammakarzinoms

#### 1.1.3.1 Die kurative Therapie

Die Grundvoraussetzung für eine kurative Therapie des Mammakarzinoms stellt die operative Entfernung des Tumors im Gesunden dar. Sie wird meistens als Mammateilresektion und nur bei Vorliegen von Kontraindikationen als Mastektomie durchgeführt. 80-90% der Tumoren gelten als operabel. Der Operation schließt sich in der Regel die Dissektion der Axilla an, wobei die Bedeutung der Biopsie des sog. Wächterlymphknotens zunimmt. Gemäß den Empfehlungen von St. Gallen kann bei negativer Biopsie des axillären

Wächterlymphknotens auf eine Dissektion verzichtet werden (Goldhirsch et al. 2005).

Die Brust erhaltende Operation mit nachfolgender Bestrahlung ist der Ablatio mammae in prognostischer Hinsicht ebenbürtig, sofern keine der folgenden Kontraindikationen vorliegen: Tumordurchmesser größer/gleich 3cm, inflammatorisches oder multifokal auftretendes oder ausgedehnt wachsendes intraduktales Karzinom oder Lymphangiosis cutis. Eventuell kann durch die Applikation einer neoadjuvanten Chemotherapie eine Verkleinerung eines primär nicht Brust erhaltend operablen oder sogar inoperablen Primärtumors erreicht werden, so dass eine Mammateilresektion – je nach Befund in Form einer Lumbektomie oder aber als Quadrantenresektion – bzw. eine kurative Mammaablation in einem zweiten Ansatz doch noch ermöglicht wird. Nach einer Mammateilresektion schließt sich eine Radiatio der Restbrust immer, nach einer Ablatio mammae nur bei hohem Risiko für ein Lokalrezidiv an. Nach den Empfehlungen von St. Gallen wird Frauen mit mind. 4 Lymphknotenmetastasen oder einem Tumorstadium pT3 oder pT4 ein hohes Risiko für ein Lokalrezidiv zugeschrieben.

Beim primär nicht metastasierten Mammakarzinom gilt es, eine spätere Metastasierung, die eine kurative Therapie unmöglich machen würde, auf jeden Fall zu verhindern. Aus diesem Grunde wird nach der chirurgischen Behandlung generell die Durchführung einer systemischen Therapie empfohlen.

Die Wahl der systemischen Therapie richtet sich dabei nach dem erwarteten individuellen Rückfallrisiko der Patientin, das ihr aufgrund verschiedener Prognosefaktoren zugeschrieben wird. Entscheidend sind das Ausmaß des axillären Lymphknotenbefalls, die hormonelle Empfindlichkeit des Tumors (erkennbar an seinem Steroidrezeptorstatus) sowie die Tumorgröße bzw. das Tumorstadium, Grading, Alter der Patientin und neuerdings – entsprechend der letzten Konsensuskonferenz von St. Gallen – auch das Vorhandensein einer Gefäßinvasion und einer HER2-Überexpression.

Bei HER2 handelt es sich um ein in 20 bis 30% aller invasiven Mammakarzinome als Transmembranprotein mit Tyrokinaseaktivität exprimiertes Protoonkogen, welches mit einer relativen Verschlechterung der Prognose einhergeht (Braun et. al. 2002). Trastuzumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der bereits Zulassung in der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms erlangt hat, vermag diesen Rezeptor zu blockieren und führt so einerseits zur Hemmung der mitogenen Signalkaskade, andererseits zur Aktivierung der körpereigenen zellulären Zytotoxität (Yarden 2001).

Der Einsatz dieses Antikörpers scheint, wie im Oktober 2005 im New England Journal of Medicine publiziert wurde, auch im Rahmen eines adjuvanten Settings die Prognose des Mammakarzinoms signifikant zu verbessern (Romond et al. 2005, Piccart-Gebhart et al. 2005). Der routinemäßige Einsatz wird derzeit diskutiert.

Weitere mögliche prädiktive Faktoren sind uPA und PAI-1. Es handelt sich dabei um tumorassoziierte Proteolysefaktoren, die in Zusammenarbeit mit dem Oberflächenrezeptor uPA-R eine Schlüsselfunktion bei Signaltransduktion, Adhäsion und Migration von Tumorzellen spielen und mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko bzw. einer verkürzten Überlebenszeit einhergehen. Durch Bestimmung dieser beiden Proteolysefaktoren können Patientinnen mit einem hohen Rezidivrisiko unter den nodalnegativen Frauen identifiziert werden. Damit könnten PAI-1 und uPA zukünftig möglicherweise eine Rolle in der Entscheidung über die Applikation einer adjuvanten Chemotherapie bei nodalnegativen Frauen erlangen (Harbeck et al. 2001, Prechtl 2000, Harbeck 2004), wenngleich die routinemäßige Bestimmung beider Faktoren vorerst nicht empfohlen wird (Thürlimann u. Senn 2005).

Die adjuvante Therapie des Mammakarzinoms sollte sich an der Konsensus-Empfehlung von St. Gallen orientieren (Thürlimann u. Senn 2005, Goldhirsch et al. 2005):
Patientinnen mit zugeschriebenem niedrigem Rückfallsrisiko, also Frauen mit einem Mindestalter von 35 Jahren, die keinen Lymphknotenbefall aufweisen,

deren Tumor histologisch gut differenziert ist, kein HER2 überexprimiert sowie hormonrezeptorpositiv ist, eine Größe von 2 cm nicht überschreitet und kein Gefäß arrodiert, sollten eine Tamoxifenbehandlung über mindestens 5 Jahre erhalten. Bei prämenopausalen Frauen stellen die strahlentherapeutische und medikamentöse Ausschaltung der Ovarialfunktion, letztere erreichbar durch eine mindestens 2jährige Therapie mit dem GnRH-Analogon Goserelin, weitere Optionen dar.

Frauen, die entweder bis zu 3 befallene Lymphknoten aufweisen oder deren Tumor entweder HER2 überexprimiert oder ein Gefäß arrodiert, erfüllen die Einschlusskriterien der Niedrigrisikogruppe nicht vollständig. Diese Patientinnen werden einer Gruppe mit intermediärem Risiko zugeordnet. Ihnen wird entweder eine Hormontherapie mit Tamoxifen – bei prämenopausalen Frauen alternativ dazu oder auch zusätzlich noch medikamentös mit einem GnRH-Analogon – oder aber eine kombinierte chemoendokrine Therapie empfohlen, sofern ein positiver Steroidrezeptorstatus vorliegt. Insgesamt scheint sich bei der kombinierten chemoendokrinen Therapie ein Vorteil abzuzeichnen. Die Tamoxifen-Therapie sollte jeweils erst nach Abschluss der Chemotherapie erfolgen.

Für postmenopausale Patientinnen, welche der Hochrisikokategorie zuzurechnen sind, also Frauen mit positiven Lymphknoten und HER2-Überexpression sowie mit mehr als 3 befallenen Lymphknoten, wurde während der letzten Konsensuskonferenz vorgeschlagen, im Rahmen der chemoendokrinen Therapie einen Aromatasehemmer zu einem essenziellen Bestandteil der Behandlung zu machen (Thürlimann u. Senn 2005).

Allen Patientinnen mit hormonrezeptornegativen Tumoren wird generell eine Polychemotherapie empfohlen.

Generell gilt, dass die Auswahl der adjuvanten Therapie anhand individueller Kriterien nach Abwägung von Nutzen und Risiko erfolgen sollte.

Insgesamt werden zwei Stufen zytoxischer Therapieschemata unterschiedlicher Effektivität unterschieden. Zu den Schemata mit „standardmäßiger Effektivität“ werden das CMF-Schema – eine Kombination der Zytostatika

Cyclophosphamid, Methotrexat und 5'-Fluorouracil – sowie das AC-Schema – eine Kombination aus Adriamycin und Cyclophosphamid – gerechnet.

Schemata wie FA(E) – eine Kombination von 5'-Fluorouracil und einem Anthrazyklin –, CA(E)F – eine Kombination aus Cyclophosphamid, einem Anthrazyklin und 5'-Fluorouracil –, A(E)-CMF – die sequenzielle Gabe eines Anthrazyklins zusätzlich zum CMF-Schema – sowie taxanhaltige Schemata wie das TAC-Schema – eine Kombination aus einem Taxan, Adriamycin und Cyclophosphamid – gelten als überlegen, sind jedoch teurer, komplexer und in der Regel mit einem höheren Risiko an unerwünschten Wirkungen behaftet (Piccart et al. 2005).

#### 1.1.3.2 Die palliative Therapie

Von der adjuvanten bzw. neoadjuvanten Therapie streng zu unterscheiden ist die palliative Therapie beim bereits generalisiert metastasierten Mammakarzinom. Das metastasierte Mammakarzinom ist als unheilbare Erkrankung anzusehen; eine kurative Therapie ist in diesem Stadium nicht mehr möglich. Die heutigen Therapieansätze haben – trotz Einführung neuer Substanzklassen – allesamt nur palliativen Charakter, ein lebensverlängernder Effekt ist nicht eindeutig belegt. Die Indikation zum Einsatz einer systemischen Therapie sollte auch hier zur Beurteilung der Progressionskinetik der Erkrankung nach der individuellen Risikoevaluation erfolgen. Ein niedriges Risiko von Seiten der metastasierten Tumorerkrankung liegt vor bei positivem Hormonrezeptorstatus, einem mindestens zwei Jahre angedauerndem krankheitsfreiem Intervall und einer begrenzten Metastasierung in Weichteile und Knochen ohne Befall lebenswichtiger Organe. In diesem Fall stellt ein Aromatasehemmer der dritten Generation nach adjuvanter Behandlung mit Tamoxifen die erste Wahl bei postmenopausalen Frauen dar. Bei prämenopausalen Frauen stehen die kombinierte GnRH- und Tamoxifengabe sowie die kombinierte GnRH- und Aromatasehemmergabe als endokrine

Therapieoptionen zur Verfügung, wobei die Applikation von GnRH-Analoga einer Ovarektomie gleichzusetzen ist.

Allen anderen Patientinnen wird primär eine Chemotherapie empfohlen. Bei Frauen mit positivem HER2-Rezeptorstatus kann eine Kombination von Trastuzumab mit Chemotherapeutika oder aber auch eine alleinige Therapie mit Trastuzumab in Erwägung gezogen werden.

Prinzipiell wird die Indikation für eine zytostatische Monotherapie in einer nur langsamen, nicht lebensbedrohlichen Progression der Erkrankung sowie bei Ineffektivität der endokrinen Therapie gesehen; eine Polychemotherapie wird bei hohem Remissionsdruck gefordert.

## 1.2 Zytostatika

Bei Zytostatika handelt es sich um sehr heterogene Substanzen, deren gemeinsames Merkmal ihr Einsatz in der antitumorösen Therapie ist. Zytostatika wirken nicht spezifisch auf entartete, sondern auch auf gesunde Zellen und rufen dadurch teilweise sehr gravierende Nebenwirkungen hervor. Häufig werden verschiedene, synergistisch wirkende Zytostatika miteinander kombiniert mit dem Ziel einer Wirkungssteigerung sowie einer Verzögerung der Resistenzentwicklung.
Im Folgenden soll auf die beiden im Rahmen des CMF-Schemas eingesetzten Antimetabolite 5'-Fluorouracil und Methotrexat eingegangen werden.

### 1.2.1 Methotrexat

Methotrexat ist eine in der Onkologie weit verbreitete Substanz. So wird Methotrexat außer in der Therapie des Mammakarzinoms auch in der Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie, des Chorionkarzinoms, des Osteosarkoms, des Zervix-, Ovarial-, des kleinzelligen Bronchialkarzinoms sowie bei ZNS-Tumoren, Non-Hodgkin-Lymphomen und Plattenepithel-

karzinomen im Kopf-Hals-Bereich eingesetzt. Außerdem besitzt Methotrexat aufgrund der immunsuppressiven Wirkung Bedeutung in der Therapie rheumatischer Erkrankungen. Methotrexat wirkt spezifisch auf die S-Phase des Zellzyklus. Methotrexat gelangt in Konzentrationen unterhalb von 20 - 50 µM über ein aktives Transportsystem, welches physiologisch von $N^5$-Methyltetrahydrofolat verwandt wird, in die Zelle (Zeller 2001). In einem darüber hinausgehenden Konzentrationsbereich erfolgt die Aufnahme durch passive Diffusion. Aufgrund des Ersatzes der OH-Gruppe in Position 4 durch eine Aminogruppe besitzt Methotrexat eine höhere Affinität zur Dihydrofolat-Reduktase als deren physiologisches Substrat Folsäure. Dadurch wird dieses Enzym reversibel gehemmt, was zu einer Akkumulation von Polyglutamaten und zu einer Blockade der Reduktion von Dihydrofolsäure zu Tetrahydrofolsäure führt. Wegen des Mangels an Tetrahydrofolsäure können verschiedene Folgereaktionen nicht stattfinden; etwa die Bildung von Methylentetrahydrofolsäure. Es fehlt somit das Substrat, um eine Methylengruppe auf Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) zu übertragen und um dadurch Desoxythymidintriphosphat zu synthetisieren. Außerdem wird der C1-Gruppen-Donor N10-Formyl-Tetrahydrofolsäure weniger gebildet, wodurch die Purinsynthese gehemmt wird: Neben der Tetrahydrofolsäureerschöpfung spielt auch die Akkumulation von Polyglutamaten für die Zytotoxität eine bedeutende Rolle, wodurch durch Inhibition der Enzyme Thymidilat-Synthetase, Glycinamid-Ribonukleotid-Transformylase, Aminoimidazol-Carboxamid-Ribonukleotid-Transformylase die Nukleotid-Synthese beeinträchtigt wird (Zeller 2001). Letztendlich sistiert die DNA-Synthese. Es kommt zu einer ineffektiven Reparatur sowie zu Strangbrüchen durch Fehleinbau von Uracil anstelle von Thymin in die DNA.

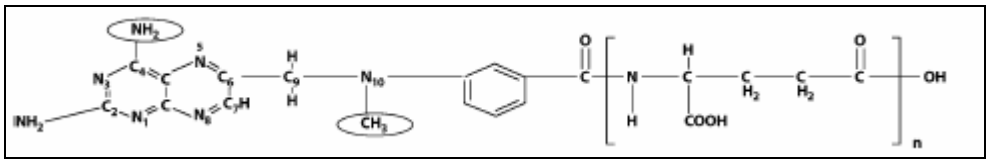

**Abb. 1:**

**Methotrexat (4-Amino, 4-desoxy, N-10-methylpteroylglutaminsäure)**

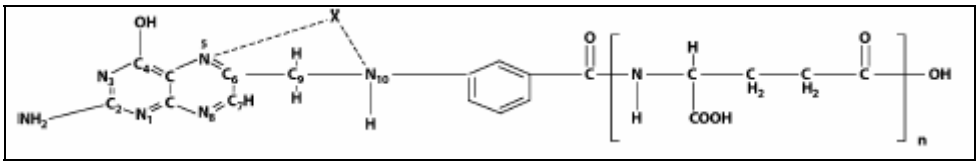

**Abb. 2:**

**Folsäure (Pteroylmonoglutaminsäure)**

### 1.2.2 5'-Fluorouracil

5'-Fluorouracil wird neben der Therapie des Mammakarzinoms bei gastrointestinalen Malignomen sowie in der Behandlung von malignen Tumoren im Kopf- und Halsbereich eingesetzt. 5'-Fluorouracil penetriert durch dasselbe Transportsystem wie Uracil in die Zelle und ist selbst nicht aktiv, sondern muss intrazellulär als ‚prodrug' erst in die entsprechenden Ribonukleotide oder Desoxyribonukleotide umgewandelt werden, bevor es seine Wirkung entfalten kann. Als Pyrimidinanalogon unterscheidet sich 5'-Fluorouracil von Uracil nur durch die Substitution eines Wasserstoffatoms durch ein Fluoratom in Position 5 des Pyrimidinrings. 5'-Fluorouracil werden drei verschiedene Angriffspunkte zugeschrieben (Sampath 2003):

1. 5'-Fluorouridintriphosphat wird als falscher Metabolit anstelle von Uridintriphosphat in die RNA eingebaut, wodurch die Proteinsynthese gehemmt wird.
2. Der falsche Metabolit Fluorodesoxyuridintriphosphat wird anstelle von Desoxythymidintriphosphat, einem der vier für die DNA-Synthese

essenziellen Desoxyribonukleotide, in die DNA eingebaut. Als Folge davon kommt es zu Einzelstrangbrüchen.

3. 5'-Fluorouracil verhindert durch Inhibition der Thymidylat-Synthetase die DNA-Synthese wie folgt: Bei der Synthese von Thymidilat, einer Vorstufe von dTTP; bilden Desoxyuridinmonophophat, N5, N10-Methylentetrahydrofolat und die Thymidilat-Synthetase einen kovalenten Komplex, wobei normalerweise die Methylengruppe von N5, N10-Methylentetrahydrofolat auf die Position 5 des Pyrimidinrings von dUMP übertragen wird. Da das Fluoratom in Position 5 stabiler als das physiologische Wasserstoffatom an den Pyrimidinring gebunden ist, unterbleibt der Ersatz des Wasserstoffatoms durch die Methylengruppe an dieser Position. Es bildet sich ein stabiler Komplex der 3 Substanzen, wodurch die Thymidilat-Synthetase gehemmt wird und somit letztendlich weniger dTTP gebildet wird, was die Inhibition der DNA-Replikation zur Folge hat.

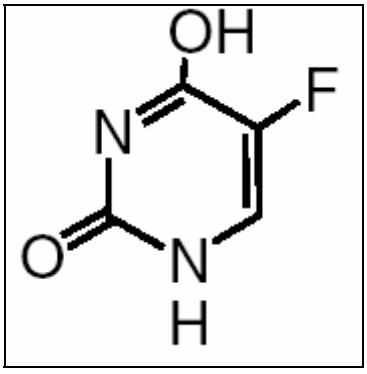


**Abb. 3:**

**5'-Fluorouracil (5-Fluoro-1H, 3H-pyrimidin-2.4-dion)**

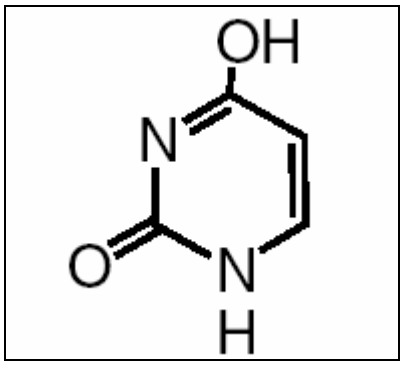


**Abb. 4:**
**Uracil (Pyrimidin-2.4-dion)**

### 1.2.3 Zytostatika und Genexpression

Chemotherapeutika wirken über die verschiedensten Mechanismen. Einige Chemotherapeutika fungieren als Antimetabolite und vermitteln ihre Wirkung über die Inhibition der Synthese von Nukleinsäuren. Andere hingegen wirken über die Interkalation der DNA; wieder andere stören die dynamischen Umbildungsvorgänge der Mikrotubulusstrukturen und somit die Ausbildung eines funktionsfähigen Spindelapparates. Alle diese Mechanismen sind an der Vermittlung der zytostatischen Effekte beteiligt; neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Wirkungen der einzelnen Substanzen weitaus komplexer sind als bisher angenommen und dass empirisch gewonnene Daten keine hinreichende Begründung für eine zytostatische Kombinationstherapie darstellen. Trotz der auf den ersten Blick sehr voneinander differierenden Angriffspunkte münden die verschiedenen Zytostatika häufig in eine gemeinsame Endstrecke, die Apoptose. Hierunter versteht man ein physiologisches intrazelluläres Selbstmordprogramm der Zelle, welches mit charakteristischen morphologischen Veränderungen – wie der DNA-Fragmentierung – vergesellschaftet ist.
Für viele der Zytostatika konnte an unterschiedlichen Zelllinien gezeigt werden, dass sie Veränderungen in der Genexpression bewirken. Diese Veränderungen

haben Effekte auf die intrazelluläre Signaltransduktion und bewirken häufig – jedoch nicht immer – die Induktion von Apoptose. Die einzelnen Signalkaskaden sind jedoch nur teilweise verstanden, die Zusammenhänge oft unklar. Bekannt ist jedoch, dass Zytostatika häufig zu Veränderungen in der Genexpression führen: In einer Brustkrebs-Zelllinie konnte eine durch Zytostatikaapplikation verminderte Espression von c-myc mit nicht-apoptotischem Zelltod in Verbindung gebracht werden (Magnet et al. 2001, Fornari et al. 1996). In Mäuse-Thymozyten (Eichhorst et al. 2001) ebenso wie in Lebermetastasen eines Kolonkarzinoms (Backus et al. 2001) wurde durch 5'-Fluorouracil Apoptose induziert über eine vermehrte Expression von CD95 und dem CD95-Liganden. Jedoch wurden auch CD95-unabhänige Mechanismen im Zusammenhang mit dem programmierten Zelltod beschrieben (Jiang et al. 1999). Der Tumorsuppressor p53 scheint eine Rolle – wenn auch keine Vorreiterrolle (Yukimoto et al. 2001) – in der 5'-Fluorouracil-induzierten Apoptose zu spielen: So wird in Kolonkarzinom-Zellen in Abhängigkeit von p53 die Ferredoxin-Reduktase vermehrt exprimiert, was in Mitochondrien zu vermehrtem oxidativen Stress führt und letztendlich die Zellen in Apoptose überführt (Hwang et al. 2001). Prinzipiell ist es denkbar, dass Zytostatika über Veränderungen der Expression verschiedenster Gene Einfluss nehmen auf Schlüsselfunktionen der Zellen wie Apoptose oder Tumorgenese. Eine bedeutende Rolle hierbei wird verschiedenen kleinen G-Proteinen zugeschrieben.

## *1.3 Kleine G-Proteine*

### 1.3.1 Struktur und Funktion

Unter den kleinen G-Proteinen versteht man monomere Moleküle mit einer Masse zwischen 20 und 40kDa, welche Guanin-Nukleotide binden, hydrolysieren und auf diese Weise eine Vielzahl verschiedener Prozesse

kontrollieren (Paduch et al. 2001). Viele der kleinen G-Proteine müssen posttranslationell modifiziert werden, um ihre Funktionsfähigkeit zu erlangen.

Die G-Domäne, wie der Ort der Nukleotidbindung und GTPase-Aktivität auch bezeichnet wird, umfasst etwa 200 Aminosäuren, befindet sich im Kern eines jeden G-Proteins und ist typisch für die ganze Überfamilie: Die G-Domäne setzt sich zusammen aus 6 β-Faltblättern und 5 α-Helices, welche wiederum 5 Schleifen (G1-G5) ausbilden. Diese Schleifen, welche die Stelle der Guanin-Nukleotid-Bindung ausbilden, sind die am besten konservierten Elemente dieser Domäne und definieren die gesamte Familie der G-Proteine (Sprang 1997a, Sprang 1997b).

Der aktive und inaktive Zustand der kleinen G-Proteine wird durch die GTP- bzw. GDP-gebundene Form dieser Moleküle definiert. Ein vorgeschaltetes Signal bedingt die Dissoziation von GDP von der GDP-gebundenen Form des kleinen G-Proteins; nachfolgend erfolgt die Bindung von GTP. Kleine G-Proteine fungieren als molekulare Schalter, welche ein Signal stromaufwärts liegenden Ursprungs durch Beeinflussung eines Effektors umsetzen (Takai et. al 2001). Verschiedene regulatorische Protein-Familien sind am Wechsel zwischen aktivem und inaktivem Zustand der kleinen G-Proteine beteiligt.

Bislang sind über 150 kleine G-Proteine bekannt. In Abhängigkeit von Struktur, Sequenz und Funktion lassen sich diese in mindestens 5 Familien unterteilen: Ras, Rho, Rab, Arf und Ran. Mitglieder der Ran-Familie regulieren den nukleozytoplasmatischen Transport und die Organisation der Mikrotubuli. Arf-GTPasen regulieren das sog. Vesikel-Trafficking. Sowohl Ras- als auch Rho-GTPasen regulieren Schlüssel-funktionen der Zellen wie Wachstum, Apoptose, Fettstoffwechsel und Regulation der Transkription.

Die β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors, ein kleines G-Protein, das im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht und über dessen genaue Funktion noch Unklarheiten bestehen, lässt sich jedoch keiner dieser Familien eindeutig zuordnen.

