

Differentielle Genexpression in  
Cisplatin-resistenten und -sensitiven  
Ovarialkarzinom-Zelllinien und  
Untersuchung der Funktion  
von EMP1

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Silke Weykam**

aus Köln

Bonn 2007



Die vorliegende Dissertationsschrift wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn in der Zeit von Juli 2002 bis Juli 2007 in der Abteilung Pharmazeutische Chemie des Pharmazeutischen Institutes unter der Leitung von Prof. Dr. Matthias U. Kassack angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Matthias U. Kassack

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Wiese

Fachnahes Mitglied: Prof. Dr. Ulrich Jaehde

Fachangrenzendes Mitglied: PD Dr. Tjong-Won Park

Tag der Disputation: 06.12.2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2008



# Verfassererklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese oder eine ähnliche Arbeit ist von mir nicht anderweitig als Dissertation eingereicht.

Bonn, 02. Juli 2007



# ICH DANKE

meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Matthias Kassack für die Bereitstellung des interessanten Themas und das in mich gesetzte Vertrauen. Die konstruktiven Diskussionen und das immer offene Ohr waren allezeit sehr hilfreich.

Herrn Prof. Dr. M. Wiese für die Übernahme des Koreferates und für die finanzielle Unterstützung und Ermöglichung dieser Arbeit.

Frau PD Dr. T. Park und Herrn Prof. U. Jaehde für ihre Mitarbeit in der Prüfungskommission.

den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Royer am Forschungsinstitut CAESAR, insbesondere Dr. Niels Eckstein, Dr. Kati Servan, Georg von Jonquières, Barbara Götz und Sybille Wolf-Kümmeth für die Durchführung der proteinbiochemischen Experimente, die Überlassung der Microarray-Daten und die Unterstützung in molekularbiologischen Fragestellungen. Dr. Niels Eckstein danke ich besonders für seinen Einsatz bezüglich EMP1 und dem Korrekturlesen der Arbeit.

Herrn Prof. Y. Ko und Frau E. Grünwald für die Ermöglichung und Hilfestellung bei der Durchführung der Subtraktionshybridisierung in der Medizinischen Poliklinik der Uni Bonn.

den Kollegen des Zelllabores und der Arbeitskreise von Prof. Wiese und Prof. Kassack für die stets freundschaftliche und hilfsbereite Zusammenarbeit und Unterstützung.

Eva Gosepath für die freundschaftliche Begleitung während dieser Arbeit und das Korrekturlesen der Arbeit.

meinem Freund Jörg für seine geduldige Unterstützung, den Rückhalt, die Motivation und die sportlichen Ablenkungsmanöver.

meinen Eltern, die es mir erst durch ihren unermüdlichen Glauben an mich und ihre Unterstützung ermöglicht haben, diese Arbeit zu erstellen.





Für meine Eltern  
und Jörg

*„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,  
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel  
aufheben, während sich der weite Ozean des  
Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“*

Issac Newton



## INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Ovarialtumore	1
1.2	Therapie des Ovarialkarzinoms	2
1.2.1	Übersicht	2
1.2.2	Operative Maßnahmen	2
1.2.3	Zytostatische Therapie	2
1.2.4	Neue Therapieansätze	3
1.3	Cisplatin	5
1.3.1	Wirkungsmechanismus von Cisplatin	5
1.3.2	Unerwünschte Wirkungen von Cisplatin	11
1.3.3	Cisplatin-Resistenz	12
2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	18
3	MATERIAL UND METHODEN	19
3.1	Material	19
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien	19
3.1.2	Puffer und Lösungen	23
3.1.3	Kits	27
3.1.4	Primer	28
3.1.5	Vektoren	29
3.1.6	Antikörper	29
3.1.7	Geräte	30
3.1.8	Verbrauchs- und sonstiges Arbeitsmaterial	31
3.2	Zellkultur	33
3.2.1	Zelllinien und Nährmedien	33
3.2.2	Kultivierung	34
3.2.3	Bestimmung der Zellzahl	35
3.2.4	Cisplatin-Inkubation der Zelllinien	35
3.3	MTT-Test	37
3.3.1	Ermittlung der optimalen Zellzahl für den MTT-Test	37
3.3.2	Durchführung des MTT-Tests	38
3.3.3	Ermittlung des Cisplatin-Resistenzgrades einer Zelllinie	39