### 1.3.2 Kleine G-Proteine und die β-Untereinheit des Signalerkennungspartikel-rezeptors - ein Vergleich

Es konnte aus S. cerevisiae erstmalig die Kristall-Struktur der GTP-bindenden β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors dargestellt werden (Schwartz u. Blobel 2003). Abbildung 5 zeigt die Struktur des Komplexes, bestehend aus der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors (blau), der SRX-Domäne der α-Untereinheit (rot) entsprechend dem Effektor und GTP (gestrichelt):

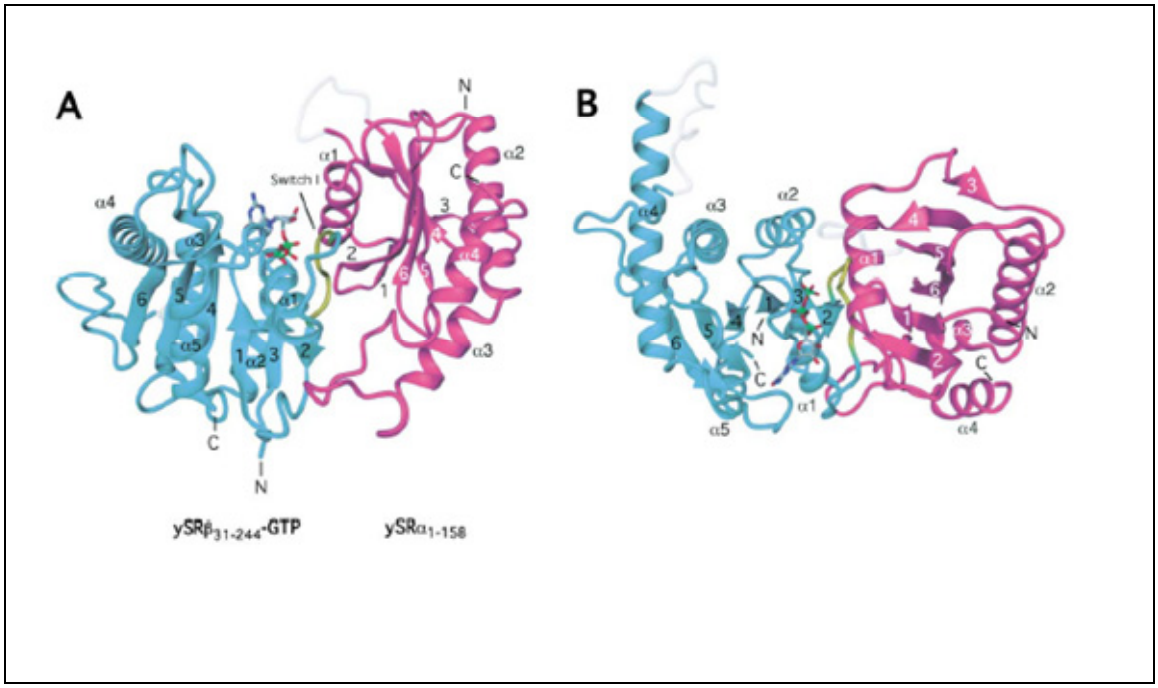


**Abb. 5:**

**Struktur des Komplexes, bestehend aus der β-Untereinheit des Signalerkennungs-partikelrezeptors (blau), der SRX-Domäne der α-Untereinheit (rot) entsprechend dem Effektor und GTP (gestrichelt). Residuen 64-72 der β-Untereinheit des Signal-erkennungspartikelrezeptors (gelb) bilden die Hauptinteraktionsseite mit der α-Untereinheit; diese Region beinhaltet Switch 1. Sekundärstrukturen genauso wie C- und N-terminale Enden sind markiert. Unstrukturierte Schleifen sind grau dargestellt. Abbildung B ist gegenüber Abbildung A um 90° im Gegenuhrzeigersinn um die Horizontalachse gedreht.**

**(Abbildung aus Schwarz u. Blobel 2003)**

Aufgrund der typischen Faltblatt-Helix-Struktur teilt die β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors die Charakteristika der kleinen G-Proteine.
In Abbildung 6 lassen sich die GTP-bindenden Domänen von SRβ und einer GTPase der Ras-Familie annähernd kongruent übereinander liegend darstellen. Dies weist auf eine signifikante Homologie zwischen beiden GTPasen hin.

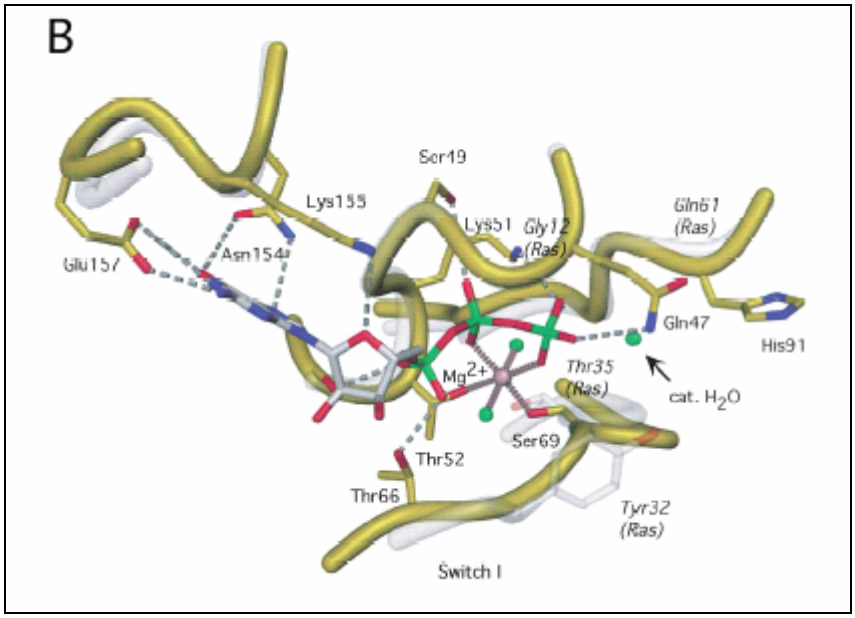


**Abb. 6:**
**Vergleich der GTP-bindenden Domänen von SRβ und Ras unter Auslassung von Seitenketten. Nukleotid-bindende Stellen sind jeweils als Röhren dargestellt, wobei die SRβ und Ras grau dargestellt sind.**
**(Abbildung aus Schwartz u. Blobel 2003)**

Auch ein Vergleich der Konsensussequenzen belegt die Zugehörigkeit von SRβ zur Familie der kleinen G-Proteine (Legate u. Andrews 2003; Miller et al. 1995). Abbildung 7 zeigt Homologien in den Aminosäuresequenzen von Ras, Sar-1, ARF und der SRβ auf:

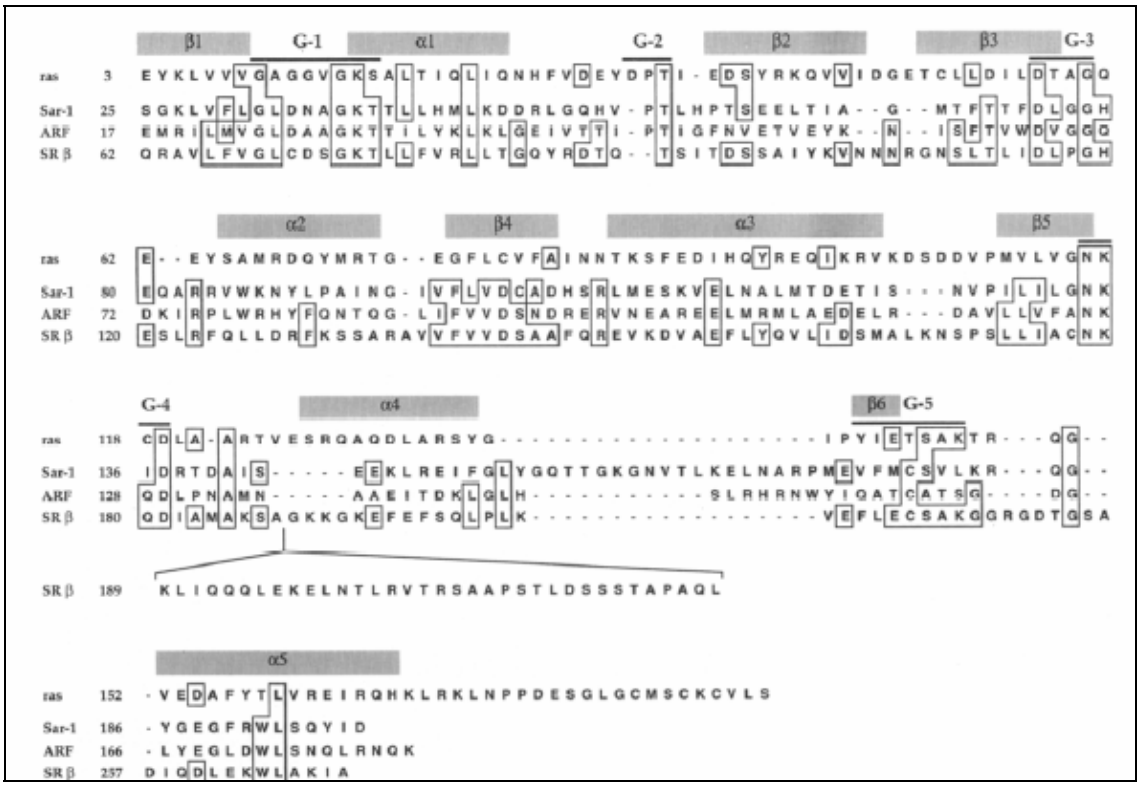


**Abb. 7:**

**Vergleich der Aminosäuresequenz von SRβ mit den Sequenzen von Ras, Sar-1 und ARF. Die Homologien belegen die Verwandtschaft der 4 aufgezeigten GTPasen. Außerdem dargestellt: die GTPase-Motive G1-G5 sowie potenzielle Übereinstimmungen zwischen den Sekundärstrukturen von SRβ und Ras. Alle Sequenzen entstammen Säugetierzellen.**

**(Abbildung aus Miller et al. 1995)**

Die Bindungsart zwischen SRβ und dem dazugehörigen Effektor, SRX der α-Untereinheit, zeigt ebenfalls große Übereinstimmungen mit typischen Ras-GTP/Effektor-Komplexen und Arf-GTP/Effektor-Komplexen auf:

In Abbildung 8 findet sich in schematischer Darstellung ein Vergleich des SRβ-GTP/SRX-Komplexes mit einem Arf-GTP/Effektor-Komplex sowie einem Ras-GTP/Effektor-Komplex:

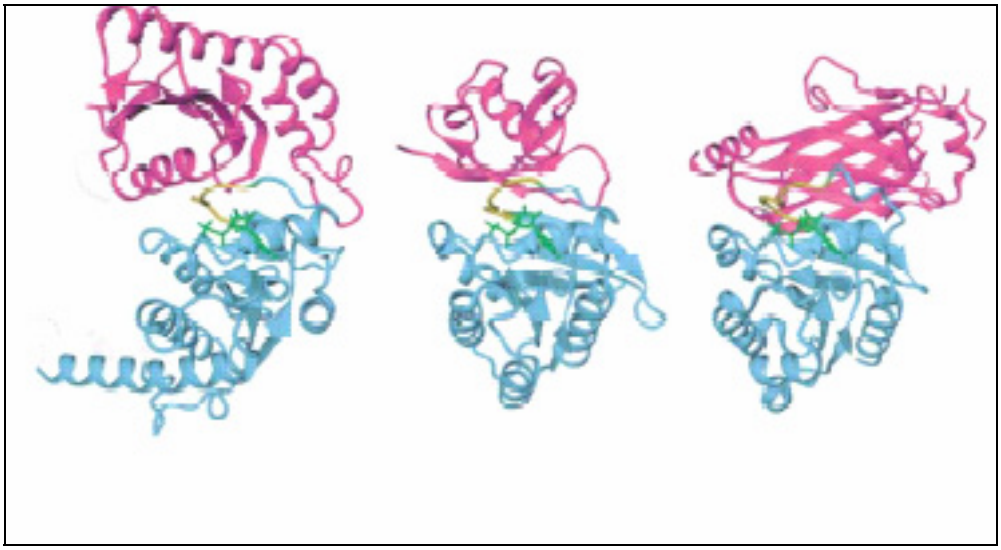

**Abb. 8:**
**Vergleich des Effektor-Komplexes von SRβ-GTP/SRX mit dem der GTPasen vom Ras- und Arf-Typ. Exemplarische Darstellung von Ras-GTP/Ral/GDS als Beispiel eines Ras-GTP/Effektor-Komplexes, Arl2-GTP/PDEδ als Beispiel eines Arf-GTP/Effektor-Komplexes.**
**Der SRβ-GTP/SRX Komplex stimmt mit typischen G-Protein/Effektor-Komplexen strukturell überein.**
**Von links nach rechts: SRβ-GTP/SRX, Ras-GTP/Ral/GDS, Arl2-GTP/PDEδ. Die GTPase-Domänen wurden übereinander gelegt und in der gleichen Orientierung dargestellt. GPTase-Domänen sind blau, Effektor-Domänen rot, Switch-1-Regionen gelb und gebundene Nukleotide grün dargestellt. (Abbildung aus Schwartz u. Blobel 2003)**

Trotz der zuvor aufgeführten Gemeinsamkeiten mit den kleinen G-Proteinen weist die SRβ einige strukturelle Besonderheiten auf, aufgrund derer keine eindeutige Zuordnung zu einer der Familien erfolgen kann:

Charakteristisch für SRβ ist eine verlängerte Helix α4, die sich aus dem Proteinkern vorwölbt. Das C-terminale Ende dieser Kette verbindet sich nach Ausbildung einer Schleife wieder mit dem Kern.

Weiterhin wird die β-Untereinheit durch eine aminoterminale transmembrane Domäne fest in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums verankert; andere GTPasen vom Ras-Typ hingegen gehen jeweils nur reversible Bindungen mit Membranen ein.

Außerdem befindet sich bei der β-Untereinheit – zumindest bei höher entwickelten Eukaryoten – in der G1-Konsensus-Sequenz die Aminosäure Cystein an der Stelle, an der sich bei fast allen anderen GTPasen vom Ras-Typ die Aminosäure Glycin befindet.

Eine weitere Ausnahme findet sich in GTPasen vom Arf-Typ, diese Position wird hier durch die Aminosäure Asparaginsäure besetzt.

Es wird vermutet, dass der Austausch von Glycin durch Cystein in der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors mit einer schnelleren und stabileren Bindung von GTP an die β-Untereinheit einhergeht; die Affinität zu einem bestimmten Nukleotid scheint hierdurch jedoch nicht beeinflusst zu werden (Legate u. Andrews 2003).

Diese stabile Bindung zu GTP würde auch die Tatsache erklären, dass sich die SRβ als einzige GTPase in der GTP-gebundenen Form aufreinigen lässt (Legate u. Andrews 2003). Die Vermutung liegt nahe, dass SRβ katalytisch inert ist – eine Eigenschaft, durch die sich die Arf-Unterfamilie im Gegensatz zu anderen kleinen G-Proteinen der Ras-Familie auszeichnet (Schwartz u. Blobel 2003)

Die größte Verwandtschaft scheint somit zu Ras- und Arf/Sar-GTPasen zu bestehen. Besonders erstgenannter Familie kommt eine Schlüsselfunktion in der Kontrolle von Apoptose und Zellwachstum zu.

Diese strukturelle Verwandtschaft lässt eine ähnliche Funktion der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors vermuten, wenngleich die Bedeutung von SRβ bislang hauptsächlich in der Signalerkennung gesehen wurde.

## 1.4 Signalerkennung und Signalerkennungspartikelrezeptor

### 1.4.1 Das Prinzip der Signalerkennung

Jedes Organell bedarf eines ständigen Nachschubes an Proteinen und Lipiden – sei es zur Funktionserhaltung, zur Organellduplizierung im Rahmen der Zellteilung oder zur Sezernation. Während Mitochondrien, Peroxisomen und das Endoplasmatische Retikulum diese Stoffe direkt aus dem Zytoplasma beziehen, werden der Golgi-Apparat, die Lysosomen und die Kernmembran mit Proteinen und Lipiden über das Endoplasmatische Retikulum indirekt beliefert. Von entscheidender Bedeutung ist die zielsichere Verteilung dieser Substanzen an den Ort ihrer Bestimmung, was unter anderem durch das Zusammenspiel der GTPasen ‚Signalerkennungspartikel' und ‚Signalerkennungspartikel-rezeptor' ermöglicht wird. SRP erkennt das Signalpeptid, eine Teilsequenz von 15 bis 30 Aminosäuren am N-terminalen Ende des für das ER bestimmten Peptids, sobald es aus dem Ribosom heraustritt. Alsbald tritt eine Bindung zwischen beiden ein. Hierdurch wird eine Verlangsamung der Proteinsynthese bis zum Anbinden an den in der ER-Membran verankerten SR bewirkt. Bei dem Signalerkennungspartikelrezeptor handelt es sich um ein Heterodimer, das sich aus einem 70kDa peripheren Membranprotein, SR$\alpha$, und einem 29,7kDa integralen Membranprotein, SR$\beta$, zusammensetzt; SR$\alpha$ wird indirekt über SR$\beta$ mit der ER-Membran verankert.

Nach dem Andocken an SR wird SRP wieder freigesetzt, die Proteinsynthese wieder aufgenommen und die wachsende Polypeptidkette durch ein in der Membran verankertes Translokon – gebildet von dem Sec61p-Komplex – in das ER-Lumen freigesetzt oder aber – je nach seiner Bestimmung in Abhängigkeit von eventuell weiteren vorhandenen Signalsequenzen – in der Membran verankert (Walter et al. 2001).

Folgendes Modell wird im Einzelnen für das Targeting vermutet:

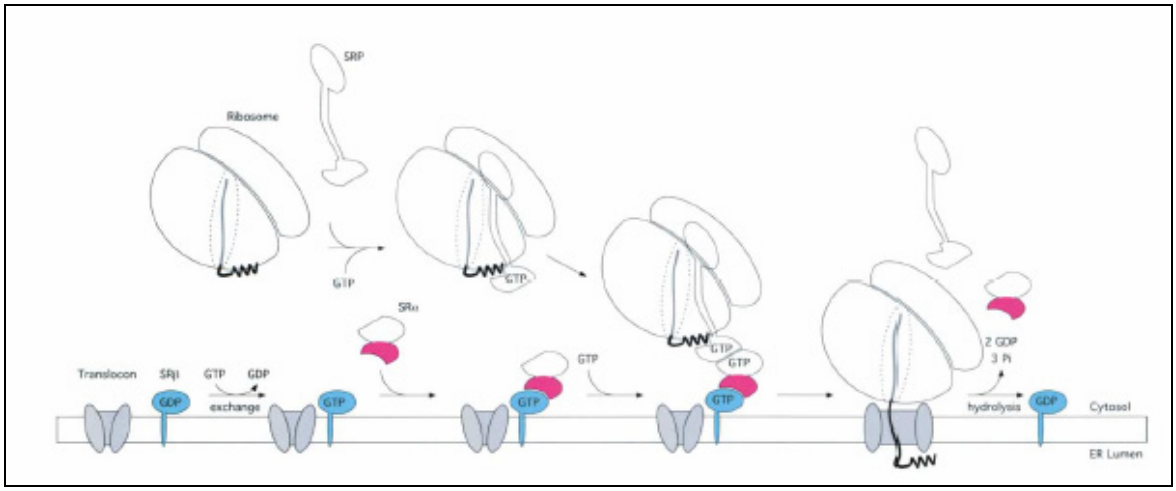


**Abb. 9:**

**Modell für die SRβ-vermittelte Regulation des SRP-abhängigen Protein-Targetings zum Endoplasmatischen Retikulum. Erklärung im Text.**

**(Abbildung aus Schwarz u. Blobel 2003)**

Die GTPase des Signalerkennungspartikels, SRP54, bindet an die Signalsequenz, welche aus dem Ribosom entsteht; es bildet sich ein Komplex aus Ribosom, Signalerkennungspartikel und wachsender Polypeptidkette; die Translation wird vorübergehend ausgesetzt. Dieser Komplex wird aufgrund seiner Affinität zu dem zugehörigen Rezeptor, der β-Untereinheit, die auf der Oberfläche des ERs lokalisiert ist, zur Membran des Endoplasmatischen Retikulums geleitet. SRβ bleibt in die Membran integriert und muss durch einen noch unbekannten Faktor mit GTP beladen werden, um an die Bindungsdomäne SRX (rot dargestellt) der α-Untereinheit binden zu können.

In dem Komplex aus SR, SRP und Ribosom sind alle drei GTPasen mit GTP beladen; der Komplex ist somit bereit zur Translokation. Die Signalsequenz wird zum Translokon transferiert, SRP und beide Untereinheiten des Rezeptors dissoziieren, und die Protein-Elongation wird wieder aufgenommen.

Über die nachfolgende Hydrolyse von GTP ist bislang noch wenig bekannt, möglicherweise ist eine Hydrolyse von SRβ-GTP nicht zwingend erforderlich (Fulga et al. 2001). Durch die Beteiligung der drei GTPasen wird sichergestellt,

dass es sich bei der Translokation um einen unidirektionellen Prozess handelt (Millman, et al. 1997; Legate u. Andrews 2003).

### 1.4.2 Die β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors

Die Funktion der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors, dessen NH2-terminales Transmembransegment mit der Membran verbunden und dessen COOH-terminale GTPase-Domäne dabei der Cytosolseite des ER zugewandt ist, bleibt nach dem derzeitigen Forschungsstand ungeklärt. Fest steht, dass SRβ GTP mit einer hohen Affinität bindet und mit dem Ribosom zu interagieren vermag, welches wiederum dessen GTPase-Aktiviät erhöht und gleichzeitig die Affinität für Guanin-Nukleotide vermindert; das Ribosom scheint also SRβ in seiner Nukleotid-freien Form zu stabilisieren. Das Vorhandensein des Translokons wiederum scheint die Interaktion zwischen Ribosom und SRβ, vermutlich durch direkte Bindung an das Ribosom, zu destabilisieren, wodurch eine Bindung von GTP an SRβ ermöglicht wird. Diese Bindung ist unabdingbar für die Freisetzung der Signalsequenz vom SRP und den Transfer zu dem Sec61p-Komplex. Liegt hingegen SRβ nur in der GDP-gebundenen oder in der freien Form vor, so bleibt die Signalsequenz an SRP gebunden; fehlt Sec61p, so wird der GDP-gebundene Zustand durch das Ribosom stabilisiert und die Signalsequenz bleibt ebenfalls an SRP gebunden.
Zuletzt dissoziiert SRP nach der Freisetzung des Peptides von SR unter Hydrolyse von GTP (Fulga et al. 2001, Legate et al. 2000).
Diese Vorgänge lassen darauf schließen, dass SRβ die Freisetzung der Signalsequenz vom SRP sowie deren nachfolgenden Eintritt in das Translokon koordiniert und einen zielsicheren spezifischen Transfer gewährleistet.
Der Verankerung der SRβ mit dem ER scheint dabei jedoch nur eine nachrangige Bedeutung zuzukommen, nachdem SRβ auch ohne eine transmembrane Domäne funktionstüchtig ist (Ogg et al. 1998).

## 1.5 Zielsetzung

Wie bereits erwähnt, üben die beiden im CMF-Schema enthaltenen Antimetabolite 5'-Fluorouracil und Methotrexat ihre Wirkungen nicht nur über die Hemmung einzelner Enzyme aus, sondern vermögen, auch die Genexpression verschiedener maligner Zellen bzw. Zelllinien zu verändern. Die molekularbiologischen Angriffspunkte sind jedoch sehr vielgestaltig, oft nur teilweise verstanden und manchmal sogar noch vollkommen unklar. Daher erhofft man sich, durch neue molekularbiologische Erkenntnisse langfristig die zytostatische Therapie bei einer möglichst geringen Rate an Nebenwirkungen zu optimieren und das Leben der Patienten zu verlängern.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Veränderungen der Genexpression zu untersuchen, die durch MTX und 5'-FU in Mammakarzinom-Zellen bewirkt werden.

# 2 Materialien und Methoden

## 2.1 Materialien

### 2.1.1 Chemikalien

**Agarose**, Appligene Oncor, Heidelberg

**Ammoniumperoxosulfat (APS),** Merck, Darmstadt

**Ampicillin**, ICN Biomedicals, Eschwege

**Antihaftlösung „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, Taufkirchen

**Bromphenolblau**, Merck, Darmstadt

**$CaCl_2$**, Riedel-De Haën Laborchemikalien, Seelze

**Dextransulfat**, SERVA Feinbiochemika, Heidelberg

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

**Dimethylsulfoxid (DMSO),** Sigma-Aldrich Chemie, 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, Seelze

**Ethidiumbromid**, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

**Fötales Kälberserum (FCS)**, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

**Ficoll Typ 400**, Pharmacia Biotech, Freiburg

**Formamid**, Merck, Darmstadt

**KCL-Reaktionspuffer**, Promega, München

**L-Glutamin**, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

**Glycerol**, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

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

**Hepes**, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

**Magnesiumchlorid (25mM)**, Eurogentec, Seraing, Belgien

**14,5M β-Mercaptoethanol**, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

**3-N-Morpholino-Propan-Sulfonsäure (MOPS),** GERBU, Gaiberg

**Natriumchlorid**, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Deutschland

**Natriumcitrat**, Merck, Darmstadt

**Natriumhydrogenphosphat**, Merck, Darmstadt

**Natriumhydroxid**, Baker, Deventer, Niederlande

**Natriumphosphat**, Merck, Darmstadt

**Penicillin/ Streptomycin, 10 000 µg/ml**, Seromed, Berlin

**Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1),** Roth, Karlsruhe

**Phosphate-buffered saline (PBS),** Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

**Polyvinylpyrrolidon**, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

**2-Propanolol (Isopropanolol),** Riedel-De Haën Laborchemikalien, Seelze

**Propidiumidiodid**, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

**Puffer „10x Puffer“,** Eurogentec, Seraing, Belgien

**Puffer „10x KlenTag-PCR-Reaktions Puffer**“, Clontech, Heidelberg

**Puffer „buffer EcoR1$^{*}$ Not1$^{*}$“,** MBI Fermentas, 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, München

**Sequagele XR extended range**, Bio-Rad Laboratories, München

**Servolit Ionenaustauscher MB3**, SERVA Feinbiochemika, Heidelberg

**Sodiumdodecylsulfat (SDS),** Gerbu Biotechnik, Gaiberg, Deutschland

**Staurosporin**, Roche Diagnostics, Mannheim

**Sucrose**, SERVA Feinbiochemika, Heidelberg

**SYBR® Green PCR Master Mix**, Applied Biosystems, Weiterstadt

**Tris**, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

**Trypsin/EDTA**, PAN Biotech, 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, Taufkirchen

**Zytostatika:**

- **Methotrexat, 5-Fluorouracil** beide Substanzen wurden von der Apotheke der Universitätskliniken zubereitet und die entsprechenden Mengen in 1ml NaCl 0,9% gelöst

### 2.1.2 Häufig verwandte Puffer

| | |
|---|---|
| **10xMOPS-Puffer (pH 6,5-6,8)** | 200mM MOPS<br>50mM Na-Acetat<br>10mM EDTA |
| **20xSSC (standard saline citrate)** | 3M NaCl<br>0,3M Natriumcitrat |
| **RNA-Gel-Ladepuffer** | 0,86% Glycerin<br>0,5% Bromphenolblau<br>100mM Natriumphosphat |
| **50xTAE-Puffer** | 100ml 0,5M EDTA (pH 8,0)<br>242g Tris<br>57,1ml Eisessig<br>_____<br>ad 1l $H_2O$ |
| **DEPC-$H_2O$** | 1ml DEPC<br>1l $H_2O$ |
| **DNA-Gel-Ladepuffer** | 0,25% Bromphenolblau<br>0,25% Xylene Cyanol FT<br>40% (w/v) Sucrose in $H_20$ |
| **Denhardt's** | 5g Ficoll Typ 400<br>5g Polyvinylpyrrolidon<br>5g BSA Fraktion V<br>_____<br>ad 500ml $H_2O$ |
| **10xTBE-Puffer** | 1,34M Tris pH 8,8<br>0,44M Borsäure<br>25mM EDTA |

| | |
|---|---|
| **Differential-Display-Gel-Ladepuffer** | 0,05% Bromphenolblau<br>0,05% Xylen Cyanol FF<br>20mM EDTA pH 8<br>9,5ml Formamid<br>237,5mg Servolit Ionenaustauscher MB3 |
| **Hybridisierungspuffer** | 15g Dextransulfat in 462ml $H_2O$<br>60ml 20xSSC<br>60ml Denhardt's<br>3ml 20% SDS<br>6ml Natriumpyrophophat<br>4,8ml 250mM EDTA<br>1,8ml Lachssperma |
| **Waschpuffer-1** | 2xSSC<br>0,5% SDS |
| **Waschpuffer-2** | 0,1xSSC<br>0,1% SDS |
| **Inkubationspuffer für Annexinfärbung** | 10mM Hepes, pH 7,4<br>140mM NaCl<br>5mM $CaCl_2$ |
| **Markierungslösung** | 1000ml Inkubationspuffer<br>20µl Annexin<br>20µl Propidiumiodid (50µg/ml) |
| **Denaturierungspuffer** | 1,5M NaCl<br>0,5M NaOH |
| **Neutralisierungspuffer (pH 7,5)** | 1,5M NaCl<br>1M Tris |
| **4x SET Puffer (pH 7,8)** | 0,6M NaCl<br>4mM EDTA<br>80mM Tris |

### 2.1.3 Filter und Membranen

**Whatman 3MM**, Schleicher & Schuell, Dassel

**Gel-Blotting-Papier**, Schleicher & Schuell, Dassel

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

### 2.1.4 Radiochemikalien

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

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

### 2.1.5 Molekularbiolgische 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

**QIAprep® Spin Miniprep Kit**, Qiagen, Hilden

**QIAquick™ Gel Extraction Kit**, Qiagen, Hilden

**QIAshredder™,** Qiagen, Hilden

**RNeasy® Mini Kit**, Qiagen, Hilden

**TOPO™ TA Kloning® Kit**, Invitrogen BV, Groningen, Niederlande

### 2.1.6 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

## 2.1.7 Nukleinsäurenstandards

**DNA Längenstandard (100bp),** Promega GmbH, München

**DNA Längenstandard (1kb),** Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

## 2.1.8 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 KSA6SQP1249s, KSA6SQP1596as, GAPDHas und GAPDHs wurden von MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Aus dem PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech, Heidelberg) entstammen folgende Oligonukleotide: 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 $H_2O$ 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 | CCACTTTGAG |
| Zufallsprimer38 | GAGATGACGA |
| Zufallsprimer39 | TCGCTATCTC |
| Zufallsprimer40 | TGACTTGGCT |
| ZufallsprimerDOC | ACAAGGCACCGGTGCCTTGT |
| Adapter1 (10pmol/µl) | CTAATACGACTCACTATAGGGCTCG-<br>AGCGGCCGCCCGGGCAGGT<br>3'-GGCCCGTCCA-5' |
| Adapter2 (10pmol/µl) | CTAATACGACTCACTATAGGGCAGC-<br>GTGGTCGCGGCCGAGGT<br>3'-GCCGGCTCCA-5' |
| Ankerprimer-X | pd(T)12-V-X (X= A,T,G oder C) |
| cDNA-Synthese-Primer (10pmol/µl) | $TTTTGTACAAGCTT_{30}N_1N$ |
| GAPDHas (100pmol/µl, ) | TGTTATGGGGTCTGGGATGGA |
| GAPDHs (100pmol/µl) | CCTGGACCACCCAGCCCAGCA |
| KSA6SQP1249s (100pmol/µl; 20pmol/µl) | CTATTTCCAGTTGCCTCTGAAGTTCACA |
| KSA6SQP1596as (100pmol/µl; 20pmol/µl) | CAAGCAGCACATGAAGATGGCCCAGGAG |
| MITOs (100pmol/µl) | AAATCAACAAAACTGCTCGCCAGAACAC<br>TACG |
| MITOas (100pmol/µl) | CGTGGGTACTTGCGCTTACTTTGTAGCC<br>TTCA |
| M13s (10pmol/µl) | GTAAAACGACGGCCAG |
| M13as (10pmol/µl) | CAGGAAACAGCTATGAC |
| Nested-PCR-Primer1 (10pmol/µl) | TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT |

| | |
|---|---|
| Nested-PCR-Primer2R (10pmol/µl) | AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT |
| Oligo(dt)-Primer (3µg/µl) | pd(T)12-18 |
| PCR-Primer1 (10pmol/µl) | CTAATACGACTCACTATAGGG |

### 2.1.9 Kulturmedien

**ZELLKULTUR:**

**Dulbecco's Modified Eagle Medium**, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

**RMPI 1640**, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

**BAKTERIENKULTUR:**

**SOC Medium**, Invitrogen BV, Groningen, Niederlande

| | |
|---|---|
| **LB (Luria-Bertani)-Medium (pH 7,0)** | 10g Bacto-trypton |
| | 5g Bacto-yeast |
| | 10g NaCl |
| | ad 1l $H_2O$ |
| **LB-Agarplatten** | 500ml LB-Medium |
| | 7,5g Bactoagar |
| | 20mg X-Gal |
| | 30mg IPTG |
| | 50mg Ampicillin |

### 2.1.10 Antikörper

**Annexin-V-FLOUS**, Roche Diagnostics, Mannheim

**IgG1-FITC-Goat-Antibody**, Southern Biotech, Birmingham, USA

### 2.1.11 Geräte, Zubehör und Verbrauchsmaterialien

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

**ABI PRISM™ 7700 Sequencen Detection Systems**, Applied Biosystems, Weiterstadt

**Agarosegel-Elektrophoresekammer**, Harnischmacher, München

**Autoradiographie-Expositionskassetten**, MS-Laborgeräte Schröder OMG, Wiesloch

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

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

**Durchflusszytometer „Epics®-XL-MCL“,** Coulter, Krefeld

**Einfrierröhrchen „Cryotubes“,** Nunc, 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, Karlsruhe

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

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

**Glasplatten** (Spezialanfertigung)

**Inkubatoren**, Heraeus Sepatech, Osterode

**Klebeband, schwarz**, Tesa, Beiersdorf, Hamburg

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

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

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

**Petrischalen**, Nunc, Wiesbaden

**pH-Meter**, Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz

**Pipettierhilfe „Pipetboy acu“,** Integra Biosciences, Fernwald

**Pipetten**, Abimed, Langenfeld

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

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

**Reaktionsgefäße**, 1.5ml, Eppendorf, Hamburg

**Spannungsgeräte „Modell 455“**, Consort, Turnhout, B.

**Sterilwerkbank „Microflow“,** Nunc, Wiesbaden

**Thermomixer-Heizblock**, Eppendorf, Hamburg

**Thermomixer „5436**“, Eppendorf, Hamburg

**UV-Spektrophotometer „DU 7400“,** Beckmann Instruments, München

**UV-Transluminator mit Sofortbildkamera „Eagleye II“**, Stratagene, Heidelberg

**Vortex-Mixer „Reax Top C“**, Heidolph, Kehlheim

**Zellkulturflaschen „NunKlon ™ Δ Surface“**, Nunc, Wiesbaden

**Zellkulturröhrchen,** Greiner, Frickenhausen und Solingen

**Zentrifuge „5417“,** Eppendorf, Hamburg

**Zentrifuge „Megafuge 1.0.R**“, Heraeus Sepatech, Osterode

**Zentrifugenröhrchen „Falcon“**, Becton Dickinson Europ. HQ, Erembodegem-Aalst

### 2.1.12 Software

**DNA-Strider**, Biology Department, Lewis & Clark College, Portland, Oregon

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/

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die Versuche wurden mit den adhärenten 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 Mammakarzinom-Patientin an der Universitäts-Frauenklinik Heidelberg und besteht histologisch ebenfalls aus adenoiden Mammakarzinom-Zellen. Die Kultivierung erfolgte steril in einer 5%igen $CO_2$-Atmosphäre bei 37°C in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), angereichert mit 10% Hitze-inaktiviertem fötalen Kälberserum, 1% Glutamin und 100µg/ml Streptomycin.
Die Kultivierung der Jurkat-Zellen (einer humanen T-Zell-Leukämie-Zelllinie), welche als Positivkontrolle in der Durchflusszytometrie dienten, erfolgte mit RPMI1640-Medium, supplementiert mit 10% Hitze-inaktiviertem fötalen Kälberserum, 1% Glutamin und 100µg/ml Streptomycin.
Zur Expansion wurden die Zellen zweimal wöchentlich wie folgt geteilt:

- Hierzu wurde zunächst das Medium entfernt und der Zellrasen mit 2 bis 10ml PBS je nach Fläche der Kulturflasche gewaschen.
- Um die adhärenten Zellen vom Boden der Kulturflasche loszulösen, wurden die Zellen je nach Fläche der Kulturschale mit 2 bis 10ml eines 0,5/0,02%igen Trypsin/EDTA-Gemisches für circa 5min bei 37°C inkubiert.
- Danach wurde die Reaktion durch Zusatz des Mediums abgestoppt und die Zellsuspension bei 1200 U/min (200 g) 7min zentrifugiert.
- Nach dem Dekantieren des Überstands wurden die Zellen zur Expansion auf mehrere – meist vier – Kulturflaschen aufgeteilt oder aber für Experimente verwandt.

### 2.2.2 Inkubation

Zur Durchführung der Differential-Display PCR wurden MCF-7-Zellen mit 22,5µg 5-Fluorouracil pro ml Medium 8h inkubiert.
Zur Durchführung der Subtraktiven Hybridisierung wurden KS-Zellen 8h mit 3µg Methotrexat pro ml Medium behandelt.
Zur Apoptose-Testung mittels Durchflusszytometrie wurde in KS-Zellen mit MTX ein Zeitverlauf über 1-24h durchgeführt, um so eventuelle zeitabhängige Effekte der Substanz auf die Induktion von Apoptose und Nekrose in den malignen Zellen zu detektieren.
Um gleiche Versuchsbedingungen in Kontrolle und Testansatz zu erhalten wurde allen Kontrollen das gleiche Volumen an physiologischer Kochsalzlösung zugesetzt, in dem die Zytostatika gelöst worden waren.

### 2.2.3 Isolierung der 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:

- Wie zuvor beschrieben, wurden die Zellen trypsiniert und zentrifugiert.
- Das Zellsediment wurde sofort in 500µl eines RLT-Lyse-Puffer/14,5M β-Mercaptoethanol-Gemisches (im Verhältnis 100:1) lysiert und auf eine QIAShredder™-Säule überführt.
- Es schloss sich ein zweiminütiger Zentrifugationsschritt bei 14 000 U/min an.
- Die Säule wurde mit 250µl RLT-Lysepuffer nachgewaschen und erneut bei gleicher Dauer und Umdrehungszahl homogenisiert.
- Danach wurde das Eluat mit dem gleichen Volumen eines 70%igen, RNAse-freien Ethanols vermengt und maximal 700µl des Lysat/Ethanol-Gemisches auf eine RNeasy®-Säule übertragen, welche bei 10 000 Umdrehungen pro Minute 15s zentrifugiert wurde.

- Der Durchfluss konnte verworfen werden.
- In derselben Weise konnte mit 700µl RW1-Waschpuffer die DNA ausgewaschen und entfernt werden. Proteine und Salze wurden durch das zweimalige Waschen mit je 500µl des mit Ethanol supplementierten RPE-Puffers entfernt; die dazu notwendigen Zentrifugationen wurden im ersten Waschgang mit 10 000 U/min, im letzten mit 14 000 U/min durchgeführt.
- Dann wurde die Säule in der Zentrifuge bei 14 000 U/min getrocknet, bevor die Gesamt-RNA letztlich in zwei Arbeitsschritten mit je 35µl RNAse-freien Wassers nach je einminütiger Inkubation durch je 60s dauernde Zentrifugationen bei 10 000 U/min in ein steriles Eppendorf-Gefäß eluiert werden konnte.
- Danach konnte die Qualität der RNA wie nachfolgend beschrieben bestimmt werden und anschließend die RNA verdaut und revers transkribiert werden. Wurde jedoch – wie bei der Subtraktiven Hybridisierung – anstelle der Gesamt-RNA mRNA 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 14 000g an, das Sediment wurde in 400µl-600µl OW2-Waschpuffer aufgenommen und die Suspension auf eine Zentrifugationssäule überführt und wiederum 1min zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde nochmals wiederholt.

- Die isolierte Messanger-RNA konnte in zwei Elutionsschritten mit je 20µl-100µl des auf 70°C erwärmten OEB-Elutionspuffers durch je einminütige Zentrifugation bei 14 000g gewonnen werden.

### 2.2.4 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und -Reinheit

Die optische Dichte einer RNA wurde bei den Wellenlängen 260 und 280nm bestimmt, um eventuelle Verunreinigungen zu detektieren. Die RNA galt als rein, wenn der Quotient aus den optischen Dichten bei 260nm und 280nm einen Wert von 1,9 (bei pH 7,5) nicht unterschritt. Gleichzeitig konnte auf diese Weise die Konzentration der RNA bestimmt werden:

RNA-Konzentration in ng/µl = optische Dichte bei $\lambda$260nm x 40 x 1/Verdünnung

### 2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

- Die Integrität der RNA wurde durch die Agarose-Gelelektrophorese überprüft: Hierzu wurde 1% Agarose durch kurzes Aufkochen in 1x MOPS gelöst.
- Vor dem Erstarren der Flüssigkeit wurde 1µl des Farbstoffes Ethidiumbromid pro 50ml Volumen zugefügt.
- Das erstarrte Gel wurde in eine Flachgel-Elektrophoresekammer überführt und mit je1µg RNA/Probe, ergänzt durch 3µl RNA-Auftragspuffer, beladen.
- Die Elektrophorese erfolgte in 1x MOPS bei 80mV. Nach dem Gellauf wurde die RNA durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254nm sichtbar gemacht und fotografiert.
- Die DNA-Gelelektrophorese wurde nach dem gleichen Prinzip durchgeführt. Statt MOPS-Puffer wurden jedoch entweder TAE- oder TBE-Puffer als Laufpuffer verwandt. Außerdem wurde den Proben ein spezieller DNA-Auftragspuffer vor der Beladung des Gels zugefügt.

### 2.2.6 DNAse-Verdau

Für den DNAse Verdau wurden eingesetzt:

2µg RNA
2µl DNAse
1µl 10x Puffer

ad 10µl $H_2O_{DEPC}$

Nach 15minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 1µl 25mM EDTAs terminiert und das Enzym anschließend durch die 10minütige Behandlung bei 70°C denaturiert.

### 2.2.7 Reverse Transkription

REVERSE TRANSKRIPTION FÜR DIFFERENTIAL DISPLAY

Die Gewinnung der cDNA erfolgte wie nachfolgend beschrieben:

5µl RNA
5µl $H_2O_{DEPC}$ 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 $H_2O_{DEPC}$
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 $H_2O$.

REVERSE TRANSKRITION 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 $H_2O_{DEPC}$

## 2.2.8 Methoden zur Detektion der differenziellen Genexpression

Höhere Organismen verfügen in ihrem Erbgut über ca. 100 000 Gene, von denen jedoch nur ein geringer Prozentsatz gleichzeitig exprimiert wird. Die restlichen Gene ruhen, können aber durch veränderte äußere Bedingungen – wie zum Beispiel die Behandlung mit Zytostatika – aktiviert werden. Veränderte Umweltbedingungen können jedoch genauso bereits aktivierte Gene reprimieren; in beiden Fällen kann ein veränderter, u. U. pathophysiolgisch relevanter Phänotyp resultieren.

In den Methoden „Differential Display" und „Subtraktive Hybridisierung" finden sich zwei potente Methoden, um Veränderungen in der Genexpression von Zellen im Verlauf pathologischer Prozesse bzw. als Reaktion auf äußere Reize zu detektieren.

### 2.2.8.1 Die Differential-Display-PCR

Die Differential-Dispaly-PCR beruht auf einem von Liang und Pardee (Liang u. Pardee 1998, Liang et al 1995) entwickelten Verfahren:
Dabei wird die cDNA (gewonnen aus der RNA der miteinander zu vergleichenden Zellpopulationen) unter Verwendung eines Anker-Primers und verschiedener Zufallsprimer vervielfältigt und mit $^{33}P$ radioaktiv markiert. Die auf diese Weise erhaltenen PCR-Produkte werden auf einem Polyacrylamid-Sequenziergel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie mit denen der Vergleichsprobe verglichen. Jede nur in einer Probe sichtbare Bande deutet auf die unterschiedliche Expression eines Gens hin. Diese Bande kann dann aus dem Gel ausgeschnitten, die darin enthaltene cDNA reamplifiziert, kloniert und sequenziert werden; die Sequenz kann anschließend mit einer Genbank verglichen werden. Sofern die Sequenz bekannt ist und sich identifizieren lässt, ist es möglich, Rückschlüsse auf die Vorgänge in den untersuchten Zellverbänden zu ziehen.

Je Ansatz wurden eingesetzt:

2µl cDNA
1µl Zufallsprimer
2µl 10xPuffer
1,5µl $MgCl_2$
1,6µl dNTPs (25µM)
1µl Ankerprimer,
0,1µl [$\alpha$-$^{33}P$]-dATP
0,2µl DNA-Polymerase „GoldStar“

---

$H_2O$ ad 20µl

Die Differential-Display-PCR fand in dem PTC-200 Thermal Cycler 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 40-mal 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.

Ausschneiden der differierenden Banden

Waren unterschiedliche Banden in den beiden Vergleichspopulationen erkennbar, wurde das Autoradiogramm deckungsgleich auf das getrocknete Gel aufgelegt und das differenziell exprimierte PCR-Produkt ausgeschnitten.

Die cDNA wurde mit 100µl autoklaviertem $H_2O$ 15min bei 96°C erhitzt, bei 14000 U/min 3min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen.

Reamplifikation der ausgeschnittenen DNA

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 $MgCl_2$
4µl dNTPs (250µM)
2µl Ankerprimer
0,2µl DNA-Polymerase „GoldStar“

---

ad 50µl $H_2O$

Die PCR wurde bei folgenden 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 Kap. 2.2.9 beschrieben kloniert, tranformiert, plasmidisoliert und letztendlich sequenziert werden.