3.4	BrdU-Test _____	39
3.5	RNA Isolierung _____	40
3.5.1	Isolierung der totalRNA _____	40
3.5.2	Isolierung der mRNA _____	41
3.6	Gelelektrophorese _____	42
3.6.1	DNA-Agarose-Gel _____	42
3.6.2	RNA-Agarose-Gel _____	42
3.6.3	DNA-Polyacrylamid-Gel _____	43
3.6.4	Silberfärbung _____	45
3.7	Quantifizierung von Nukleinsäuren _____	45
3.7.1	Quantifizierung von RNA und DNA mittels UV-Spektroskopie _____	45
3.7.2	Quantifizierung von dsDNA mit PicoGreen <sup>®</sup> _____	46
3.8	Alkoholfällung von Nukleinsäuren _____	47
3.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) _____	47
3.9.1	Reverse Transkription (RT) _____	49
3.9.2	Primer _____	50
3.9.3	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) _____	53
3.10	Suppressions-Subtraktions-Hybridisierung (SSH) _____	61
3.10.1	Synthese des ersten cDNA Stranges _____	66
3.10.2	Synthese des zweiten cDNA Stranges _____	67
3.10.3	RsaI-Verdau _____	68
3.10.4	Kontrolle des RsaI-Verdau _____	69
3.10.5	Adapter-Ligation _____	70
3.10.6	Kontrolle der Ligation _____	71
3.10.7	Erste Hybridisierung _____	72
3.10.8	Zweite Hybridisierung _____	73
3.10.9	PCR-Amplifikation _____	74
3.10.10	Mirror Orientation Selection (MOS) _____	76
3.10.11	Isolierung der PCR-Produkte _____	82
3.10.12	Differentielles Screening mittels Dot Blot _____	85
3.10.13	Sequenzierung und BLAST Datenbanksuche _____	92
3.11	Klonierung von EMP1 _____	92
3.11.1	Amplifikation des ORFs von EMP1 mittels PCR _____	93

## INHALTSVERZEICHNIS

---

3.11.2	DNA-Extraktion der PCR-Fragmente	95
3.11.3	Restriktionsverdau	95
3.11.4	Dephosphorylierung des Vektors	96
3.11.5	Kristallviolett-Gel zur Isolierung der geschnittenen DNA	96
3.11.6	Ligation der DNA-Fragmente	97
3.11.7	E. coli-Schüttelkultur	98
3.11.8	Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli	98
3.12	Überexpression von EMP1 in Ovarialkarzinom-Zelllinien	99
3.12.1	Transfektion von A2780 und A2780cis	99
3.12.2	Selektion von transfizierten Zellen durch Geneticin	103
3.12.3	Test der Einzelklone auf Überexpression von EMP1	104
3.13	Proteinbiochemische Methoden	105
3.13.1	Immunoblot	105
3.13.2	Immunocytochemie (ICC)	106
3.14	Statistik	107
4	ERGEBNISSE	108
4.1	Charakterisierung der Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780cis	108
4.1.1	Wachstumsverhalten der Zelllinien gegenüber Cisplatin	108
4.1.2	Wachstumsverhalten der Zelllinien	112
4.2	Differentielle Genexpression der Zelllinien A2780 und A2780cis	113
4.2.1	SSH und MOS	113
4.2.2	Differentielles Screening mittels Dot Blot	115
4.2.3	Homologiesuche mit BLAST	118
4.2.4	qRT-PCR der SSH Kandidaten-Gene	119
4.2.5	Zusammenfassung der einzelnen Schritte der differentiellen Genexpressionsanalyse der Zelllinien A2780 und A2780cis	121
4.2.6	Expression der SSH Kandidaten-Gene mittels Microarray	122
4.3	Untersuchung der Expression der SSH Kandidaten-Gene in 18 humanen Zelllinien	123
4.3.1	Charakterisierung der 18 Zelllinien mittels MTT-Test	123
4.3.2	qRT-PCR der SSH Kandidaten-Gene	127
4.4	Epitheliales Membranprotein 1 (EMP1)	134
4.4.1	Gexpressionsprofil in 18 Tumorzelllinien	134