### 2.2.8.2 Die Subtraktive Hybridisierung

Prinzip der Subtraktiven Hybridisierung

Die Subtraktive Hybridisierung stellt eine effiziente Methode zur Isolierung von cDNAs differenziell exprimierter Gene dar. Der verwandte PCR-Select™ Subtraction Kit (Clontech) basiert auf einem von Diatchenko et al. 1996 entwickelten Verfahren, das zur Anreicherung von cDNAs führt, die nur in einer der zu vergleichenden RNA-Populationen vertreten sind. Die Subtraktive Hybridisierung ermöglicht die Anreicherung von cDNAs, die spezifisch in einer sog. Tester-cDNA – nicht aber oder nur vermindert in einer Vergleichspopulation, der sog. Driver-cDNA, – vorkommen.
Der Ablauf der Subtraktiven Hybridisierung ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt:

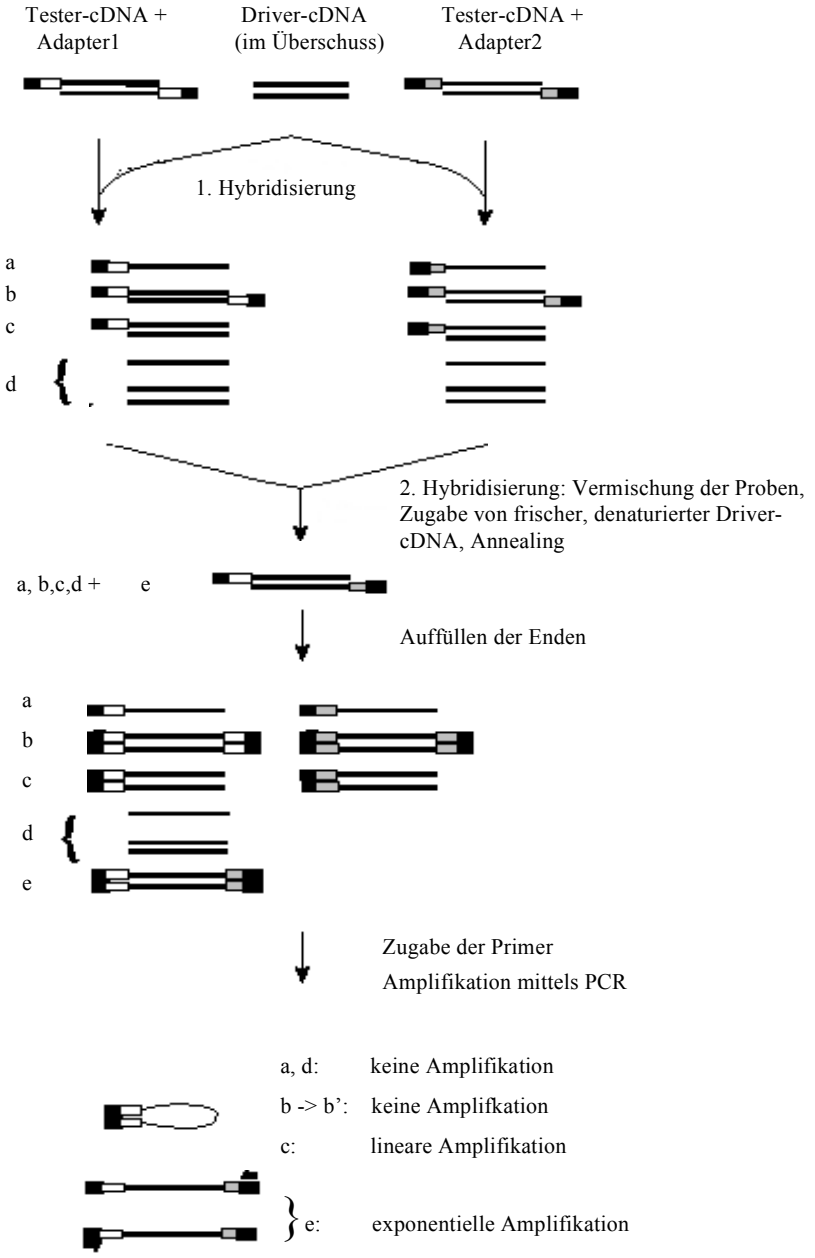


**Abb. 10:**
**Prinzip der Subtraktiven Hybridisierung**
**(Abbildung aus Clontech 2002)**

Driver- und Tester-cDNA werden mit dem Restriktionsenzym RSAI geschnitten. Nur die Fragmente der Tester-cDNA werden in getrennten Ansätzen mit verschiedenen Adaptern ligiert und in 2 aufeinander folgenden Hybridisierungen mit einem Überschuss an Driver-cDNA inkubiert. Vor der zweiten

Hybridisierung, in der die beiden getrennten Ligationsansätze vereinigt werden, wird die cDNA nicht denaturiert.

Durch die beiden Hybridisierungsschritte werden differenziell exprimierte Sequenzen angereichert und in ihrer Häufigkeit angeglichen. In den beiden nachfolgenden PCR-Versuchen werden nur diejenigen differenziell exprimierten, nicht mit der Driver-cDNA hybridisierten doppelsträngigen Tester-cDNA-Fragmente exponentiell amplifiziert, die unterschiedliche Adapter besitzen; der Hintergrund wird weiter reduziert. Mit Hilfe der Subtraktiven Hybridisierung können jedoch nur differenzielle Expressionen in der Tester-cDNA detektiert werden, nicht jedoch in der Driver-cDNA, so dass die Subtraktion zusätzlich reziprok durchgeführt werden muss, d.h. die ehemalige Tester-cDNA dient in einem weiteren Ansatz als Referenz-cDNA (Driver-cDNA) und umgekehrt.

Die so erhaltenen Fragmente werden durch T/A-Klonierung und nachfolgende Kolonien-PCR vervielfältigt. Eine Southern-Blot-Analyse wird anschließend durchgeführt, um zu bestätigen, dass individuelle Klone auch wirklich differenziell exprimierte Gene repräsentieren. Hierfür wird die subtrahierte cDNA in Form eines Dot-plots mit $^{32}P$ markierter Driver-cDNA – und in einem weiteren Ansatz auch mit Tester-cDNA – hybridisiert und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Die cDNA einer differenziell exprimierten mRNA hybridisiert erwartungsgemäß nur mit dem Tester, nicht jedoch mit dem Driver. Der Klon, aus dem die differenziell exprimierte Nukleinsäure entstammt, wird dann weiter kultiviert und sein Plasmid mit dem interessierenden Insert isoliert. Daran schließen sich die Sequenzierung und ein Datenbankvergleich mit bereits bekannten Sequenzen an. Zuletzt war es erforderlich, das Ergebnis in Kontrollexperimenten zu bestätigen.

## Durchführung

Soweit 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 Herstellerprotokoll.

### cDNA-Synthese

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

Erststrangsynthese:
2µg mRNA
1µl cDNA-Synthese-Primer
_____
ad 5µl $H_2O$

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 $H_2O$
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 $H_2O$
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%igem Ethanol durch einen 20min dauernden Zentrifugationsschritt bei 14 000 Umdrehungen/min gefällt werden konnte.
- Das Präzipitat wurde in 50µl Wasser resuspendiert. 43,5µl der gelösten cDNA wurden für den nachfolgenden Restriktionsverdau eingesetzt, der zur Bildung kürzerer cDNA-Fragmente mit glatten Enden führte – eine Voraussetzung für die Adapterligation.
- In einem Reaktionsgefäß wurden

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

  miteinander vermengt und die Reaktion bei 37°C für 90 min belassen.
- Nach der Termination der Reaktion mit 2,5µl EDTA/Glykogen schlossen sich wiederum eine Phenol/Chloroform-Extraktion und eine cDNA-Fällung an, bevor das cDNA-Pellet in 5,5µl Wasser resuspendiert wurde.
- Ausschließlich von der Tester-cDNA wurden je 1,5µl mit 7,5µl Wasser verdünnt und für die Adapterligation mit Adapter1 bzw in einem zweiten Reaktionsansatz mit Adapter2 eingesetzt:

  3µl $H_2O$
  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 1ml 20x EDTA/Glycogen Mix unterbunden und das Enzym durch 5minütiges Erhitzen auf 72°C inaktiviert.

Subtraktionshybridisierung

In der folgenden ersten Hybridisierung wurden beide Tester-cDNAs, jeweils verschiedene Adapter tragend, in getrennten Reaktionen mit einem Überschuss an Driver-cDNA versetzt. Nach der Denaturierung der Proben kam es zur Ausbildung von Hybriden zwischen Tester- und Driver-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 Driver-cDNA
  1µl 4x Hybridisierungspuffer
  1,5µl Tester-cDNA1 (mit Adapter1)

  Hybridisierungsreaktion 2
  1,5µl Driver-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 Driver-Gemisches zugefügt:

  1µl Driver-cDNA
  1µl 4x Hybridisierungspuffer
  2µl $H_2O$

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

Amplifikationen der subtrahierten cDNAs

Diese PCR-Reaktion ermöglichte die selektive Vervielfältigung der differenziell exprimierten cDNAs.

- Ein Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

  1µl subtrahierte cDNA
  2,5µl 10 x PCR Reaktionspuffer
  0,5µl dNTP Mix (10mM)
  1µl PCR Primer1
  0,5µl 50 x Advantage™ cDNA Polymerase Mix

  ad 25µl $H_2O$

  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:

  30s bei 96°C
  30s bei 66°C
  1,5min 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.

In einem Reaktionsgefäß wurden

1µl verdünntes PCR-Produkt
2,5µl 10x KlenTag-PCR-Reaktions Puffer
1µl Nested PCR Primer1
1µl Nested PCR Primer2R
0,5µl dNTP Mix (10mM)
0,5µl 50 x Advantage Klen Taq Polymerase Mix

ad 25µl $H_2O$

gemischt und in 15 Zyklen amplifiziert:

30s bei 94°C
30s bei 68°C
1,5min bei 72°C

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

- Die PCR-Produkte wurden für eine T/A-Klonierung eingesetzt (Kap. 2.2.9) um zu untersuchen, ob die aus der Subtraktiven Hybridisierung hervorgegangenen PCR-Produkte tatsächlich in unterschiedlicher Häufigkeit in den untersuchten Ausgangspopulationen vorliegen.

### 2.2.9 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 erfolgte mit Hilfe des Topo™ TA Kloning Kits und des One Shot Kit™ jeweils 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 wurden 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 wurden.
- 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 Plasmid-tragenden 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 Intersertion 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.

### 2.2.10 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 mit folgendem Cocktail aufgenommen und mittels 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 $H_2O$

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 nacheinander 30-mal durchlaufen.

### 2.2.11 Dot-Blot-Analyse und Herstellung radioaktiv markierter cDNA-Sonden

#### Blotten

Je Reaktionsansatz wurden 12µl des PCR-Produkts mit $H_2O$ auf ein Volumen von 60µl verdünnt und durch Kapillarblot punktförmig auf eine Nylonmembran überführt, welche nacheinander mit Denaturierungspuffer, Neutralisierungspuffer und 4x SET durchsaugt wurde. Nach dem Trocknen erfolgte die Kreuzvernetzung durch UV-Bestrahlung.

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.

#### Markierung der cDNA-Sonden

Je 40ng mit Methotrexat behandelter und unbehandelter cDNA wurden durch Einbau von [$\alpha$-$^{32}$P]-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 5min bei 95°C.

- Je Ansatz erfolgte der Zusatz von 10µl labelling buffer, 5µl [$\alpha$-$^{32}$P]-dCTP und 2µl Enzym-Lösung.
- Die Reaktion wurde für 45min 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.

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.

### 2.2.12 Strippen der Membranen

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

### 2.2.13 Plasmidisolation aus E. coli

Wie in Kap 2.2.9 beschrieben wurden die erfolgreich transformierten Bakterien mittels Farbumschlag identifiziert. Mit je einer weißen Kolonie wurden 3ml eines mit 50µ/ml Ampicillin-supplementierten LB-Mediums angeimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet. Die Plasmidisolation aus E. coli erfolgte mit dem QIAprep® Spin Mini Prep Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers, um die Inserts einer Sequenzierung zugänglich zu machen: Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 250µl P1 Puffer lysiert. Sukzessive wurden 250µl Puffer P2 und 350µl Puffer N3 zugegeben, bevor sich ein weiterer 10minütiger Zentrifugationschritt bei Maximalgeschwindigkeit anschloss. Nach der Überführung des Überstandes auf eine QIAprep® Säule wurde der Durchfluss verworfen. Es schloss sich ein Waschschritt mit 750µl PE Puffer an, bevor der Vektor aus der trockenen Säule mit 50µl $H_2O$ durch Zentrifugation eluiert wurde.

### 2.2.14 Restriktionsanalyse

Ein Restriktionsansatz bestand aus 3µg Plasmid-DNA, 1µl Restriktions-endonuklease (hier EcoR1) und 1µl EcoR1-Puffer. Der Ansatz wurde mit Wasser 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 Gelelektorphorese nachgewiesen werden können.

### 2.2.15 Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden im Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ) von Dr. Andreas Hunziker automatisiert durchgeführt.

### 2.2.16 Semiquantitative PCR

Der Ansatz für dieses Kontrollexperiment bestand aus

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

ad 50ml $H_2O$.

Die PCR lief bei folgenden Temperaturstufen ab:

4min bei 96°C
1min bei 96°C
30s bei 63°C
1min bei 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 verschiedenen reamplifizierten Fragmente wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels UV-Licht visualisiert.

### 2.2.17 Quantitative PCR

Die 25µl Probenvolumen je Ansatz setzten sich zusammen aus:

2µl cDNA (RT-Produkt, verdünnt im Verhältnis 1/10)
0,1µl Genspezifischer-Primer-s(100pm/µl)
0,1µl Genspezifischer-Primer-s(100pm/µl)
12,5µl SYBR® Green PCR Master Mix

ad 25µl $H_2O$

Die PCR lief bei folgenden Temperaturstufen ab:

10min bei 95°C
15s bei 95°C
60s bei 60°C,

wobei die Schritte 2 und 3 insgesamt 48-mal wiederholt wurden.

Als Standard diente eine Verdünnungsreihe (jeweils in 10er Schritten bis zu einer Verdünnung von $10^{-4}$) des RT-Produktes der interessierenden cDNA. Aus jeder Probe wurde zusätzlich eine quantitative Bestimmung eines Housekeeping Genes, der GAPDH, durchgeführt; eventuelle geringfügige Schwankungen der zu untersuchenden Proben bezüglich der eingesetzten DNA-Menge konnten so detektiert und im Bedarfsfalle rechnerisch korrigiert werden. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung.

PCR, nachfolgende Analyse und Auswertung erfolgten mit Hilfe eines ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection Systems und des angeschlossenen MACs unter Verwendung einer Anregungswellenlänge des Argonlasers von 488nm sowie eines Spektrographen zur Auffächerung der Emissionsspektren in die einzelnen spektralen Anteile. Mit Hilfe einer CCD-Kamera (charged coupled device) wurden die einzelnen Emissionen in digitale Signale umgewandelt. Auf diese Weise lassen sich Emissionsdaten über einen Wellenlängenbereich von 500 bis 660nm sammeln. Prinzip der quantitativen PCR ist die Detektion der zyklusspezifischen Veränderung der Fluoreszenzsignale einer Probe während der PCR, wodurch sich Rückschlüsse auf die initiale Kopienzahl der interessierenden Sequenz ziehen lassen.

### 2.2.18 FACS-Analyse

Um zu überprüfen welche Rolle Apoptose und Nekrose bei der durch Methotrexat vermittelten Wirkung auf Mammakarzinom-Zellen spielen, wurde die Oberflächenexpression von Phosphatidylserin auf den zytostatisch vorbehandelten Zellen mittels Färbung mit Annexin, einem Kalzium-abhängigen, Phosholipid-bindenden Protein, getestet. Tote Zellen lassen sich zusätzlich durch Propidiumiodid anfärben, da Propidiumiodid nur durch die

perforierte Zellwand toter Zellen ins Zellinnere gelangen kann. Als Positivkontrolle für Apoptose wurden Jurkatzellen verwandt, welche zuvor 12 Stunden lang mit 1mmolarem Staurosporin inkubiert worden waren.

Zur Analyse wurde die Durchflusszytometrie eingesetzt. Die entsprechend der Versuchsplanung vorbehandelten Zellen wurden nach dem Ablösen von der Kulturflasche einmalig mit PBS gewaschen und auf eine Million pro Ansatz eingestellt. Die Zellpellets wurden in je 100µl Markierungslösung resuspendiert und 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Markierungslösung abzentrifugiert und das Pellet in 400µl Inkubationspuffer aufgenommen. Die quantitative Analyse erfolgte mit einem Epics-XL-MCL Durchflusszytometer unter Verwendung einer Anregungswellenlänge des Argonlasers von 488nm sowie eines Bandpassfilters von 515nm zur Fluorescein-Detektion sowie eines Filters von >560nm zur Propidiumiodid-Detektion. Zellverbände sowie eine Überlappung der einzelnen Emissionsspektren konnten mit Hilfe einer geeigneten Gerätekonfiguration ausgeschlossen werden. Es wurden jeweils 10 000 bis 20 000 Ereignisse analysiert.

# 3 Ergebnisse

Die Kombination der in der Behandlung des Mammakarzinoms eingesetzten Zytostatika erfolgte bislang anhand empirischer Kriterien; die molekularen Angriffspunkte der einzelnen Substanzen sowie deren Interaktionen sind noch teilweise unklar.
Das Verständnis der Wirkungsweise der einzelnen Substanzen auf molekularer Ebene soll es ermöglichen, langfristig die zytostatische Therapie zu optimieren und das Leben der Patienten zu verlängern.
Ein erster Schritt in diese Richtung ist es zu untersuchen, inwieweit verschiedene Zytostatika die Genexpression maligner Zellen beeinflussen.
Hierzu wurde für zwei Substanzen (5'-FU und MTX) jeweils eine sensible Zelllinie ausgewählt, diese mit dem entsprechenden Zytostatikum behandelt und zuletzt das Expressionsprofil mit dem der unbehandelten Kontrolle verglichen. Es sollten in dieser Arbeit sowohl Genexpressionsunterschiede durch Differential-Display-PCR und Subtraktive Hybridisierung als auch die Methode, die sich zur Beantwortung dieser Fragestellung am Besten eignet, bestimmt werden.

## *3.1 Untersuchungen zum Einfluss von 5'-FU und MTX auf die Genexpression*

### 3.1.1 Auswahl der zu untersuchenden Zelllinien

Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden alle an Zelllinien durchgeführt. Die Auswahl der Zelllinien richtete sich dabei nach ihrer Sensibilität gegenüber der zu untersuchenden Substanz.
Als geeignet erwies sich die Zelllinie KS für die Untersuchungen nach MTX-Inkubation sowie die Zelllinie MCF7 für Untersuchungen nach 5'-FU-Inkubation. Für beide Zelllinien war die entsprechende Sensibilität in unserem Labor vorbeschrieben worden (Meyer 2000, Marmé unveröffentlichte Befunde).

### 3.1.2 Inkubationen

$7 * 10^6$ MCF7-Zellen bzw. $7 * 10^7$ KS-Zellen wurden über 8 Stunden inkubiert. Bei dieser Inkubationszeit war eine möglichst große Anzahl an Veränderungen im Genexpressionsmuster zu erwarten bei gleichzeitig möglichst geringer Resistenzentwicklung. Die Zytostatika wurden in den Konzentrationen eingesetzt, die die Voruntersuchungen aus unserem Labor nahelegen. Diese Konzentrationen entsprechen der doppelten Plasma-Peak-Konzentration (3µg/ml Medium) für MTX bzw. der 3,6-fachen Plasma-Peak-Konzentration (22,5µg/ml Medium) für 5'-FU.
Es wurden ebenfalls Zellen mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) zur Gewinnung von Kontroll-RNA inkubiert.

### 3.1.3 Isolierung der RNA

Während für die Differential-Display-PCR mit Gesamt-RNA gearbeitet wurde, wurde in dem PCR-Select™ Subtraction Kit mRNA eingesetzt.
Die RNA wurde aus den Zelllysaten von mit Zytostatika behandelten und unbehandelten KS- bzw. MCF7-Zellen isoliert.
Mit Hilfe der Absorptionsspektrometrie wurde die Menge der isolierten Gesamt-RNA bestimmt. Aus dem Lysat mit 5'-FU behandelter MCF7-Zellen wurden 63,84µg Gesamt-RNA isoliert, während aus dem Lysat der nicht zytostatisch behandelten Kontrollzellen 50,88µg Gesamt-RNA isoliert wurden. 432µg Gesamt-RNA wurden aus dem Lysat mit MTX behandelter KS-Zellen sowie 349,6µg Gesamt-RNA aus dem Lysat der mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Kontrollzellen isoliert.
Zur Qualitätskontrolle wurde jeweils 1µg Gesamt-RNA auf ein MOPS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.
Aus der aus KS-Zellen gewonnenen Gesamt-RNA wurde in einem weiteren Arbeitsschritt nach dem Protokoll des Oligotex™ mRNA Mini Kits mRNA isoliert.

Abbildung 11 zeigt exemplarisch die für Gesamt-RNA typischen Banden nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Diese Banden entsprechen der 18S rRNA bzw. der 28S rRNA.

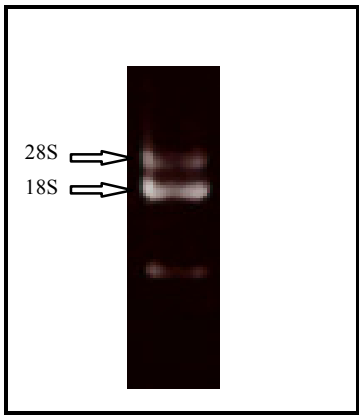


**Abb. 11:**
**Gelelektrophorese von Gesamt-RNA. Exemplarische Darstellung.**
**Die obere Bande entspricht der 28S rRNA, die untere Bande der 18S rRNA**

### 3.1.4 Reverse Transkription

Bevor die aus MCF7-Zellen isolierte RNA in der Reversen Transkription eingesetzt werden konnte, musste die in den Proben enthaltene genomische DNA durch DNaseI verdaut werden. Für diese Reaktion wurden je Ansatz 2µg Gesamt-RNA eingesetzt.
Die Reverse Transkription – ebenso wie die nachfolgende Differential-Display-PCR – wurde mit den Ankerprimern A, C, G und T durchgeführt. Ihre Sequenz – pd(T)12-V-X (X ist je nach Ankerprimer als Nukleotid A,T,G oder C definiert) – erlaubt es den Ankerprimern, an das 3'-Poly-A-Ende der mRNA zu binden und so letztendlich ein komplettes Screening zu gewährleisten.
Sowohl Reverse Transskription als auch Differential-Display-PCR erfolgten jeweils in zwei parallelen Ansätzen, so dass insgesamt vier identische Ansätze für die Auswertung mittels Autoradiographie zur Verfügung standen. Dies war

erforderlich, da die Methode der Differential-Display-PCR häufig zu falsch positiven Ergebnissen führt. Durch den vierfachen Ansatz sollten die Anzahl der falsch positiven Ergebnisse reduziert und zufällig entstehende Abweichungen ausgeschlossen werden. Als relevant wurden nach Gelauftrennung nur die Banden betrachtet, die in allen vier Spuren ein differenzielles Muster zeigten.

## *3.2 Einfluss von 5'-FU auf die Genexpression in MCF7-Zellen*

### 3.2.1 Differential-Display-PCR von cDNA

Mit Hilfe der Differential-Display-PCR lassen sich möglichst viele unterschiedlich exprimierte Gene detektieren. Hierzu werden Kombinationen aus ankerspezifischen Primern und Zufallsprimern eingesetzt. Unter Letzteren versteht man 10 bp lange Oligonukleotide, welche zu 50% aus Guanin- bzw. Cytosin-Resten bestehen.

Unter Verwendung der Ankerprimer und der Zufallsprimer – mit den Ankerprimern-T und A wurden aufgrund der erfahrungsgemäß geringeren Erfolgsaussichten, differenziell exprimierte Gene zu detektieren, nur Kombinationen mit den Zufallsprimern 1 bis 20 sowie DOC durchgeführt – kamen insgesamt 124 verschiedene Kombinationen zum Einsatz. 0,02µg cDNA wurden jeweils für die Differential-Display-PCR eingesetzt. Die nachfolgende Analyse wurde mittels Autoradiographie durchgeführt. Hierfür kam jeweils ein Viertel des PCR-Produktes zum Einsatz.

Nach Exposition des Röntgenfilms konnte eine Bande identifiziert werden, die einen deutlichen Unterschied in der Signalintensität zwischen dem Autoradiogramm zytostatisch mit 5'-FU behandelter MCF7-Zellen und dem Autoradiogramm der Kontrollzellen aufwies. Abb. 12 zeigt den entsprechenden Ausschnitt aus dem Autoradiogramm des Differential-Display-Gels.

Die Bande, die – wie nachfolgend beschrieben – isoliert, nach Reamplifikation kloniert und durch Sequenzierung analysiert wurde, war ein PCR-Produkt, das durch die Kombination von AnkerprimerG und Zufallsprimer27 amplifiziert

worden war. Die Bande war in den zytostatisch mit 5'-FU behandelten MCF7-Zellen wesentlich stärker zu erkennen als in den unbehandelten Kontrollzellen.