4.4.2	EMP1-Expression in A2780 und A2780cis auf Proteinebene _____	137
4.4.3	Überexpression von EMP1 in Ovarialkarzinom-Zelllinien _____	138
4.4.4	Wachstumsverhalten der EMP1-Überexpressionsklone _____	142
4.4.5	Wachstumsverhalten der EMP1-Überexpressionsklone in Gegenwart von Cisplatin mittels MTT-Test_____	145
4.4.6	Proliferationsverhalten der EMP1-Überexpressionsklone in Gegenwart von Cisplatin mittels BrdU-Test_____	147
4.4.7	Immunoblot-Analysen _____	149
5	DISKUSSION _____	152
5.1	Die Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780cis _____	152
5.2	Differentielle Genexpression der SSH Kandidaten-Gene _____	153
5.3	Epitheliales Membranprotein 1 _____	154
6	ZUSAMMENFASSUNG _____	165
7	ABSTRACT _____	167
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS _____	168
9	LITERATURVERZEICHNIS _____	171
10	ANHANG _____	184
10.1	Schmelzpunktanalyse zur Kontrolle der Primer _____	184
10.1.1	Primer der SSH Kandidaten-Gene _____	184
10.1.2	Primer der Housekeeping-Gene _____	186
10.2	PCR-Effizienz der SSH Kandidaten-Gene und der HKG _____	189
10.3	Differentielle Genexpression der SSH Kandidaten-Gene in 18 humanen Zelllinien _____	190
10.3.1	Konzentrations-Wirkungskurven der 18 Tumorzelllinien ermittelt mittels MTT-Test _____	190
10.3.2	qRT-PCR zur Ermittlung der Housekeeping-Gene mittels geNorm _____	199
10.3.3	qRT-PCR der Kandidaten-Gene _____	201
11	CURRICULUM VITAE _____	206
12	PUBLIKATIONEN _____	207

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Ovarialtumore

Die Tumorgenese zeichnet sich durch eine Störung des Gleichgewichts zwischen dem Zellwachstum und dem Zelluntergang aus. Zellzyklus-Checkpunkte werden übersprungen, die Zelle wächst auch ohne Wachstumssignale von außen, wachstumsinhibitorische Signale und Immunantworten des Organismus werden überwunden [1]. Diese Vorgänge beruhen auf der Veränderung einer Vielzahl genetischer Faktoren, zu denen vor allem Mutationen in der Genklasse der Onkogene, Tumor-Suppressorgene und der Reparaturgene zählen. Des Weiteren sind Gene betroffen, die den programmierten Zelltod (Apoptose) regulieren.

Ovarialtumore sind bösartige Neoplasien der Eierstöcke und lassen sich in epitheliale (= Karzinome) und nicht-epitheliale Tumore einteilen, wobei erstere 85 % bis 90 % ausmachen. Ovarialtumore sind in den USA mit 6 % aller Tumortodesursachen die vierthäufigste Tumortodesursache bei Frauen [2]. In Deutschland nehmen die Krebssterbefälle durch Eierstockkrebs mit 5,9 % die Position fünf der Tumortodesursachen ein und es werden ca. 9950 Neuerkrankungen pro Jahr geschätzt [3]. Unter den gynäkologischen Tumoren ist der Ovarialkrebs sogar die häufigste Todesursache. Dies liegt zu einem großen Teil an der oft sehr späten Diagnose des Tumors. Bei etwa 75 % der Erkrankten erfolgt die Diagnose erst in den fortgeschrittenen Stadien III und IV. Die Einteilung der Krankheitsstufen erfolgt nach der FIGO-Klassifikation (FIGO; Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) in vier Stadien:

I: Ein oder beide Eierstöcke sind befallen

II: Ausbreitung des Tumors im Becken

III: Ausbreitung des Tumors in die Bauchhöhle und evtl. die Lymphknoten

IV: Der Tumor hat die Bauchhöhle verlassen (Fernmetastasen)

Im Stadium III liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nur bei 25-40 %, im Stadium IV nur noch bei 11 %. Wird die Diagnose jedoch bereits im Stadium I gestellt, dann liegt die 5-Jahres-Überlebensrate noch bei 80-90 % [4].

## 1.2 Therapie des Ovarialkarzinoms

### 1.2.1 Übersicht

Die Behandlung von Tumoren beruht hauptsächlich auf drei verschiedenen Verfahren, die oft auch in Kombination eingesetzt werden. Zum einen ist die chirurgische Entfernung des Tumors zu nennen. Daneben wird mit einer Strahlenbehandlung und/oder mit einer medikamentösen Therapie versucht, das Tumorwachstum einzudämmen und die Tumormasse zu vermindern. Die Heilungserfolge sind sehr von der Tumorart und dem Stadium der Erkrankung abhängig. Des Weiteren mindert das Vorhandensein oder Auftreten von Resistenzen gegenüber den eingesetzten Chemotherapeutika den Erfolg der Therapie.