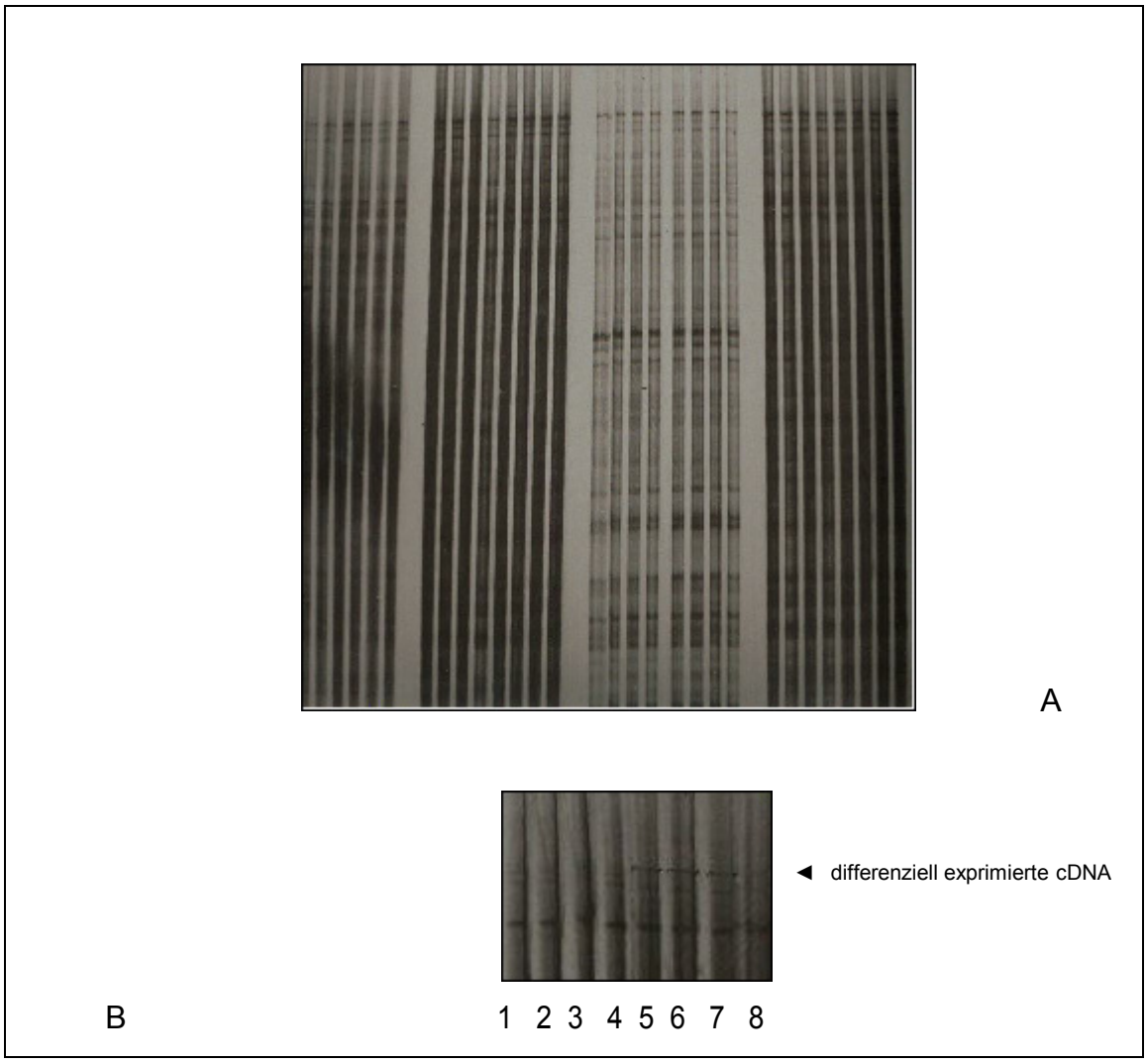


**Abb. 12:**

**Ausschnitt aus dem Autoradiogramm eines Differential-Display-Gels**

**cDNA aus MCF7-Zellen behandelt mit 5'-FU (Spuren 5 - 8) und unbehandelt (Spuren 1 - 4); Verwendung der Primerkombination AnkerprimerG und Zufallsprimer27; $^{33}$P-labelling.**

**A: Übersicht**

**B: Vergrößerter Ausschnitt. Differenz im Autoradiographie-Signal der beiden cDNAs Zusätzliche Bande in der cDNA-Population behandelter Zellen (◄)**

### 3.2.2 Klonierung der PCR-Produkte in den pCR®2.1-Topo Vektor und Restriktionsanalyse

Autoradiogramm und Gel wurden deckungsgleich übereinander gelegt. So ließ sich die Bande in dem Autoradiogramm der entsprechenden Position im Gel zuordnen.

Die Bande wurde ausgeschnitten und mit 100µl deionisiertem Wasser 15min bei 100°C erhitzt; 1µl der Lösung wurde für die Reamplifikations-PCR eingesetzt. Die Amplifikation fand unter Verwendung des gleichen Primer-Paares statt, welches zuvor in der Differential-Display-PCR eingesetzt worden war (in diesem Fall AnkerprimerG und Zufallsprimer27). Die reamplifizierten PCR-Produkte wurden aus dem DNA-Gel ausgeschnitten, in den pCR®2.1-Topo Vektor kloniert und das daraus resultierende Plasmid/cDNA-Konstrukt in kompetente E. coli transformiert. 4µl des PCR-Produktes wurden jeweils für eine Klonierung eingesetzt.

Die E. coli-Bakterien wurden auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausplattiert und über 12 Stunden bei 37°C kultiviert. Aufgrund der Resistenz des pCR®2.1-Topo Vektors gegenüber Ampicillin wurden auf diese Weise transformierte E. coli-Bakterien selektioniert. Die rekombinanten Klone ließen sich anhand ihrer weißen Farbe erkennen, da durch die Unterbrechung des β-Galaktosidasegens bei Insertion die Umsetzung von X-Gal zu einem blauen Farbstoff verhindert wird.

Es wurden insgesamt fünf rekombinante Klone gepickt. Diese wurden 12 Stunden in flüssigem, Ampicillin-haltigem LB-Medium kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde isoliert und 2,5µl des Isolats mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten. EcoRI schneidet das Plasmid zu beiden Seiten des Inserts; daher werden in der Gelelektrophorese nach einer erfolgreichen Restriktionsanalyse Insert und Plasmid getrennt als Banden sichtbar. Abbildung 13 zeigt das Ergebnis der Restriktionsanalyse nach gelelektrophoretischer Auftrennung:

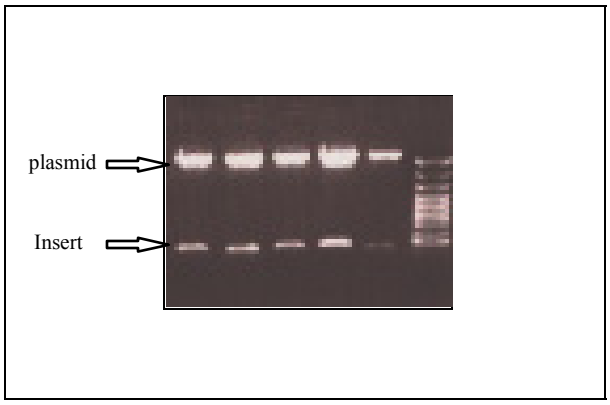


**Abb. 13:**
**Restriktionsanalyse mit EcoRI. Die Banden am oberen Bildrand entsprechen der Plasmid-DNA, die Banden am unteren Bildrand dem herausgeschnittenen Insert, der interessierenden cDNA.**

### 3.2.3 Sequenzanalyse

Alle Klone wurden unter Verwendung der M13-Standard-Primer sequenziert. Die Sequenzierung wurde von Dr. Andreas Hunziker (Abteilung Prof. Franke, DKFZ) durchgeführt.
Es wurde das in Abbildung 14 dargestellte, 464bp lange cDNA-Fragment sequenziert.
Die Nukleotide an beiden Flanken der Sequenz entstammen nicht der differenziell exprimierten cDNA, sondern dem Plasmid. In dem cDNA-Fragment finden sich zwei Primerbindungsstellen in unterschiedlicher Orientierung für AnkerprimerG, keine jedoch für den eingesetzten Zufallsprimer27. Beinhaltet ein cDNA-Fragment an beiden Flanken eine Reihe sukzessive aufeinander folgender Adenin-Reste bzw. Thymin-Reste und weist damit an beiden Seiten eine dem Ankerprimer komplementäre Struktur auf, so kann dies Folge einer isolierten Bindung des Ankerprimers an beiden Enden sein ohne jegliche Involvierung eines Zufallsprimers.

Nachfolgend ist an den beiden Primerbindungsstellen – in unterschiedlicher Orientierung – AnkerprimerG dargestellt. Die beiden Primerbindungstellen umgeben die eigentlich interessierende, 409 lange cDNA.

```
        ⇓                TTTTTTTTTTTGG
1       GAATTCGCCCTTTTTTTTTTTTTGGCAATAAAGCTAAAACTCACCTGAG

51      TTGTAAAAAACTCCAGTTGACACAAAATAGACTACGAAAGTGGCTTTAAC

101     ATATCTGAACACACAATAGCTAAGACCCAAACTGGGATTAGATACCCCAC

151     TATGCTTAGCCCTAAACCTCAACAGTTAAATCAACAAAACTGCTCGCCAG

201     AACACTACGAGCCACAGCTTAAAACTCAAAGGACCTGGCGGTGCTTCATA

251     TCCCTCTAGAGGAGCCTGTTCTGTAATCGATAAACCCCGATCAACCTCAC

301     CACCTCTTGCTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCCTGATGAAG

351     GCTACAAAGTAAGCGCAAGTACCCACGTAAAGACGTTAGGTCAAGGTGTA

401     GCCCATGAGGTGGCAAGAAATGGGCTACATTTTCTACCCCAAAAAAAAAA
                ⇓                                GGTTTTTTTTTT
451     AAAAGGGCGAATTC
        TT
```

**Abb.14:**

**Nukleotidsequenz des isolierten cDNA-Fragments.**

**Die eigentlich interessierende cDNA (fett gedruckt) erstreckt sich über eine Länge von 409bp. Zu beiden Seiten dieses Fragments findet sich – in unterschiedlicher Orientierung – eine Primerbindungsstelle (unterstrichen) für AnkerprimerG. Es existiert keine Primerbindungsstelle für den eingesetzten Zufallsprimer27. Die Nukleotide an beiden Flanken entstammen dem Plasmid. Kursiv dargestellt: AnkerprimerG.**

**⇓: Schnittstelle EcoRI**

Durch einen Datenbankabgleich mit Hilfe des NCBI-Programms „BLAST“ wurde die isolierte cDNA bekannten Sequenzen zugeordnet.

Die cDNA, in Sense-Orientierung in das Plasmid kloniert, zeigte eine Homologie von 100 % zu einer Sequenz, welche verschiedenen Mitochondrien, z.B. „Homo sapiens, Haplotyp L3d Mitochondrion, genebank accession number AF281998.1“ gemein ist.

### 3.2.4 Validierung des Ergebnisses aus der Differential-Display-PCR

Da es bei der Differential-Display-PCR häufig zu falsch positiven Resultaten kommt, musste eine Validierung erfolgen. Diese wurde mit der Real-Time-PCR durchgeführt. Für die Amplifikationen wurden genspezifische Primer (MITOs und MITOas) synthetisiert. Je Ansatz wurden 2µl einer im Verhältnis 1/10 verdünnten cDNA eingesetzt.
Für die Erstellung der Standardkurve wurden zwischen 0,2 und 0,0002µg cDNA eingesetzt.
Mit Hilfe des ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection Systems und des angeschlossenen MACs wurden die zyklusspezifischen Veränderungen der Fluoreszenzsignale (die Emissionen) verschiedener cDNAs während der PCR detektiert, wodurch sich Rückschlüsse auf die initiale Kopienzahl der untersuchten cDNAs ziehen lassen. Zur Veranschaulichung des Ergebnisses wurde die Zykluszahl (Abszisse) in Abhängigkeit vom normalisierten Reportersignal (Ordinate) – Letzteres entspricht dem Quotienten der Emissionsintensität dividiert durch die Emissionsintensität der passiven Referenz nach Ausgleich des reaktionsspezifischen Hintergrundsignals und unspezifischer Einflüsse – graphisch dargestellt. Dabei erfolgt die erstmalige Detektion des Reportersignals umso früher, je größer der Ausgangsgehalt der interessierenden cDNA einer Probe ist.
Abbildung 15 zeigt die graphische Darstellung des Ergebnisses der Real-Time-PCR; die normalisierten Reportersignale – diese entsprechen vereinfacht den korrigierten Emissionen – sind dabei in Abhängigkeit vom PCR-Zyklus dargestellt. Es wurde die Emission der cDNA zytostatisch mit 5'-FU behandelter Zellen mit der Emission der cDNA unbehandelter Zellen verglichen, die Normalisierung erfolgte durch die Amplifikation des Haushaltsgens GAPDH.
Die Signale der GAPDH-Kontrollen sind nahezu deckungsgleich, was auf eine identische initiale Kopienzahl schließen lässt. In der genspezifischen PCR liegen die Signale der cDNAs behandelter und unbehandelter Zellen übereinander, was auf eine gleich hohe initiale Kopienzahl von Mitochondrien in der cDNA behandelter und unbehandelter Zellen zurückzuführen ist. Somit

bestätigte sich die Hochregulation von Mitochondrien durch 5'-Fluorouracil nicht; die Unterschiede im Bandenmuster im Autoradiogramm sind als falsch positiv zu werten.

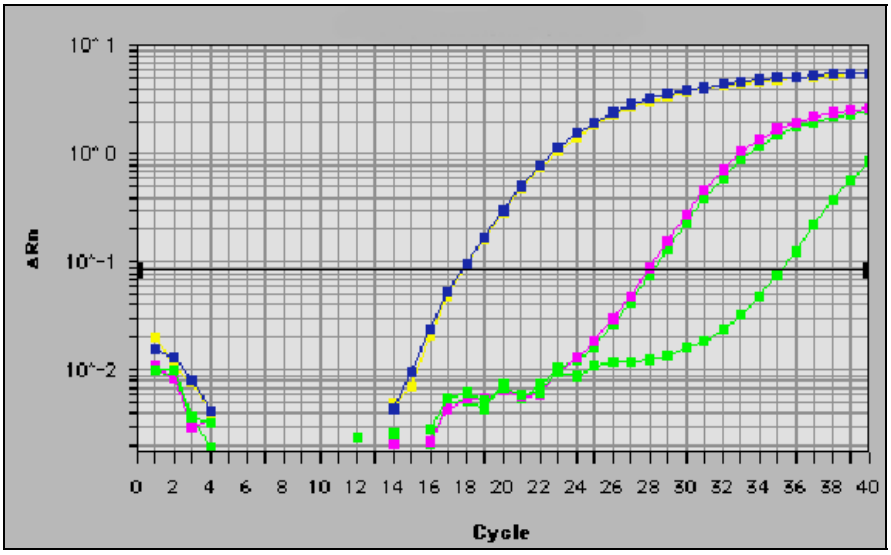


**Abb. 15:**

**Validierung der differenziellen Expression von Mitochondrien in MCF7-Zellen nach Inkubation mit 5'-Fluorouracil. Real-Time-PCR.**

**Abszisse: Zykluszahl, Ordinate: ΔRn (normalisiertes Reportersignal).**

**Links, übereinander liegend: Signale der cDNAs behandelter und unbehandelter Zellen, genspezifische PCR;**

**in der Mitte, ebenfalls übereinander liegend: Signale der GAPDH-Kontrollen,**

**ganz rechts: Signal der Leerkontrolle**

**Die Signale der cDNAs behandelter und unbehandelter Zellen erscheinen gleichzeitig in der genspezifischen PCR, die differenzielle Expression von Mitochondrien konnte somit nicht bestätigt werden.**

## *3.3 Einfluss von MTX auf die Genexpression in KS-Zellen*

### 3.3.1 Subtraktive Hybridisierung von cDNA unter Verwendung des PCR-Select™ Subtraction Kits

Mit Hilfe des PCR-Select™ Subtraction Kits wurden die Einflüsse von MTX auf die Genexpression in KS-Zellen untersucht. Prinzip dieses Verfahrens ist es, cDNA anzureichern, die in einer von zwei miteinander zu vergleichenden mRNA-Populationen deutlich stärker vertreten ist.

Zunächst erfolgte aus je 2µg mRNA die Synthese doppelsträngiger cDNA. An die Adapterligation der Tester-cDNA schließen sich zwei aufeinander folgende Hybridisierungen zwischen Tester-cDNA und der im Überschuss zugesetzten Driver-cDNA an.

Ziel dieser beiden Hybridisierungsschritte ist es, differenziell exprimierte Sequenzen anzureichern. In den beiden nachfolgenden PCR-Schritten werden nur die differenziell exprimierten, nicht mit der Driver-cDNA hybridisierten doppelsträngigen Tester-cDNA-Fragmente exponentiell amplifiziert, welche unterschiedliche Adapter besitzen; der Hintergrund wird weiter reduziert. Mit Hilfe des PCR-Select™ Subtraction Kits ist es jedoch nur möglich, Differenzen im Expressionsmuster in der Tester-cDNA zu detektieren, nicht aber in der Driver-cDNA. Daher wurde in einem weiteren Ansatz eine reziproke Subtraktion durchgeführt, in der die ehemalige Tester-cDNA als Referenz-cDNA (Driver-cDNA) und die ehemalige Driver-cDNA als Tester-cDNA eingesetzt wurden.

### 3.3.2 Klonierung der subtrahierten PCR-Produkte in den pCR®2.1-Topo-Vektor

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in den pCR®2.1-Topo Vektor ligiert und kompetente E. coli mit dem daraus resultierenden Plasmid/DNA-Konstrukt transformiert.

2,5µl des PCR-Produktes wurden jeweils für eine Ligation eingesetzt. Die transformierten E. coli-Bakterien wurden auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ausplatiert und über 12 Stunden bei 37° C kultiviert. Die rekombinanten 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.
Um Klone, die ein PCR-Produkt als Insert enthalten zu identifizieren, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Es wurden je Ansatz insgesamt 96 Kolonien gepickt.

### 3.3.3 Southern-Blot-Analyse

Um die Anreicherung differenziell exprimierter cDNAs zu visualisieren, wurde eine Southern-Blot-Analyse mit 192 erhaltenen cDNA-Fragmenten – die eine Hälfte entstammt der Driver-cDNA, die andere der Tester-cDNA – durchgeführt. Es wurden je Ansatz 96 Kolonien rekombinanter Klone gepickt und direkt der Kolonie-PCR zugeführt. Das im jeweiligen Plasmid inserierende cDNA-Fragment wurde unter Verwendung der M13-Standard-Primer reamplifiziert. Jedes PCR-Experiment wurde doppelt durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt und zuletzt auf Nylonmembranen übertragen.
Auf diese Weise wurden je Ansatz zwei identisch geblottete Nylonmembranen hergestellt. Eine der beiden Membranen wurde mit der Sonde aus Tester-cDNA, die andere mit der Sonde aus Driver-cDNA hybridisiert. Die cDNA einer differenziell exprimierten mRNA hybridisiert erwartungsgemäß nur mit der Tester-cDNA, nicht jedoch mit der Driver-cDNA.
Zur Herstellung dieser cDNA-Sonden wurden 250ng mRNA unter Verwendung des Oligo-(dT)-Randomprimers revers transkribiert. Bei sehr geringer Ausbeute an mRNA ist auf die Durchführung von DNA-Hydrolyse und Qualitätskontrolle mittels RNA-Gelelektrophorese verzichtet worden.
Je 40ng Driver- und Tester-cDNA wurden unter Verwendung des Megaprime™ cDNA Labelling Systems [$\alpha$-$^{32}$P]-dCTP-markiert. Das Produkt wurde mit Säulenchromatographie unter Einsatz von Sephadex-G50-Säulen (NICK™ Columns) von nicht eingebauten Nukleotiden gereinigt.
Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C über 12 Stunden. Die Analyse wurde mittels Autoradiographie durchgeführt, wobei der Röntgenfilm bei -80° C

zwischen 24 und 168 Stunden exponiert wurde. In zwei Fällen konnten stärkere Signale bei Hybridisierung von Tester-cDNA mit der Tester-cDNA-Sonde als bei der entsprechenden Hybridisierung mit der Driver-cDNA-Sonde detektiert werden. Die cDNA zytostatisch behandelter Zellen ist in diesem Fall als Tester-cDNA und die cDNA unbehandelter Zellen als Driver-cDNA definiert worden.

In den Abbildungen 16 und 17 sind die entsprechenden Ausschnitte des Autoradiogramms der Subtraktiven cDNA-Bank dargestellt. Der linke Bildausschnitt repräsentiert jeweils die Hybridisierung von Tester-cDNA mit radioaktiv markierter Tester-cDNA als Referenz, der rechte Bildausschnitt die Hybridisierung von Tester-cDNA mit Driver-cDNA als Referenz.

In beiden Abbildungen ist jeweils im linken Ausschnitt ein starkes Signal (↓) erkennbar, welches an der entsprechenden Position des anderen Autoradiogramms (rechter Bildausschnitt) deutlich schwächer ausgeprägt (Abb. 16) bzw. gar nicht vorhanden (Abb. 15) ist. Dies weist auf die Hochregulation zweier Gene nach 8-stündiger Inkubation mit MTX hin.

Die beiden Signale repräsentieren dabei die differenziell exprimierten cDNAs, nachfolgend als cDNAI (Abbildung 15) und cDNAII (Abbildung 16) bezeichnet.

Alle anderen Signale zeigten im Autoradiogramm keine signifikanten Unterschiede bezüglich ihrer Intensitäten.

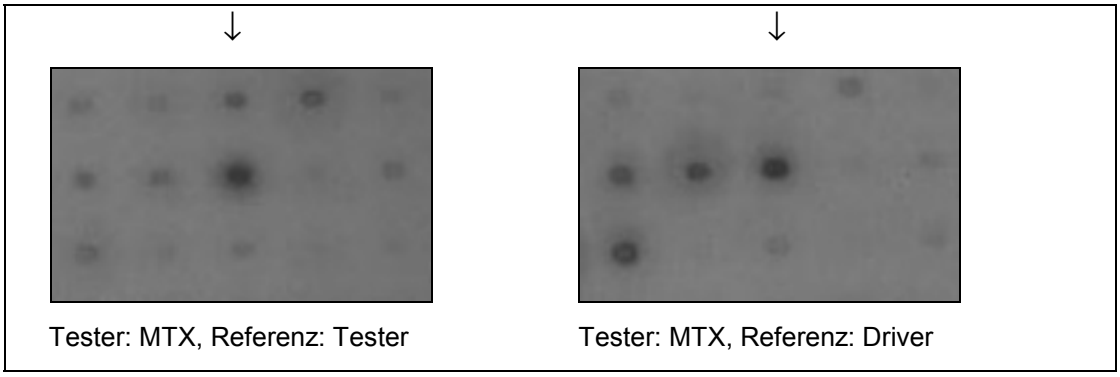


**Abb. 16:**

**Ausschnitt aus dem Autoradiogramm der Subtraktiven cDNA-Bank. $^{32}$P-labelling. Hybridisierung der auf Nylonmembranen geblotteten, klonierten PCR-Produkte aus Tester-cDNA mit radioaktiv markierter Tester-cDNA (linke Abbildung) und Driver-cDNA (rechte Abbildung) als Referenz-cDNAs. Das verglichen mit der gleichen Position in der rechten Abbildung nur im linken Ausschnitt erkennbare Signal (↓) repräsentiert die subtraktive, differenziell exprimierte cDNAI. Fünf der dem markierten Signal zu Grunde liegenden Klone wurden gepickt und einer Restriktionsanalyse zugeführt.**

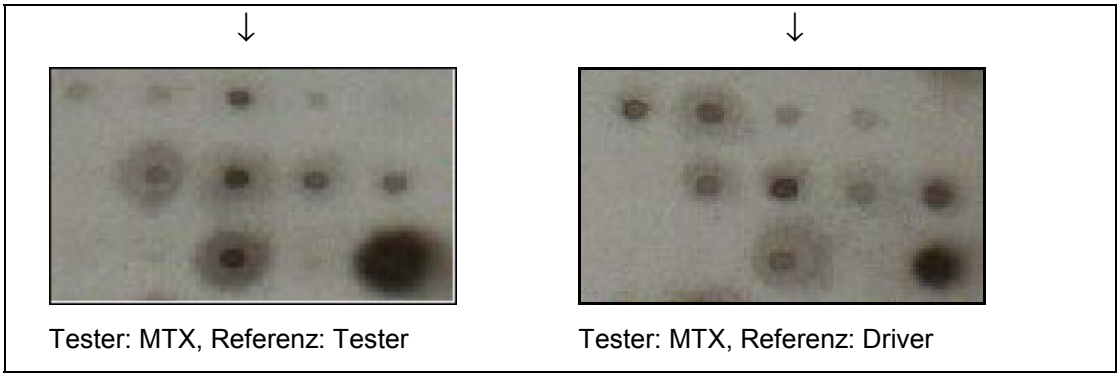


**Abb. 17:**

**Ausschnitt aus dem Autoradiogramm der Subtraktiven cDNA-Bank. $^{32}$P-labelling. Hybridisierung der auf Nylonmembranen geblotteten, klonierten PCR-Produkte aus Tester-cDNA mit radioaktiv markierter Tester-cDNA (linke Abbildung) und Driver-cDNA (rechte Abbildung.) als Referenz-cDNAs. Das verglichen mit der gleichen Position in der rechten Abbildung im linken Ausschnitt stärkere Signal (↓) repräsentiert eine potenziell differenziell exprimierte cDNAII. Fünf der dem markierten Signal zu Grunde liegenden Klone wurden gepickt und einer Restriktionsanalyse zugeführt.**

### 3.3.4 Restriktionsanalysen

Jeweils fünf der Klone, deren Hybridsignale im Autoradiogramm deutlich stärker waren als ihre entsprechenden Gegenstücke, wurden in Ampicillin-haltigem LB-Medium bei 37°C weiter kultiviert. Nach 12-stündiger Inkubation wurden die verschiedenen Plasmide durch DNA-Präparationen aus den transformierten E. coli-Bakterien isoliert. Die cDNA wurde für eine Restriktionsanalyse mit der Endonuklease EcoRI geschnitten. EcoRI schneidet das Plasmid zu beiden Seiten des Inserts. Die verdaute DNA wurde im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung 18 zeigt das Ergebnis der Restriktionsanalyse nach gelelektrophoretischer Auftrennung: In der linken Bildhälfte in den Spuren 1 bis 5 sind die Restriktionsanalysen der Plasmid/cDNAII-Präparationen dargestellt.
In allen fünf Ansätzen stellt sich jeweils nur der Vektor dar; eine zusätzliche, die herausgeschnittene cDNAII repräsentierende Bande findet sich nicht.

In der rechten Bildhälfte in den Spuren 6 bis 10 sind die Restriktionsanalysen der Plasmid/cDNAI-Präparationen dargestellt. Hier zeigt sich neben dem geschnittenen Plasmid noch eine weitere Bande in der Größe von 300bp. Diese Bande entpricht dem aus dem Plamid geschnittenen cDNA-Fragment, der differenziell exprimierten cDNAI.

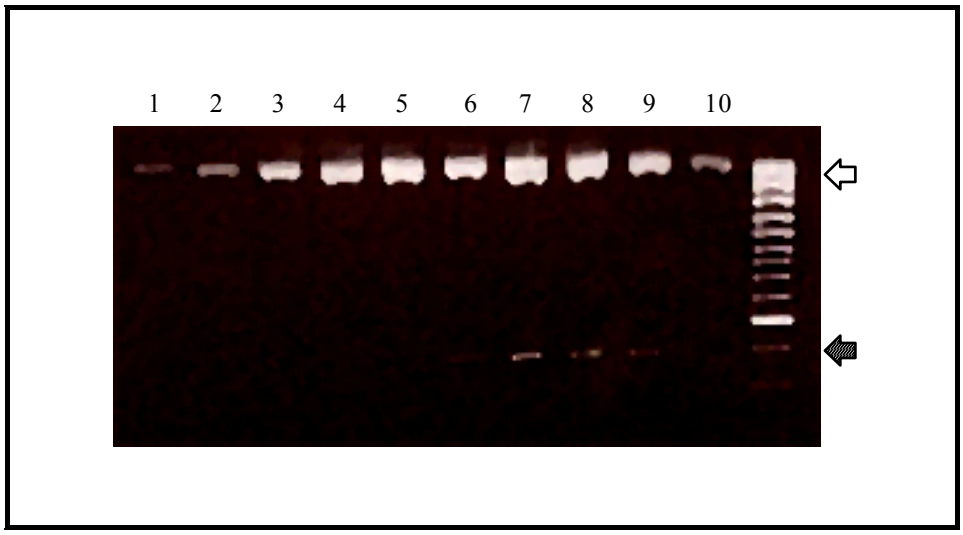


**Abb. 18:**

**Restriktionsanalysen - EcoRI Verdau**

**Die Banden am oberen Bildrand repräsentieren jeweils die Plasmid-DNA (⇦).**

**Spuren 1-5: Restriktionsanalysen der „Plasmid/cDNAII-Präparationen“ (vgl. Abb. 17) Hier fehlt in allen Ansätzen die das geschnittene cDNAII-Fragment repräsentierende Bande, stattdessen wird das Plasmid alleine dargestellt.**

**Spuren 6-10: Restriktionsanalysen der „Plasmid/cDNAI-Präparationen“ (vgl. Abb. 16) Hier stellt sich bei einer Größe von ca. 300bp die Bande des geschnittenen Inserts entsprechend cDNAI (⇦) dar.**

cDNAI wurde nach der erfolgreichen Restriktionsanalyse sequenziert. Bezüglich cDNAII wurden keine weiteren Experimente durchgeführt.

### 3.3.5 Sequenzanalyse

Nach der erfolgreichen Restriktionsanalyse wurde cDNAI sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch Dr. Andreas Hunziker unter Verwendung der M13-Standard-Primer.

Es wurde für cDNAI eine 352bp lange Sequenz identifiziert. Die ersten 23 Nukleotide am 5'-Ende entstammen Adapter2 und Plasmid.

In Abbildung 19 ist die 329bp lange Sequenz von cDNAI dargestellt.

An beiden Flanken, jeweils durch die Schnittstellen des Restriktionsenzyms RSAI begrenzt, finden sich Teilsequenzen der ligierten Adapter, so dass die eigentlich differenziell exprimierte cDNA nur 316bp umfasst. Dabei befindet sich Adapter2 am 5'-Ende der isolierten Sequenz, Adapter1 hingegen am 3'-Ende. Die Schnittstellen von RSAI sind fettgedruckt.

*GGCCGAGGT*

1 GGCCGAG**GTAC**CTGTCTTCACATGTGGGGAAACTTCATAACTGTGCCCAC

51 AAATCAGAGAAATTCGCAAAGGACTAGACAATGTATTGCCTGTGAACTTC

101 AGAGGCAACTGGAAATAGTGCAACTGGAAATCAACTAGCTTCATACATAG

151 GCGGATTTGTTTCCAGGGACCAAAAGCACAGAAGATAAGAAAACTTTTCA

201 GGTGATGGCCATATTCTCATCATATCCTCTCTGTGTGGAGTCTGCCTGTT

251 GTCACAAAAACCTTGACCCTACATCAAGTTACACCTTAACAAAGGGAAGA

301 TACAGGCATCAGATAAAAG**GTAC**CTGCCC

*ACCTGCCC..*

**Abb. 19:**

**Darstellung der Nukleotidsequenz der differenziell exprimierten cDNAI.**

**Die Schnittstellen des Restriktionsenzyms RSAI sind fett gedruckt, die Nukleotide proximal der ersten bzw. distal der zweiten Schnittstelle entsprechen Teilsequenzen der ligierten Adapter (5'-Ende: Adapter2, 3'-Ende Adapter1, beide kursiv gedruckt). Die eigentliche differenziell exprimierte cDNA umfasst 316 Nukleotide. Nicht dargestellt sind die Nukleotide am 5'-Ende, welche dem Plasmid sowie Adapter2 entstammen müssen.**

Das cDNA-Fragment konnte durch einen Datenbankabgleich mit dem NCBI-Programm „BLAST“ bekannten Sequenzen zugeordnet werden. Es handelte sich dabei um ein 316bp langes Fragment der cDNA der β-Untereinheit des humanen Signalerkennungspartikelrezeptors (genebank accession number: NM_021203), welches in Antisense-Orientierung in das Plasmid kloniert worden war. Die Homologie betrug 100%. Das zu Grunde liegende Gen wird als „APMCF1-Gen“, das Genprodukt neben „β-Untereinheit des humanen Signalerkennungs-partikelrezeptors“ auch als „APMCF1-Protein“ bezeichnet.

### 3.3.6 Validierung der differenziellen Expression von SRβ

Bevor von einer vermehrten Expression der β-Untereinheit des Signal-erkennungspartikelrezeptors durch MTX auszugehen war, war eine Validierung des Ergebnisses mit mindestens einer weiteren, unabhängigen Methode notwendig.

Hierzu wurden semiquantitative PCR und die Real-Time-PCR verwendet. Für die Amplifikationen wurden genspezifische Primer (KSA6SQP1249s und KSA6SQP1596as) synthetisiert. In der semiquantitativen PCR wurden je Ansatz 0,1µg cDNA, in der Real-Time-PCR 0,02 µg cDNA eingesetzt.

Für die Erstellung der Standardkurve wurden zwischen 0,2 und 0,0002 µg cDNA eingesetzt.

Mit Hilfe des ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection Systems und des angeschlossenen MACs wurden die zyklusspezifischen Veränderungen der Fluoreszenzsignale (die Emissionen) verschiedener cDNAs während der PCR detektiert, wodurch sich Rückschlüsse auf die initiale Kopienzahl der untersuchten cDNAs ziehen lassen. Zur Veranschaulichung des Ergebnisses wurde die Zykluszahl (Abszisse) in Abhängigkeit vom normalisierten Reportersignal (Ordinate) – Letzteres entspricht dem Quotienten der Emissionsintensität dividiert durch die Emissionsintensität der passiven Referenz nach Ausgleich des reaktionsspezifischen Hintergrundsignals und

unspezifischer Einflüsse – graphisch dargestellt. Dabei erfolgt die erstmalige Detektion des Reportersignals umso früher, je größer der Ausgangsgehalt der interessierenden cDNA einer Probe ist.

In Abbildung 20 ist die graphische Darstellung des Ergebnisses der Real-Time-PCR aufgezeigt; die normalisierten Reportersignale (diese entsprechen vereinfacht den korrigierten Emissionen) sind dabei in Abhängigkeit vom PCR-Zyklus dargestellt. Es wurde die Emission der cDNA zytostatisch mit MTX behandelter Zellen mit der Emission der cDNA unbehandelter Zellen verglichen, die Normalisierung erfolgte durch die Amplifikation des Haushaltsgens GAPDH. Die Signale der GAPDH-Kontrollen der cDNA behandelter und unbehandelter Zellen sind nahezu identisch. Dies beweist, dass in beiden Proben gleich viel cDNA für die PCR eingesetzt worden war. Somit konnte eine Verfälschung des Ergebnisses durch den Einsatz unterschiedlicher cDNA-Mengen ausgeschlossen werden.
In der SRβ-spezifischen PCR erscheint das Signal der cDNA behandelter Zellen vor dem Signal der cDNA unbehandelter Zellen. In der SRβ-spezifischen PCR ergab sich eine Konzentration von 0,125ng/µl bei behandelten Zellen und eine Konzentration von 0,065ng/µl bei unbehandelten Zellen. In der GAPDH-spezifischen PCR ergab sich eine Konzentration von 1,585ng/µl bei behandelten Zellen und eine Konzentration von 1,645ng/µl bei unbehandelten Zellen. Wenn man die Signale des untersuchten Gens durch die Signale der entsprechenden GAPDH-Kontrollen korrigiert und danach zueinander ins Verhältnis setzt, so ergibt sich eine doppelt so hohe (1,996-fache) Kopienzahl in der cDNA behandelter Zellen im Vergleich zur cDNA unbehandelter Zellen. Dies beweist die differenzielle Expression.

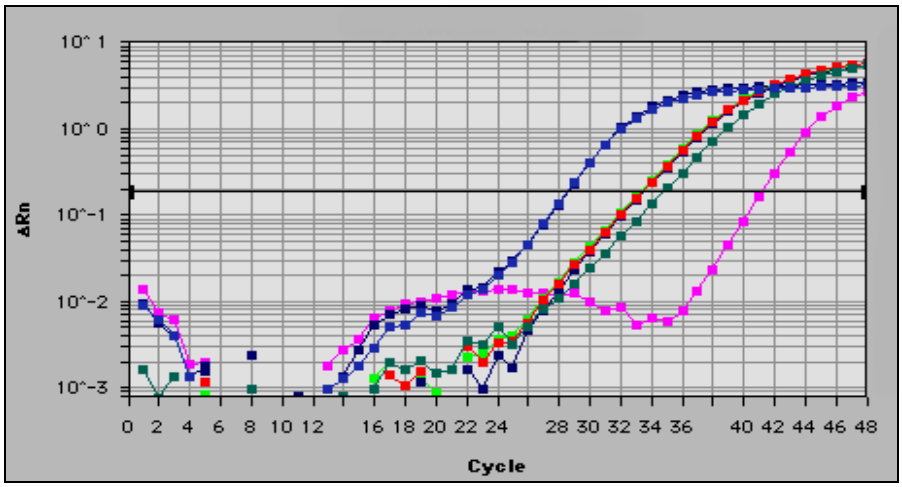


**Abb. 20:**

**Validierung der differenziellen Expression der β-Untereinheit des Signalerkennungs-partikelrezeptors nach MTX-Inkubation. Real-Time-PCR.**

**Abszisse: Zykluszahl, Ordinate: ΔRn (normalisiertes Reportersignal). Von links nach rechts: Signal der beiden GAPDH-Kontrollen; Signal der cDNA behandelter Zellen (SRβ-spezifische PCR), Signal der cDNA unbehandelter Zellen (SRβ-spezifische PCR), Signal der Leerkontrolle.**

**In der SRβ-spezifischen PCR erscheint das Signal der cDNA behandelter Zellen erstmalig etwa einen Zyklus vor dem Signal der cDNA unbehandelter Zellen.**

Abbildung 21 zeigt das Ergebnis der semiquantitativen PCR. Die Visualisierung erfolgte mittels Gelelektrophorese und nachfolgender UV-Spektroskopie. Auf eine weitere GAPDH-Kontrolle war hierbei verzichtet worden. Die cDNA zytostatisch mit MTX behandelter Zellen wurde nach 21, 24, 27 und 31 jeweils mit der entsprechenden cDNA unbehandelter Zellen verglichen. Die Paare sind nach Zyklenzahl in aufsteigender Form angeordnet, wobei die PCR-Produkte unbehandelter Zellen jeweils vorausgehen. Es zeigt sich jeweils eine spezifische Bande zwischen 300 und 400bp. Dies entspricht der erwarteten Größe des PCR-Produkts von 375bp.

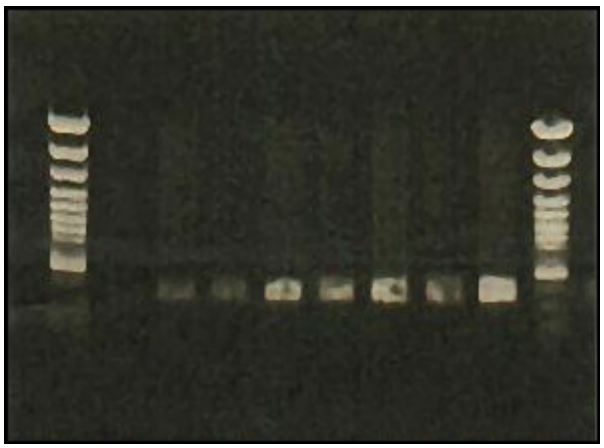


**Abb. 21:**

**Validierung der differenziellen Expression der β-Untereinheit des Signalerkennungs-partikelrezeptors. Semiquantitative PCR.**

**Vergleich der cDNA zytostatisch mit MTX behandelter Zellen mit der cDNA unbehandelter Zellen in Abhängigkeit von der Anzahl der PCR-Zyklen. Ethidiumbromidfärbung.**

**1: cDNA unbehandelter Zellen; 21 Zyklen, 2: cDNA behandelter Zellen; 21 Zyklen**
**3: cDNA unbehandelter Zellen; 24 Zyklen, 4: cDNA behandelter Zellen; 24 Zyklen**
**5: cDNA unbehandelter Zellen; 27 Zyklen, 6: cDNA behandelter Zellen; 27 Zyklen**
**7: cDNA unbehandelter Zellen; 31 Zyklen, 8: cDNA behandelter Zellen; 31 Zyklen**

Vergleicht man die beiden Banden der nach Zykluszahl gebildeten Pärchen, so weist die cDNA behandelter Zellen jeweils ein deutlich stärkeres Signal auf als die entsprechende cDNA unbehandelter Zellen. Dieses Ergebnis beweist eine initial höhere Kopienzahl in der cDNA zytostatisch mit MTX behandelter Zellen und damit die differenzielle Expression.

Es konnte also mit zwei unterschiedlichen Methoden das Ergebnis aus der Subtraktiven Hybridisierung bestätigt werden.

Die Quantifizierung ergab ein doppelt so hohes Expressionsniveau der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors in behandelten KS-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

### 3.3.7 Lokalisation und Charakterisierung des APMCF1-Gens

Das Gen ist auf Chromosom 3q22.1 lokalisiert und kodiert die β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors. Es beinhaltet 7 Exons und 6 Introns und erstreckt sich über eine Länge von mindestens 14 846bp genomischer DNA. Die Übergänge zwischen den Exons und Introns, dargestellt in Abb. 21, wurden durch den Vergleich der mRNA-Sequenz (genebank accession number NM_021203) mit der Sequenz genomischer DNA (genebank accession number NT_005612) bestimmt.

In den Spalten 3 und 5 in Abbildung 21 sind die Sequenzen der jeweiligen Übergänge von Exon zu Intron (Spalte 3) bzw. Intron zu Exon (Spalte 5) dargestellt; die linken 10 Nukleotide entstammen jeweils dem stromabwärts liegenden 3'-Ende, die rechten 10 Nukleotide dem stromaufwärts liegenden 5'-Ende des entsprechen Genabschnitts. Wie für eukaryotische Zellen typisch, beginnen die Introns mit den Nukleotiden GT (bzw. GU in RNA) und enden auf AG.

In den Spalten 1 und 4 wird die Größe der Exons bzw. der Introns dargestellt. Spalte 2 zeigt die Position der Exons in der cDNA nach Entfernung der Introns durch Spleiß-Vorgänge.

| Exon (bp) | Position cDNA | Übergang Exon_Intron, Sequenz 3'-Ende Exon _ 5'-Ende Intron | Intron (bp) | Übergang Intron_Exon, Sequenz 3'-Ende Intron_ 5'-Ende Exon |
|---|---|---|---|---|
| 1 (170) | 1 - 170 | CTGACGCTAG__**GT**AAAAGGCG | 1 (606) | TATTCCAC**AG**__TCTTCTGGAA |
| 2 (95) | 171 - 265 | CTTTGTCAGG__**GT**AAATGATT | 2 (1042) | TTTTTTAC**AG**__TTGTTAACAGG |
| 3 (79) | 266 - 343 | CAATAACAGG__**GT**AAGATGTT | 3 (3293) | CCATCCCC**AG**__GGCAATAGTC |
| 4 (83) | 344 - 426 | CTTCAGCCAG__**GT**AAGAAGGA | 4 (4390) | CTCCCTCC**AG**__GGCTATTGTG |
| 5 (137) | 427 - 563 | AATAAGCAAG__**GT**GCCATCAT | 5 (1151) | TTCTTTAC**AG**__ATATTGCAAT |
| 6 (54) | 564 - 618 | AGAAAGAACT__**GT**AAGTGTGA | 6 (2620) | TGCCCCAC**AG**__CAACACCTTA |
| 7 (1127) | 619 - 1745 | | | |

**Abb. 22:**

**APMCF1-Gen. Darstellung der Exon-Intron-Struktur einschließlich Übergängen.**

**Spalte 1 zeigt die Länge (in bp) der einzelnen Exons, Spalte 2 die entsprechende Position in der cDNA, nachdem durch den Spleiß-Vorgang die Introns aus der Vorläufer-RNA entfernt worden sind. Zwischen den Exons befinden sich in genomischer DNA und Vorläufer-RNA, nicht jedoch in reifer RNA, die Introns, wobei das Intron auf das entsprechende Exon folgt. Die Länge der einzelnen Introns wird, ebenfalls in bp, in Spalte 4 dargestellt. In den Spalten 3 und 5 werden die Sequenzen der Übergänge von Exon zum Intron (Spalte 3) bzw. Intron zum Exon (Spalte 5) aufgezeigt; die linken 10 Nukleotide werden jeweils vom abwärts liegenden 3'-Ende, die rechten 10 Nukleotide vom aufwärts liegenden 5'-Ende des entsprechenden Genabschnitts gebildet. Wie für eukaryotische Zellen typisch, beginnen die Introns mit den Nukleotiden GT (RNA: GU) und enden auf AG.**

Abbildung 23 zeigt die cDNA, die Proteinsequenz sowie die Primerbindungsstellen für die spezifischen Primer. Die mRNA erstreckt sich nach dem Entfernen der Introns über insgesamt 1745bp, wobei der ORF die Nukleotide 17 bis 832 umfasst. Die Nukleotide 17-19 bilden das Start-Kodon. Die fettgedruckte Teilsequenz entspricht dem subtrahierten cDNA-Fragment. Sie befindet sich im 3'-untranslatierten Bereich des Gens. Aufgrund ihrer Antisense-Orientierung im sequenzierten Plasmid ist die Sequenz des subtrahierten cDNA-Fragments in dieser Abbildung nicht direkt, sondern in sense-Orientierung dargestellt.

Das APMCF1-Gen kodiert für ein 29,7kDa schweres Genprodukt, die β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors. Die β-Untereinheit besteht aus 271 Aminosäuren und enthält eine GTP-bindende Protein-Domäne. Außerdem wird eine transmembrane Helix zwischen den Aminosäuren 37 bis 54 vermutet.

```
1       ACCACGCGTCTCATCCATGGCTTCCGCGGACTCGCGCCGGGTGGCAGATGGCGGCGGTGC
1                          M  A  S  A  D  S  R  R  L  A  D  G  G  G  A

61      CGGGGGCACCTTCCAGCCCTACCTAGACACCTTGCGGCAGGAGCTGCAGCAGACGGACCC
16       G  G  T  F  Q  P  Y  L  D  T  L  R  Q  E  L  Q  Q  T  D  P

121     AACGCTGTTGTCAGTAGTGGTGGCGGTTCTTGCGGTGCTGCTGACGCTAGTCTTCTGGAA
36       T  L  L  S  V  V  V  A  V  L  A  V  L  L  T  L  V  F  W  K

181     GTTAATCCGGAGCAGAAGGAGCAGTCAGAGAGCTGTTCTTCTTGTTGGCCTTTGTGATTC
56       L  I  R  S  R  R  S  S  Q  R  A  V  L  L  V  G  L  C  D  S

241     CGGGAAAACGTTGCTCTTTGTCAGGTTGTTAACAGGCCTTTATAGAGACACTCAGACGTC
76       G  K  T  L  L  F  V  R  L  L  T  G  L  Y  R  D  T  Q  T  S

301     CATTACTGACAGCTGTGCTGTATACAGAGTCAACAATAACAGGGGCAATAGTCTGACCTT
96       I  T  D  S  C  A  V  Y  R  V  N  N  N  R  G  N  S  L  T  L

361     GATTGACCTTCCCGGCCATGAGAGTTTGAGGCTTCAGTTCTTAGAGCGGTTTAAGTCTTC
116      I  D  L  P  G  H  E  S  L  R  L  Q  F  L  E  R  F  K  S  S

421     AGCCGGGGCTATTGTGTTTGTTGTGGATAGTGCAGCATTCCAGCGAGAGGTGAAAGATGT
136      A  G  A  I  V  F  V  V  D  S  A  A  F  Q  R  E  V  K  D  V

481     GGCTGAGTTTCTGTATCAAGTCCTCATTGACAGTATGGGTCTGAAGAATACACCATCATT
156      A  E  F  L  Y  Q  V  L  I  D  S  M  G  L  K  N  T  P  S  F

541     CTTAATAGCCTGCAATAAGCAAGATATTGCAATGGCAAAATCAGCAAAGTTAATTCAACA
176      L  I  A  C  N  K  Q  D  I  A  M  A  K  S  A  K  L  I  Q  Q

601     GCAGCTGGAGAAAGAACTCAACACCTTACGAGTTACCCGTTCTGCTGCCCCCAGCACACT
196      Q  L  E  K  E  L  N  T  L  R  V  T  R  S  A  A  P  S  T  L

661     GTACAGTTCCAGCACTGCCCCTGCTCAGCTGGGGAAGAAAGGCAAAGAGTTTGAATTCTC
216      Y  S  S  S  T  A  P  A  Q  L  G  K  K  G  K  E  F  E  F  S

721     ACAGTTGCCCCTCAAAGTGGAGTTCCTGGAGTGCAGTGCCAAGGGTGGAAGAGGGGACGT
236      Q  L  P  L  K  V  E  F  L  E  C  S  A  K  G  G  R  G  D  V

781     GGGCTCTGCTGACATCCAGGACTTGGAGAAATGGCTGGCTAAAATTGCCTGAGAGGCAGC
256      G  S  A  D  I  Q  D  L  E  K  W  L  A  K  I  A  *

841     TCTAAAGCACAAGACCTGGATGTGTGACACACAGTTTTGGAAAAAGGTCTGTGGTAGTCT

901     GGAGTTGATGAGGAAGGGGTACAAGATGTGGTTAGAAACATTTCTTTGTTCTGGAAACAA

961     AGTACTGTTGAAACCAGCTTGGAAnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnAAGTTCAGTTCTCCCT
```

1021 TATGGCTGCCTTTCAAACAA**GTACCTTTTATCTGATGCCTGTATCTTCCCTTTGTTAAGG**

1081 **TGTAACTTGATGTAGGGTCAAGGTTTTTGTGACAACAGGCAGACTCCACACAGAGAGGAT**

1141 **ATGATGAGAATATGGCCATCACCTGAAAAGTTTTCTTATCTTCTGTGCTTTTGGTCCCTG**

1201 **GAAACAAATCCGCCTATGTATGAAGCTAGTTGATTTCCAGTTGCA**<u>**CTATTTCCAGTTGCC**</u>

1261 <u>**TCTGAAGTTCACA**</u>**GGCAATACATTGTCTAGTCCTTTGCGAATTTCTCTGATTTGTGGGCA**

1321 **CAGTTATGAAGTTTCCCCACATGTGAAGACAGGTAC**AAAATAGCAGAGCCAAGCAGACAG

1381 TGGGTCTATTCTTCATTAGCTCAGTGACTTGTCCACACTCGTCTTAGCACTTACGTTTCA

1441 AAAGCTTGTCACAAACCCTTGGAGTCATTCCCAGATAATAGAACTGGAAATGATAAATCC

1501 CCTAATGCCAAGGGTCTAGTGTGTTCTTAGTGGTTATACTGGGAAGTGTGTGGAGATTTA

1561 GGTGCTGCTCTGCTGCTCTGGATGGCTGAAGG<u>CTCCTGGGCCATCTTCATGTGCTGCTTG</u>

1621 AAGAGCTCCTATTTTGTACTCCTGGCTAGAATGCTGTGGAACAAATACAAAGTGAAAAAA

1681 GTTCTCTGTAGATTTCTGAAGTGCATATTCATTGATGCCAAGnnnnnnnnnnnGTTGCCT

1741 TTTTG

**Abb.23:**

**Darstellung der vollständigen cDNA- und Aminosäuresequenz der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors/des APMCF1-Proteins.**

**Das Start-Kodon umfasst die Nukleotide 17-19, der offene Leserahmen reicht bis zu dem Nukleotid 832. Das translatierte Produkt besteht aus 271 Aminosäuren. Die Region, welcher das subtrahierte cDNA-Fragment entstammt, ist fett gedruckt und befindet sich im 3'-untranslatierten Bereich des Gens. Aufgrund ihrer Antisense-Orientierung im sequenzierten Plasmid ist die Sequenz des subtrahierten cDNA-Fragments in dieser Abbildung nicht direkt, sondern in Sense-Orientierung dargestellt. Die Primer-bindungsstellen für die spezifischen Primer sind unterstrichen.**

### 3.3.8 Untersuchungen zum Zelltod mittels Durchflusszytometrie

Nach der Validierung der differenziellen Expression von SRβ wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen Apoptose und der Hochregulation von SRβ besteht.