### 1.2.2 Operative Maßnahmen

Zunächst wird die chirurgische Entfernung eines möglichst großen Teils der Tumormasse angestrebt. Meta-Analysen und retrospektive Studien belegen den Anstieg der Überlebenswahrscheinlichkeit bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom nach maximaler Tumorreduktion [5;6]. Die Operation dient ebenso der Inspektion des Tumors im Hinblick auf die Bestimmung des Tumorstadiums (Staging). Die nachfolgende adjuvante Chemotherapie richtet sich nach dem Tumorstadium.

### 1.2.3 Zytostatische Therapie

Die konventionelle primäre Chemotherapie für das fortgeschrittene Ovarialkarzinom (Stadien II-IV) bestand in den 1980er Jahren aus einer Kombination von Cisplatin und Cyclophosphamid. Nach der Einführung der Taxane wurde 1996 dieses Regime durch die Untersuchungen von McGuire et al. abgelöst durch eine Kombination von Cisplatin und Paclitaxel [7]. Es konnte eine signifikante Verlängerung der Lebenserwartung und des rezidivfreien Intervalls erzielt werden. Weitere Studien bestätigten die Überlegenheit dieser neuen Kombination [8]. Heute besteht die „First-Line-Chemotherapie“ des Ovarialkarzinoms in der Gabe von Paclitaxel in Kombination mit Cisplatin oder Carboplatin [9]. Letzteres scheint eine vergleichbare



Wirksamkeit wie Cisplatin zu besitzen, zeichnet sich aber durch ein günstigeres Nebenwirkungsprofil aus [10;11].

Neben der intravenösen Gabe ist beim Ovarialkarzinom die intraperitoneale Applikation möglich. Diese scheint pharmakokinetische Vorteile zu besitzen. Eine kürzlich veröffentlichte Meta-Analyse von 60 klinischen Studien der letzten 40 Jahre zeigte eine Überlebensverbesserung gegenüber der intravenösen Gabe der Chemotherapie [12].

Beim Auftreten einer Progression oder eines Rezidivs ist bisher leider noch keine kurative Therapie möglich. Die Therapiestrategie sollte sich deshalb neben der Erreichung einer Remission auch an der Lebensqualität orientieren. Die Auswahl der Chemotherapie richtet sich nach dem Ansprechen des Tumors auf die Primärtherapie und kann in Platin-haltige und Platin-freie Regime unterteilt werden. Bei Platin-sensiblen Tumoren wird auch hier eine Therapie mit Platin und einem Taxan eingesetzt. Bei Platin-resistenten Tumoren (kein Ansprechen bei der Primärtherapie oder ein rezidivfreies Intervall < 6 Monate) wird eine Monotherapie durchgeführt. Geeignete Medikamente sind hier Etoposid, Paclitaxel, Topotecan oder liposomales Doxorubicin. Da die Ansprechraten bei diesen Tumoren jedoch gering sind (ca. 20 %), kann auch an eine alternative, weniger belastende Therapie gedacht werden. Endokrine Therapien mit Gestagenen, Tamoxifen oder GnRH-Analoga weisen zwar eine noch geringere Ansprechraten auf, sind aber weniger toxisch [9].

#### **1.2.4 Neue Therapieansätze**

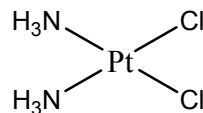
Neben den bisher aufgeführten „klassischen“ Therapien sind in den letzten Jahren neue Therapieansätze entwickelt worden und Gegenstand aktueller Forschung. Ein großer Vorteil dieser neuen Wirkstoffe liegt in ihrer Spezifität gegenüber Tumorzellen. Sie greifen in deregulierte Signalwege ein, während die normale Zellfunktion kaum gestört wird. In Tumorzellen liegt häufig eine gestörte Zellzyklusregulation vor. Die Familie der EGF-Rezeptoren (EGFR; Epidermal Growth Factor Receptor), bestehend aus vier Rezeptoren (EGFR, HER2/neu, HER3 und HER4) ist in vielen Tumoren häufig stark exprimiert [13]. Der EGFR-Signalweg trägt