KS-Zellen wurden mit MTX in einer Konzentration von 3µg/ml zwischen 1 und 24 Stunden inkubiert; nachfolgend wurde die Expression von Phosphatidylserin durch Annexin-V-Färbung durchflusszytometrisch untersucht.

Als Positivkontrolle für Apoptose wurde Staurosporin verwandt, ein anerkannter Apoptose-Induktor. Es wurden jeweils 10 000 bis 20 000 Ereignisse untersucht. Dieses Experiment wurde zweimal durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte in Form eines Dot-Blots mit Hilfe eines angeschlossenen MACs unter Verwendung der entprechenden Software.

Exemplarisch ist in Abbildung 23 die Messung nach 8-stündiger Inkubation mit MTX aufgeführt. Das Messergebnis ist in Form eines Dot-Blots dargestellt, wobei die Ordinate die Propidiumiodid-Fluoreszenz und die Abszisse die Annexin-V-Fluos-Fluoreszenz repräsentieren. Folglich repräsentiert der linke untere Quadrant lebende Zellen, der rechte untere Annexin-positive, apoptotische Zellen, der rechte obere Annexin- und Propidiumiodid-positive, nekrotische Zellen und der linke obere Propidiumiodid-positive Zellen. In die Auswertung miteinbezogen wurden alle Annexin-positiven Zellen; der prozentuale Anteil der Annexin-positiven Zellen wurde rechnerisch mit Hilfe des angeschlossenen MACs bestimmt.

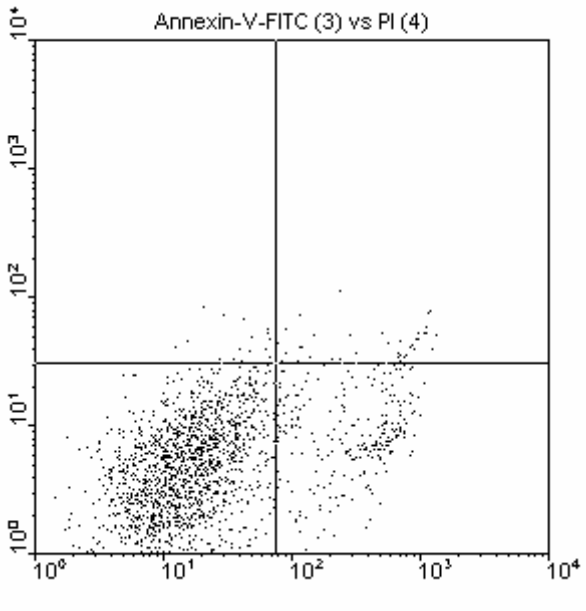


**Abb. 24:**

**Beispiel einer FACS-Analyse. Darstellung des Messergebnisses als Dot-Blot.**

**Der Anteil Annexin-positiver KS-Zellen wurde nach 8-stündiger MTX Inkubation (Konzentration: 3µg/ml) bestimmt.**

**Ordinate: Propidiumiodid-Fluoreszenz, Abszisse: Annexin-V-Fluos-Fluoreszenz.**

**Der linke untere Quadrant repräsentiert lebende Zellen, der rechte untere Annexin-positive, apoptotische Zellen, der rechte obere Annexin- und Propidiumiodid-positive, nekrotische Zellen und der linke obere Propidiumiodid-positive, nekrotische Zellen. In die Auswertung miteinbezogen wurden alle Annexin-positiven Zellen; der prozentuale Anteil der Annexin-postiven Zellen wurde rechnerisch mit Hilfe eines angeschlossenen MACs bestimmt.**

Abbildung 25 veranschaulicht den durchschnittlichen prozentualen Anteil Annexin-positiver KS-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer; in die Auswertung mit einbezogen wurden sowohl Propidiumiodid-positive als auch Propidiumiodid-negative Zellen. Die Auswertung der Annexin-positiven KS-Zellen erfolgte nach 1, 4, 8, 12, 16 und 24 Stunden. Als Positivkontrolle für Apoptose wurden Jurkat-Zellen 12 Stunden mit 1mmolarer Staurosporin-Lösung behandelt, hierbei zeigten sich nach Behandlung mit Staurosporin 95,8% Annexin-positive Zellen. Der Anteil Annexin-positiver KS-Zellen nach

Inkubation mit MTX schwankte zwischen 1,4% und 7,8% und damit um den Anteil unbehandelter Zellen, der bei 5,2% lag. Wie anhand des jeweils geringen Standardfehlers ersichtlich unterschieden sich die Ergebnisse in beiden Untersuchungen nur unwesentlich.

In KS-Zellen lässt sich somit durch Inkubation mit MTX in einer Konzentration von 3µg/ml – der Konzentration, welche zu einer Überexpression der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors führt – in keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikant Apoptose auslösen.

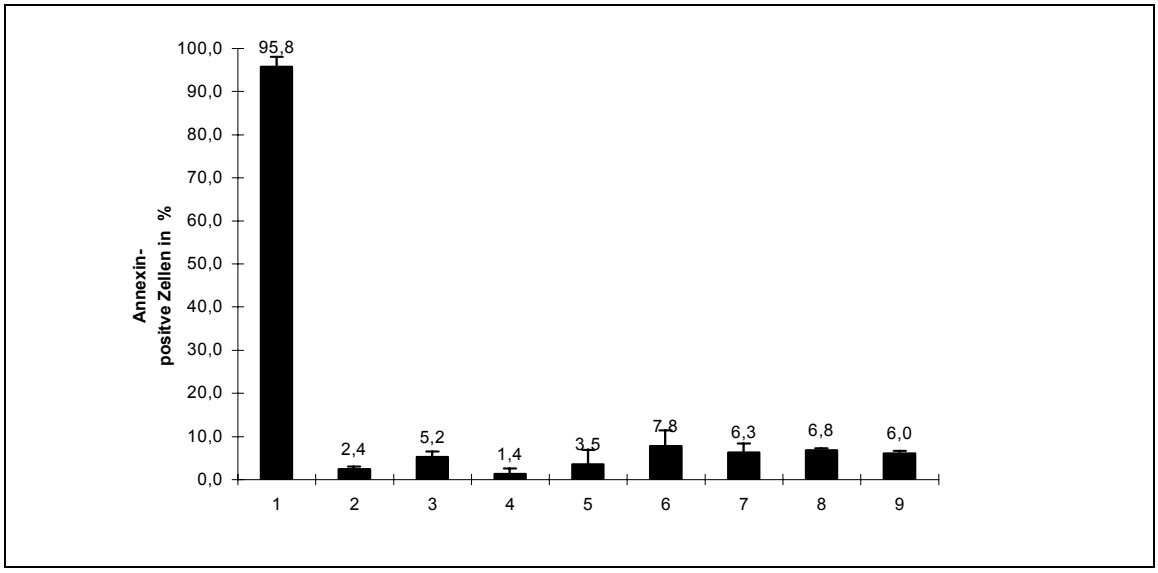


**Abb. 25:**

**Prozentualer Anteil Annexin-positiver KS-Zellen nach zytostatischer Behandlung mit MTX in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Graphische Auswertung zweier Facs-Analysen.**

**Die Auswertung umfasst sowohl Propidiumiodid-negative als auch Propidiumiodid-positive Zellen. Ordinate: prozentualer Anteil Annexin-positiver KS-Zellen. Als Positivkontrolle für Apoptose wurden Jurkat-Zellen über 12 Stunden mit 1mmolarer Staurosporin-Lösung behandelt.**

1: J16-Zellen, Staurosporin-behandelt

2: J16-Zellen unbehandelt

3: KS-Zellen, unbehandelt

4: KS-Zellen, 1 Stunde MTX-Inkubation

5: KS-Zellen, 4 Stunden MTX-Inkubation

6: KS-Zellen, 8 Stunden MTX-Inkubation

7: KS-Zellen, 12 Stunden MTX-Inkubation

8: KS-Zellen, 16 Stunden MTX-Inkubation

9: KS-Zellen, 24 Stunden MTX-Inkubation

# 4 Diskussion

Die Analyse differenziell exprimierter Gene hat sich zu einem wertvollen Werkzeug entwickelt, um die Wirkungsweise von Zytostatika zu untersuchen. In den letzten Jahren wurden verschiedene Techniken entwickelt, die es erlauben, die differenzielle Expression einer großen Anzahl von Genen zu untersuchen.
In der vorliegenden Arbeit wurden die Differential-Display-PCR und der PCR-Select™ Subtraction Kit eingesetzt, um in Brustkrebszellen Gene zu identifizieren, deren Expression durch Zytostatika beeinflusst wird. Da Zytostatika in der Therapie maligner Tumoren eine bedeutende Rolle spielen, erhofft man sich, durch diese Erkenntnisse Einblick in die Wirkungsweise dieser Substanzen zu gewinnen, um neue therapeutische Strategien zu entwickeln und Resistenzen umgehen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Effekte von 5'-FU und MTX auf die Genexpression in Brustkrebszellen untersucht.
Die Konzentrationen der eingesetzten Zytostatika orientierten sich dabei an den bereits im Vorfeld durchgeführten Chemosensitivitäts-Assays (Meyer 2000, Marmé unveröffentlichte Daten). Alle Untersuchungen zur differenziellen Genexpression wurden nach 8stündiger Inkubationsdauer durchgeführt. Damit war die Inkubationsdauer so gewählt, dass von einer möglichst großen Differenz im Expressionsmuster bei gleichzeitig geringer Resistenzentwicklung auszugehen war. Die Wahl der Inkubationszeit beruht u. a. auf den von Wang et al. vorgelegten Ergebnissen, nach denen es in MCF7-Zellen nach 8-stündiger Inkubation mit Zytostatika wie Vinblastin zur maximalen Aktivierung der sogenannten c-Jun N-terminalen Kinasen/stress-activated Protein-Kinasen kommt (Wang et al. 1998). Es ist zu erwarten, dass diese Transkriptionsfaktoren einen Großteil der relevanten Gene regulieren.
Durch die Beschränkung auf eine einzige Inkubationsdauer kann jedoch kein Anspruch auf eine vollständige Detektion aller Effekte eines Zytostatikums erhoben werden.

### *4.1 Auswirkungen von 5'-FU auf MCF7-Zellen*

Bei der Inkubation von MCF7-Zellen mit 5'-FU gelang mit Hilfe der Differential-Display-PCR die Detektion einer vermeintlich differenziell exprimierten mRNA. In der Realtime-PCR bestätigte sich die differenzielle Expression des entsprechenden Gens jedoch nicht, so dass die Differenz im Bandenmuster als falsch positiv zu werten ist.
Weitere Differenzen im Bandenmuster wurden nicht detektiert.

Dass nach Inkubation mit 5'-FU kein Nachweis einer differenziellen Expression gelang, kann verschiedene Gründe haben:
Eine mögliche Erklärung ist, dass die Wirkung von 5'-FU in MCF7-Zellen nur über eine Inhibition der Thymidylat-Synthetase bzw. über einen Einbau als falscher Metabolit in DNA und RNA vermittelt wird, ohne dass das Expressionsmuster beeinflusst wird. Gegen diese Annahme spricht, dass 5'-FU in anderen Malignom-Zellen Veränderungen im Expressionsmuster verschiedener Gene bewirken und somit Apoptose induzieren kann. So ließ sich beispielsweise nach Behandlung mit 5'-FU in humanen Kolonkarzinom-Zelllinien eine Überexpression von p53 samt nachgeschalteter Gene wie p21/WAF1 und mdm2 beobachten (Zhang et al. 2003) ebenso wie die Überexpression des Fas-Rezeptors in Zellen von Lebermetastasen (Backus et al. 2001).
Weiterhin besteht die Möglichkeit einer primären Resistenz der MCF7-Zellen. Dies ist jedoch aufgrund der in unserem Labor durchgeführten Voruntersuchungen zur Sensibilität auszuschließen (Marmé unveröffentlichte Daten).
Nicht ausgeschlossen jedoch ist die Möglichkeit einer sekundären Resistenz. Eine Resistenz gegenüber 5'-Fluorouracil ist ein bekanntes Phänomen (Mader et al. 1998); die Resistenzentwicklung ist dabei als multifaktorielles Ereignis zu verstehen. Mechanismen wie ungenügender Transport des Zytostatikums in den Tumor, vermehrte Expression der Thymidilat-Synthetase, Verlust der p53-Funktion (Longley et al. 2003, Longley et al. 2004), eine verminderte

Expression der Uriditin-Cytidin-Monophosphat Kinase (Banerjee et al. 2002) oder eine vermehrte Expression des Multidrug-Resistance-assoziierten Proteins (Jin et al. 2002) wurden in diesem Zusammenhang beschrieben. Gegen eine sekundäre Resistenz spricht, dass sich ebenso wenig Alterationen in der Expression von Resistenzgenen wie Alterationen in der Expression von Apoptosegenen hatten nachweisen lassen und dass die Inkubationszeit mit 8 Stunden relativ kurz für eine Resistenzentwicklung bemessen war und dass sich in Voruntersuchungen durchflusszytometrisch immerhin 10 bis 20% apoptotischer Zellen hatten nachweisen lassen (Ergebnis nicht dargestellt).
Es liegt somit der Verdacht nahe, dass mit den im Rahmen dieser Dissertationsarbeit eingesetzten Primerkombinationen die entsprechenden, differenziell exprimierten Gene in der Differential-Display-PCR nicht erfasst worden sind. Insgesamt zeigte sich die Differential-Display-PCR als ungeeignete Methode im Sinne der Fragestellung dieser Dissertationsschrift. Die Differential-Display-PCR ist bekanntermaßen mit einer hohen Anzahl von falsch positiven Ergebnissen behaftet; eine Abbildung der zahlreich erwarteten Expressionsunterschiede war mit dem gewählten Ansatz nicht möglich.
Daher wurden die weiteren Versuche mit der Subtraktiven Hybridisierung als alternativer Methode durchgeführt.

### *4.2 Auswirkungen von MTX auf KS-Zellen*

Mit Hilfe des PCR-Select™ Subtraction Kits ließ sich in KS-Zellen ein Gen identifizieren, das einer Hochregulation durch MTX unterlag. Die differenzielle Expression wurde durch verschiedene PCR-Experimente bestätigt.
Bei diesem Gen handelt es sich um das APMCF1-Gen, welches die β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors kodiert. Es ist gelungen, die vollständige mRNA-Sequenz aus menschlichen Zellen zu isolieren (Yan et al. 2003). Es handelt sich dabei um eine 1745bp lange mRNA, wobei sich die codierende Sequenz über 816bp erstreckt.
APMCF1 wird auf Chromosom 3q22.1 codiert, die zu Grunde liegende genomische DNA erstreckt sich über eine Größe von über 14,8kb und

beinhaltet 7 Exons und 6 Introns. Das 29,7kDa schwere Genprodukt besteht aus 271 Aminosäuren und beinhaltet eine kleine GTP-bindende Protein-Domäne. Außerdem wird eine transmembrane Helix zwischen den Aminosäuren 37 bis 54 vermutet.

Die β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors wird der Überfamilie der Ras-GTPasen zugerechnet. Sie lässt sich jedoch keiner Familie eindeutig zuordnen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, scheint die größte Verwandtschaft jedoch zu den Ras- und Arf/Sar-GTPasen zu bestehen. Besonders erstgenannter Familie kommt nachgewiesenermaßen eine Schlüsselfunktion in der Kontrolle von Apoptose und Zellwachstum zu.

### 4.2.1 Funktion des Signalerkennungspartikelrezeptors mit besonderem Hinblick auf die β-Untereinheit.

Die isolierte Funktion der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors ist bislang nur unvollkommen verstanden.

Bei der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors handelt es sich um ein während der Evolution gut konserviertes Motiv – eine Tatsache, die auf eine große Bedeutung des Gens schließen lässt.

Allerdings scheint diese Funktion speziell für eukaryotische Zellen von Bedeutung zu sein, da sich in prokaryotischen Zellen bislang kein entsprechendes Äquivalent der β-Untereinheit des Signalerkennungs-partikelrezeptors hat nachweisen lassen (Angelini et al. 2005).

Diese Beobachtung erklärt sich möglicherweise dadurch, dass die eukaryotische Zelle sich im Gegensatz zur prokaryotischen Zelle aus mehreren Kompartimenten zusammensetzt (Millman et al. 2001). Während in der prokaryotischen Zelle nur eine Zielmembran vorhanden ist, mit der FtsY, das E. coli Homolog der eukaryotischen α-Untereinheit des Signalerkennungs-partikelrezeptors, interagieren kann, existieren in eukaryotischen Zellen mehrere Kompartimente, welche aus nicht miteinander verbundenen Membranen gebildet werden. Gäbe es in eukaryotischen Zellen keine β-

Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors, so wäre vermutlich eine Interaktion zwischen der α-Untereinheit und jeder beliebigen Membran der verschiedenen Kompartimente möglich. Damit wäre ein spezifisches Targeting, also die zielsichere Verteilung und Einschleusung der Aminosäureketten an den Ort ihrer Bestimmung, verhindert.

Das isolierte Vorkommen der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors in Eukaryoten scheint sich somit durch die Notwendigkeit eines spezifischen Targetings aufgrund der Morphologie der eukaryotischen Zelle erklären lassen.

### 4.2.2 Die Rolle der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors für die Regulation des Zelltods

Ein Zusammenhang zwischen Zytostatika und der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors wurde bislang noch nicht beschrieben, wohl aber die Koinzidenz von Apoptose und einer vermehrten Expression der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors: So konnten Yan et al. erstmalig die vermehrte Expression der β-Untereinheit in apoptotischen MCF7 Zellen nachweisen (Yan et al. 2001); ein Hinweis auf eine mögliche Rolle der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors in der Regulation des Zelltodes.

Nachdem im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Überexpression der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors nachgewiesen wurde, war es naheliegend, den Anteil apoptotischer Zellen in KS-Zellen nach zytostatischer Behandlung mit MTX zu bestimmen. Nach Färbung mit Annexin wurde eine FACS-Analyse durchgeführt, um eine aufgrund der von Yan et al. gewonnenen Erkenntnisse zu erwartende positive Korrelation zwischen Apoptose und der vermehrten Expression der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors nachzuweisen.

Unter den gleichen Bedingungen, die zu einer vermehrten Expression der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors geführt hatten, zeigte sich

jedoch keine signifikante Zunahme des Anteils apoptotischer oder nekrotischer Zellen. Auch durch Variationen der Inkubationsdauer ließen sich diesbezüglich keine Unterschiede erzeugen, so dass eine durch Translations-Vorgänge oder Signalkaskaden bedingte Verzögerung der Phosphatidylserin-Expression als Erklärung für die fehlende Induktion des programmierten Zelltodes ebenfalls ausscheidet.

Ein direkter Zusammenhang zwischen der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors und dem kontrolliertem Zelltod ließ sich somit nicht nachweisen.

Eine Möglichkeit, diese Beobachtung zu erklären, besteht darin, dass die initial erwartete pro-apoptotische Funktion der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors von weiteren Co-Faktoren abhängig ist, ohne deren Mitwirken SRβ keine apoptotische Potenz besitzt. Über die synergistischen Effekte weiterer Zytostatika hierfür kann nur spekuliert werden.

Wahrscheinlicher jedoch erscheint, dass der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors eine gewisse anti-apoptotische Funktion, wie die der Tumorpromotion, zukommt; eine These, welche durch eine 2003 veröffentlichte Arbeit von Yan et al. untermauert wird: Die Autoren beschreiben darin ein signifikant höheres Expressions-Niveau von APMCF1 in wenig sowie mäßig differenzierten Kolonkarzinom-Zellen verglichen mit dem Expressions-Niveau normaler Darmmukosazellen. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür ist, dass durch die vermehrte Bildung der SRβ in malignen Zellen ein schnelleres Targeting ermöglicht wird und so der erhöhte Bedarf an sekretorischen Proteinen, wie er für das schnelle (und unkontrollierte) Wachstum dieser Zellen typisch ist, gedeckt wird. Die These, dass die Überexpression der SRβ mit einem schnelleren Zellwachstum einhergeht, wird durch den Umkehrschluss der von Ogg et al. veröffentlichten Daten gestützt: Die Autoren beschreiben darin, dass in S. cerevisiae eine Null-Mutante der SRβ langsamer wächst als der entsprechende Wildtyp (Ogg et al. 1998). Folglich liegt die Vermutung nahe, dass eine vermehrte Expression SRβ Ausdruck eines schnelleren Zellwachstums ist.

Für die Beobachtungen dieser Dissertationsschrift lässt sich schlussfolgern, dass die Überexpression von SRβ möglicherweise eine Bedeutung für die Resistenzentwicklung gegenüber MTX hat.

Wie bereits aufgeführt, gehört die β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors als kleines G-Protein zur Überfamilie der Ras-GTPasen.

Kommt es nun bei kleinen G-Proteinen, beispielsweise durch Punktmutation oder vermehrte Bildung, zu einer unkontrollierbaren Aktivierung dieser multifunktionellen Proteine und damit zu einer unkontrollierbaren Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden, so resultieren daraus unkontrolliertes Zellwachstum, Gefäßneubildungen, genetische Instabilität und Verhinderung von Apoptose; es kommt somit zu einer malignen Transformation der Zelle (Yan et al. 2003). Dieses onkogene Potenzial wurde für verschiedene GTPasen vielfach beschrieben, umgekehrt lassen sich in 30% aller menschlichen malignen Tumoren Mutationen von Ras nachweisen (Chong et al. 2003). Neben Ras-GTPasen scheint auch GTPasen der Arf-Unterfamilie, zu welchen die SRβ ebenso nahe verwandt zu sein scheint wie zu Ras-GTPasen, eine gewisse Bedeutung in der Tumorgenese zuzukommen. So ließ sich in Kolonkarzinom-Zellen ein erhöhter Spiegel der Arf-abhängigen Phospholipase D nachweisen (Yoshida et al. 1998).

In der humanen Osteosarkom-Zelllinie Saos-2 konnte unter anderem nachgewiesen werden, dass es durch eine zytostatische Behandlung, auch mit MTX, zu einer vermehrten Expression eines kleinen G-Proteins der Ras-Überfamlie (RhoA) kommt (Fellenberg et al. 2003). Diese Überexpression von RhoA ging mit einer deutlichen Reduktion der Chemosensitivität einher, was RhoA eine zytoprotektive, anti-apoptotische Funktion in der Regulation der Zytostatika induzierten Apoptose zuschreibt.

Durch eine experimentell erzeugte Überexpression von Ha-Ras war eine gesteigerte Resistenz gegenüber MTX in NIH-3T3-Zellen beobachtet worden (Wani et al. 1994).

Eine ähnliche Rolle scheint der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors in der Regulation des Zelltodes zuzukommen; die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit, die Zugehörigkeit zur Familie der G-

Proteine sowie die vermehrte Expression des Gens in malignen Kolonkarzinom-Zellen sprechen dafür.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete Überexpression der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors stellt möglicherweise eine Antwort der Zelle auf einen Zellschaden dar, wodurch eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird, deren Zweck es einzig und alleine ist, den programmierten Zelltod zu verhindern und das Überleben der Zelle zu gewährleisten. Damit wäre die Hochregulation der SRβ als ein Schritt in Richtung Resistenz-entwicklung zu verstehen. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, ob die Hochregulation der SRβ Auswirkungen auf die bereits für MTX beschriebenen Resistenzmechanismen wie Defekte im Folsäure-Carrier, Überexpression der Dihydrofolsäurereduktase und fehlerhafte Polyglutamation (Takemura et al. 2001) besitzt oder ob eine bis dato zumindest für MTX noch nicht beschriebene Signalkaskade initiiert wird.

Neben einer zentralen Rolle der SRβ in der Regulation von Zellwachstum und Zelltod ist eine andere denkbare Erklärungsmöglichkeit für die im Rahmen dieser Dissertation gefundenen Ergebnisse, dass es sich bei der Hochregulation der SRβ um eine kompensatorische Neubildung handelt, welche aufgrund eines Verbrauchs oder einer direkten Inaktivierung der SRβ erforderlich ist. Im Jahre 2003 wurde für MTX eine solche Inaktivierung von Ras beschrieben (Winter-Vann et al. 2003). Eine durch MTX bedingte Inhibition der Isoprenylcystein-Carboxyl-Metyhltransferase führte zu einer Hypomethylierung von Ras. Diese Hypomethylierung führte zu einer Fehllokalisation von Ras ins Zytosol, wodurch es zu einer Funktionsminderung des G-Proteins bezüglich der Aktivierung nachgeschalteter Signal-Prozesse wie der Aktivierung der p44 MAP-Kinase kam.

Es ist möglich, dass ein vergleichbarer Mechanismus zu einer direkten Inaktivierung der SRβ geführt und eine kompensatorische Neubildung der SRβ initiiert hat:

Nimmt man an, dass die β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors ebenfalls posttranslationellen Modifikationen unterliegt, dann würde in Analogie zu den von Winter-Vann et al. veröffentlichten Daten durch MTX die

Modifikation der SRβ verhindert und die SRβ somit teilweise inaktiviert werden. Der (relative) Mangel einer voll funktionsfähigen β-Untereinheit würde dann von der Zelle durch eine vermehrte Neubildung – resultierend in einer vermehrten Expression – beantwortet werden. Diese Daten bedürfen jedoch weiterer Untersuchungen, zumal eine posttranslationelle Modifikation für die SRβ bislang noch nicht beschrieben wurde.
Welche exakte Rolle der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors in der Regulation von Zellwachstum, maligner Transformation und Apoptose zukommt, muss anhand weiterer Untersuchungen geklärt werden.

## Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen vermuten, dass die vermehrte Expression der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors eine Antwort der Zelle auf eine durch MTX verursachte Zellschädigung darstellt.
Somit wäre es möglich, dass es sich hierbei um einen Reparaturmechanismus in Form einer kompensatorisch gesteigerten Neubildung der SRβ z. B. aufgrund einer relativen Inaktivierung der SRβ durch MTX handelt. In diesem Falle wäre es denkbar, dass durch eine Inhibition von SRβ die Zytotoxizität von MTX verstärkt wird bzw. eine eventuelle Resistenzentwicklung überwunden wird. Dabei ist es unklar, ob dieser Mechanismus ein für MTX typisches Phänomen darstellt oder ob andere Zytostatika ähnliche Effekte aufweisen.
Ob der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors, wie für viele andere GTPasen typisch, eine zentrale Rolle in der Regulation von Zelltod und Tumorgenese zukommt (und wenn ja, welche bzw. über welche Signalkaskaden vermittelt) bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

# 5 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist nach wie vor der häufigste maligne Tumor bei Frauen. In der Behandlung hat sich das CMF-Schema im Rahmen der adjuvanten Chemotherapie etabliert. Die Zytostatika Cyclophosphamid, Methotrexat und 5'-Fluorouracil werden im Rahmen dieses Schemas eingesetzt. Die Kombination der verschiedenen Substanzen erfolgte bislang nach empirischen Gesichtspunkten; die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen sind noch weitgehend unbekannt. Es wird vermutet, dass 5'-Fluorouracil und Methotrexat neben ihrer Funktion als Antimetabolite ihre Wirkungen zusätzlich durch Veränderungen der Genexpression vermitteln.
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten sensible Mammakarzinom-Zellen auf mögliche, durch Methotrexat bzw. 5'-Fluorouracil induzierte Veränderungen der Genexpression untersucht werden.

Mit der Methode der Differential-Display-PCR ließ sich in den sensiblen MCF7-Zellen nach Behandlung mit 5'-Fluorouracil in wirksamer Dosierung keine Alteration im Expressionsmuster detektieren.
Dies könnte – schließt man die Entwicklung von Resistenzen aus – ein Hinweis darauf sein, dass die Wirkung von 5'-Fluorouracil in MCF7-Zellen nur über eine Inhibition der Thymidylat-Synthetase bzw. über einen Einbau als falscher Metabolit in DNA und RNA vermittelt wird, ohne dass das Expressionsmuster beeinflusst wird. Wahrscheinlicher jedoch erscheint, dass mit den im Rahmen dieser Dissertationsarbeit eingesetzten Primerkombinationen die entsprechenden, differenziell exprimierten Gene in der Differential-Display-PCR nicht erfasst worden sind.

Mit Hilfe der Subtraktiven Hybridisierung konnte in MTX-sensiblen KS-Zellen ein Gen identifiziert werden, welches der Hochregulation durch Methotrexat unterliegt. Bei diesem Gen handelt es sich um die β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors, ein Mitglied der Überfamilie der kleinen G-Proteine.

Über die Funktion der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors ist bislang nur wenig bekannt; es wird ihr eine Bedeutung für das spezifische Proteintargeting zum Endoplasmatischen Retikulum zugeschrieben.

Weiterführende Experimente in Form von Annexin-Färbung und nachfolgender Analyse mittels Durchflusszytometrie erbrachten keinen Zusammenhang zwischen der Hochregulation der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors durch Methotrexat und der Induktion von Apoptose oder Nekrose.

Dies könnte sich dadurch erklären, dass es sich bei der Überexpression der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors um einen Reparaturmechanismus der Zelle auf einen durch Methotrexat gesetzten Schaden handelt. Möglicherweise wird die β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors durch Methotrexat auf eine noch unbekannte Weise inaktiviert, weshalb es danach kompensatorisch zu einer gesteigerten Neubildung kommt.

Eventuell kommt der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors sogar eine zentrale Bedeutung in der Entwicklung von Resistenzen zu. Folglich ist denkbar, dass durch eine direkte Inhibition der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors die Zytotoxizität von Methotrexat verstärkt bzw. eine eventuelle Resistenzentwicklung überwunden werden kann.

Ob der β-Untereinheit des Signalerkennungspartikelrezeptors, wie für viele andere GTPasen typisch, darüber hinaus sogar eine zentrale Rolle in der Regulation von Zelltod und Tumorgenese zukommt, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

# 6 Literaturverzeichnis


Angelini S, Deitermann S, Koch HG (2005)
FtsY, the bacterial signal-recognition particle receptor, interacts functionally and physically with the SecYEG Translokon.
EMBO Rep 6: 476-481

Backus HHJ, Dukers DF, van Groeningen CJ, Vos W, Bloemena E, Wouters D, van Riel JMGH, Smid K, Giaccone G, Pinedo HM, Peters GJ (2001)
5-Fluorouracil induced Fas upregulation associated with apoptosis in liver metastases of colorectal cancer patients.
Ann Oncol 12: 209-216

Banerjee D, Mayer-Kuckuk P, Capiaux G, Budak-Alpdogan T, Gorlick R, Bertino JR (2002)
Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase.
Biochim Biophys Acta 1587: 164-173

Braun S, Kiechle M, Harbeck N (2002)
Breast cancer - Biological principles, classification and prognostic factors.
Internist 43: 329-330, 333-339

Chong H, Vikis HG, Guan KL (2003)
Mechanisms of regulating the Raf kinase family.
Cell Signal 15: 463-469

Couch FJ, DeShano ML, Blackwood MA, Calzone K, Stopfer J, Campeau L, Ganguly A, Rebbeck T, Weber BL, Jablon L, Cobleigh MA, Hoskins K, Garber JE (1997)
BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer.
N Engl J Med 336: 1409-1415

Diatchenko L, Lau YFC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD (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

Eichhorst ST, Muerkoster S, Weigand MA, Krammer PH (2001)
The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil induces apoptosis in mouse thymocytes in vivo via activation of the CD95(APO-1/Fas) system.
Cancer Res 61: 243-248

Fellenberg J, Dechant MJ, Ewerbeck V, Mau H (2003)
Identification of drug-regulated genes in osteosarcoma cells.
Int J Cancer 105: 636-643

Fornari FA, Jarvis WD, Grant S, Orr MS, Randolph JK, White FKH, Gewirtz DA (1996)
Growth arrest and non-apoptotic cell death associated with the suppression of c-myc expression in MCF-7 breast tumor cells following acute exposure to doxorubicin.
Biochem Pharmacol 51: 931-940

Fulga TA, Sinning I, Dobberstein B, Pool MR (2001)
SRbeta coordinates signal sequence release from SRP with ribosome binding to the Translokon.
EMBO J. 20: 2338-2347

Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ (2001)
Meeting highlights: International consensus panel on the treatment of primary breast cancer.
J Clin Oncol 19: 3817-3827

Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ (2003)
Meeting highlights: Updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer.
J Clin Oncol 21: 3357-3365

Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ, Penel Members (2005)
Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005.
Ann Oncol 16:1569-1583

Harbeck N, Kruger A, Sinz S, Kates RE, Thomssen C, Schmitt M, Janicke F (2001)
Clinical relevance of the plasminogen activator inhibitor type 1 - a multifaceted proteolytic factor.
Onkologie 24: 238-244

Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M (2004)
Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and ist inhibitor PAI-I: Two novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer.
Thromb Haemost 91: 450-456

Heinemann V, Hiddemann W (2002)
Current treatment strategies for breast cancer.
Internist 43: 327-328

Hwang PM, Bunz F, Yu J, Rago C, Chan TA, Murphy MP, Kelso GF, Smith RAJ, Kinzler KW, Vogelstein B (2001)
Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells.
Nat Med 7: 1111-1117

Jiang S, Song MJ, Shin EC, Lee MO, Kom SJ Parl JH (1999)
Apoptosis in human hepatoma cell lines by chemotherapeutic drugs via Fas-dependent and Fas-independent pathways
Hepatology 29: 101-110

Jin J, Huang M, Wei HL, Liu GT (2002)
Mechanism of 5-fluorouracil required resistance in human hepatocellular carcinoma cell line Bel(7402).
World J Gastroenterol. 8: 1029-1034

Keenan RJ, Freymann DM, Stroud RM, Walter P (2001)
The signal recognition particle.
Annu Rev Biochem 70: 755-775

Krainer M, SilvaArrieta S, FitzGerald MG, Shimada A, Ishioka C, Kanamaru R, MacDonald DJ, Unsal H, Finkelstein DM, Bowcock A, Isselbacher KJ, Haber DA (1997)
Differential contributions of BRCA1 and BRCA2 to early-onset breast cancer.
N Engl J Med 336: 1416-1421

Legate KR, Falcone D, Andrews DW (2000)
Nucleotide-dependent binding of the GTPase domain of the signal recognition particle receptor beta-subunit to the alpha-subunit.
J Biol Chem 275: 27439-27446

Legate KR, Andrews DW (2001)
Assembly strategies and GTPase regulation of the eukaryotic and Escherichia coli Translokons.
Biochem Cell Biol 79: 593-601

Legate KR, Andrews DW (2003)
The beta-subunit of the signal recognition particle receptor is a novel GTP-binding protein without intrinsic GTPase activity.
J Biol Chem 278: 27712-27720

Liang P, Bauer D, Averboukh L, Warthoe P, Rohrwild M, Muller H, Strauss M, Pardee AB (1995)
Analysis of Altered Gene-Expression by Differential Display.
Methods Enzymol 254:304-321

Liang P, Pardee AB (1998)
Differential display - A general protocol.
Mol Biotechnol 10: 261-267

Longley DB, Latif T, Boyer J, Allen WL, Maxwell PJ, Johnston PG (2003)
The interaction of thymidylate synthase expression with p53-regulated signaling pathways in tumor cells.
Semin Oncol 30: 3-9

Longley DB, Allen WL, McDermott U, Wilson TR, Latif T, Boyer J, Lynch M, Johnston PG (2004)
The roles of thymidylate synthase and p53 in regulating Fas-mediated apoptosis in response to antimetabolites.
Clin Cancer Res 10: 3562-3571

Mader RM, Muller M, Steger GG (1998)
Resistance to 5-fluorouracil.
Gen Pharmacol 31: 661-666

Magnet KJ, Orr MS, Cleveland JL, Rodriguez-Galindo C, Yang H, Yang CY, Di YM, Jain PT, Gewirtz DA (2001)
Suppression of c-myc expression and c-myc function in response to sustained DNA damage in MCF-7 breast tumor cells.
Biochem Pharmacol 62: 593-602

McPherson K, Steel CM, Dixon JM (2000)
ABC of breast disease: Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics.
BMJ 321: 624-628

Meyer A (2000)
Korrelation von Chemosensitivitätsprofilen mit der Expression von Apoptose-regulierenden Oberflächenmolekülen und potenziellen Resistenzfaktoren durch Mammakarzinom-Zelllinien
Med. Dissertation, Universität Tübingen

Miller JD, Tajima S, Lauffer L, Walter P (1995)
The beta subunit of the signal recognition particle receptor is a transmembrane GTPase that anchors the alpha subunit, a peripheral membrane GTPase, to the endoplasmic reticulum membrane.
J Cell Biol 128: 273-282

Millman JS, Qi HY, Vulcu F, Bernstein HD, Andrews DW (2001)
FtsY binds to the Escherichia coli inner membrane via interactions with phosphatidylethanolamine and membrane proteins.
J Biol Chem 276: 25982-25989

Ogg SC, Barz WP, Walter P (1998)
A functional GTPase domain, but not its transmembrane domain, is required for function of the SRP receptor beta-subunit.
J Cell Biol 142: 341-354

Paduch M, Jelen F, Otlewski J (2001)
Structure of small G proteins and their regulators.
Acta Biochim Pol 48: 829-850

Piccart MJ, de Valeriola D, Dal Lago D, de Azambuja E., Demonty G, Lebrun F, Bernard-Marty C, Colozza M, Cufer T (2005)
Adjuvant chemotherapy in 2005: Standards and beyond.
Breast 14: 439-445

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch R, Cameron D, Dowsett M, Barrios C, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Láng I, Nitz U, Iwata H, Thomssen H, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Süto T, Greatorex V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD (2005)
Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer.
N Engl J Med 353: 1659-1672

Prechtl A, Harbeck N, Thomssen C, Meisner C, Braun M, Untch M, Wieland M, Lisboa B, Cufer T, Graeff H, Selbmann K, Schmitt M, Janicke F (2000)
Tumor-biological factors uPA and PAI-1 as stratification criteria of a multicenter adjuvant chemotherapy trial in node-negative breast cancer.
Int J Biol Markers 15: 73-78

Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolkmark N (2005)
Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer.
N Engl J Med 353: 1673-1684

Sampath D, Rao VA, Plunkett W (2003)
Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs.
Oncogene 22: 9063-9074

Sasco AJ (2001)
Epidemiology of breast cancer: an environmental disease?
Apmis 109: 321-332

Schwartz T, Blobel G (2003)
Structural basis for the function of the beta subunit of the eukaryotic signal recognition particle receptor.
Cell 112: 793-803

Seeliger S, Niehues T, Harms E, Frosch M, Roth J (2002)
Methotrexat in der Behandlung der juvenilen idiopathischem Arthritis.
Monatschr Kinderheilkd 150: 452-459

Sprang SR (1997a)
G protein mechanisms: insights from structural analysis.
Annu Rev Biochem 66: 639-678

Sprang SR (1997b)
G proteins, effectors and GAPs: structure and mechanism.
Curr Opin Struct Biol 7: 849-856

Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA (1997)
The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews.
N Eng J Med 336: 1401-1408

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001)
Small GTP-binding proteins.
Physiol Rev 81: 153-208

Takemura Y, Kobayashi H, Miyachi H (2001)
Antifolate resistance and its circumvention by new analogues.
Hum Cell 14: 185-202

Thürlimann B, Senn HJ (2005)
Konsensusmeeting der 9th International Conference on Primary Therapy of Early Breast Cancer (St. Gallen, 26.-29. Januar 2005).
Gynäkol Geburtshilfliche Rundsch 45: 143 - 146

Van den Eijnde SM, Boshart L, Baehrecke EH, De Zeeuw CI, Reutelingsperger CPM, Vermeij-Keers C (1998)
Cell surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis is phylogenetically conserved.
Apoptosis 3: 9-16

Walter J, Urban J, Volkwein C, Sommer T (2001)
Sec61p-independent degradation of the tail-anchored ER membrane protein Ubc6p.
Embo J 20: 3124-3131

Wang TH, Wang HS, Ichijo H, Giannakakou P, Foster JS, Fojo T, Wimalasena J (1998)
Microtubule-interfering agents activate c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase through both Ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways.
J Biol Chem 273: 4928-4936

Wani MA, Xu X, Stambrook PJ (1994)
Increased methotrexate resistance and dhfr gene amplification as a consequence of induced Ha-ras expression in NIH 3T3 cells.
Cancer Res. 54: 2504-2508

Wild K, Rosendal KR, Sinning I (2004)
A structural step into the SRP cycle.
Mol Microbiol 53: 357-363

Winter-Vann AM, Kamen BA, Bergo MO, Young SG, Melnyk S, James SJ, Casey PJ (2003)
Targeting Ras signaling through inhibition of carboxyl methylation: an unexpected property of methotrexate.
Proc Natl Acad Sci USA 100: 6529-6534

Yan W, Li Q, Zhu F (2001)
Apoptosis-related genes cloned by improved subtractive hybridization.
Zhonghua Zhong.Liu Za Zhi. 23: 193-195

Yan W, Wang WL, Zhu F, Chen SQ, Li QL, Wang L (2003)
Isolation of a novel member of small G protein superfamily and its expression in colon cancer.
World J Gastroenterol 9: 1719-1724

Yarden Y (2001)
Biology of HER2 and its importance in breast cancer.
Oncology 61:1-13

Yoshida M, Okamura S, Kodaki T, Mori M, Yamashita S (1998)
Enhanced levels of oleate-dependent and Arf-dependent phospholipase D isoforms in experimental colon cancer.
Oncol Res 10: 399-406

Yukimoto K, Nakata B, Muguruma K, Yashiro M, Ohira M, Ishikawa T, Hino M, Hirakawa K (2001)
Apoptosis and thymidylate synthase inductions by 5-fluorouracil in gastric cancer cells with or without p53 mutation.
Int J Oncol 19: 373-378

Zeller WJ (2001)
Allgemeine Tumortherapie - Folsäureantagonisten IV-3.7, 1-14.
In: Zeller WJ, zur Hausen H (Hrsg): Onkologie Grundlagen Diagnostik Therapie, Entwicklungen.
11. Ergänzungslieferung, Ecomed, Landsberg

Zhang W, Ramdas L, Shen WP, Song SW, Hu LM, Hamilton SR (2003)
Apoptotic response to 5-fluorouracil treatment is mediated by reduced polyamines, non-autocrine Fas ligand and induced tumor necrosis factor receptor 2.
Cancer Biol Ther 2: 572-578

Eigene Veröffentlichungen

Fruehauf S, Schmitt K, Veldwijk MR, Schiedlmeier B, Martin S, Zeller WJ, Haas R (1999)

Relevance of Peripheral Blood Progenitor Cell Counts during Steady-State Hematopoiesis to Estimate the Number of Progenitor Cells Mobilized following Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Supported Chemotherapy.
Infusionsther Transfusionsmed 26: 103-109

Fruehauf S, Schmitt K, Veldwijk MR, Topaly J, Benner A, Zeller WJ, Ho AD, Haas R (1999)

Peripheral blood progenitor cell (PBPC) counts during steady-state haemopoiesis enable the estimation of the yield of mobilized PBPC after granolucyte colony-stimulation factor supported cytotoxic chemotherapy: an update on 100 patients.
Br J Haematol 105: 786-794

Marmé A, Schmitt K Ponstingl H, Lindner M, Bastert G, Gueckel B, Wallwiener D

MTX-induced upregulation of the β-subunit of the signal recognition particle receptor in the breast cancer cell line KS.
Publikation in Vorbereitung

# 7 Danksagung

Herrn Dr. med. A. Marmé bin ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation sowie für die Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Geduld, die er mir jederzeit entgegen brachte, sehr dankbar.

Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. B. Gückel danke ich für die Vertretung der Dissertation vor der Fakultät.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. G. Bastert und Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. Ponstingl danke ich für die Bereitstellung eines hervorragenden wissenschaftlichen Umfeldes, ohne das die Durchführung der Experimente in der dargelegten Weise nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. rer. nat. M. Lindner, der mich durch seine Hinweise bei der Durchführung der Experimente jederzeit unterstützte.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Onkologischen Labors der Universitäts-Frauenklinik für die fruchtbare Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre im Labor bedanken.

Besonderen Dank bin ich meinen Eltern schuldig für die große moralische Unterstützung, die sie mir haben zukommen lassen.

# 8 Lebenslauf

Personalien

| | |
|---|---|
| Name und Vorname: | Schmitt, Karin Dagmar Hildegard |
| Geburtsdatum: | 07.05.1975 |
| Geburtsort: | Homburg/Saar |
| Familienstand: | ledig |

Schulischer Werdegang

| | |
|---|---|
| 1981 - 1985 | Thomas-Mann-Grundschule Zweibrücken |
| 1985 - 1994 | Helmholtz-Gymnasium Zweibrücken |
| 08.06.1994 | Abitur |

Universitärer Werdegang

| | |
|---|---|
| WS 1994/1995 | Beginn des Studiums der Medizin an der Universität des Saarlandes |
| SS 1995– WS 1996/1997 | Studium an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz |
| WS 1996/1997– SS 2000 | Studium an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg |
| 04/2000– 02/2001 | Praktisches Jahr an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg |
| 18.09.1996 | Ärztliche Vorprüfung |
| 28.08.1997 | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 29.03.2000 | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 08.05.2001 | Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |

Beruflicher Werdegang

| | |
|---|---|
| 14.05.2001 | Teilapprobation |
| 06/2001 - 12/2002 | Tätigkeit als Ärztin im Praktikum an den Universitätskliniken des Saarlandes, Abteilung für Innere Medizin III |
| 01.12.2002 | Approbation |
| seit dem 01.12.02 | Tätigkeit als Assistenzärztin am Universitätsklinikum des Saarlandes (vormals Universitätskliniken des Saarlandes), Abteilung für Innere Medizin III |