zu einer Reihe von Prozessen bei, die das Tumorwachstum und -überleben regulieren wie z. B. die Zellproliferation, die Inhibition der Apoptose, die Angiogenese und die Metastasierung. Zwei vielversprechende Substanzgruppen, die gegen die EGFR gerichtet sind, sind die Tyrosinkinase-Inhibitoren (RTKIs) und die monoklonalen Antikörper. RTKIs inhibieren die gegenseitige Auto-Phosphorylierung der Tyrosinkinasen an der intrazellulären Domäne des Rezeptors. Somit wird die Signaltransduktion durch den Rezeptor blockiert. Die EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren Gefitinib und Erlotinib wurden inzwischen weitreichend *in vitro* und *in vivo* getestet. Für viele Tumorarten, unter ihnen auch das Ovarialkarzinom, konnte eine Antitumoraktivität nachgewiesen werden. In Kombination mit Cisplatin konnte eine verstärkte Inhibition des Tumorwachstums bei den Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR-3 und 2008 durch Gefitinib festgestellt werden [14]. In chemoresistenten Tumorzelllinien, die eine stärkere EGFR-Aktivität aufweisen, konnten größere inhibitorische Effekte durch Erlotinib beobachtet werden [15]. Auch in einer klinischen Phase II Studie wurden diese Effekte von Erlotinib bestätigt. Der monoklonale Antikörper Trastuzumab, gerichtet gegen den HER2-Rezeptor, scheint beim Ovarialkarzinom keine ausreichende Wirkung zu erzielen. In einer klinischen Studie der Phase II wurde nur eine Ansprechrate von 7 % beobachtet. Das geringe Ansprechen wird auf eine geringe Expression des HER2-Rezeptors zurückgeführt [16;17].

Substanzen, die die Neovaskularisierung von Tumoren unterdrücken (Angiogenese-Inhibitoren) werden inzwischen vermehrt in der Tumorthherapie eingesetzt. Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) ist ein Angriffspunkt für den monoklonalen Antikörper Bevacizumab. In Maus-Modellen des Ovarialtumors konnte durch eine Behandlung mit Bevacizumab eine negative Auswirkung auf die Tumormasse gezeigt werden [18]. Thalidomid scheint ebenso eine Antiangiogenese-Aktivität gegenüber Ovarialtumoren zu haben [19;20].

## 1.3 Cisplatin

Cisplatin (*cis*-Diammindichloroplatin(II); Abb. 1) ist ein sehr potentes Chemotherapeutikum, welches in der Therapie einer Vielzahl solider Tumoren eingesetzt wird. Bei Hodenkarzinomen zeigt es in Kombination mit anderen Zytostatika eine kurative Wirkung. Es wird des Weiteren bei der Behandlung von Ovarialtumoren, Blasen-, Kolon- und Lungenkarzinomen und bei Tumoren des Kopf- und Halsbereiches eingesetzt. Seine Entdeckung Mitte der 60er Jahre durch B. Rosenberg war eher zufällig [21]. Er beobachtete bei der Untersuchung von *E. coli* Bakterien im elektrischen Feld ein gesteigertes Längenwachstum und eine Unterdrückung der Zellteilung. Er konnte diesen antiproliferativen Effekt schließlich auf die Entstehung von Platinkomplexen aus Ammoniumchlorid aus dem Nährmedium und Platin aus der Platinelektrode zurückführen.

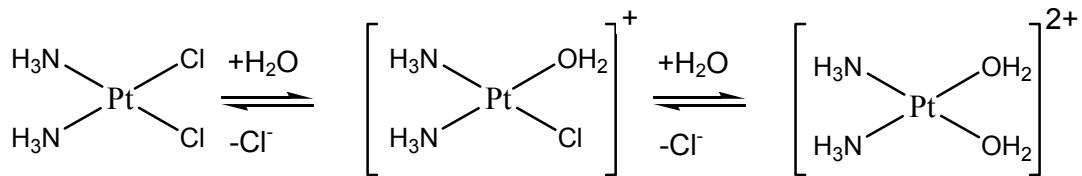


**Abb. 1: Strukturformel von Cisplatin.**

### 1.3.1 Wirkungsmechanismus von Cisplatin

#### Bioaktivierung

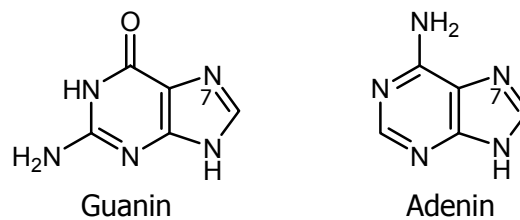
Cisplatin stellt einen anorganischen, planaren Komplex dar, dessen Zentralatom das  $\text{Pt}^{2+}$ -Ion ist. Es trägt zwei Chloridliganden, die cis-ständig um das Platinzentralatom angeordnet sind und zwei  $\text{NH}_3$ -Neutralliganden. Im Extrazellularraum liegt der Komplex neutral vor, und es kommt aufgrund der hohen Chloridkonzentration ( $\sim 100 \text{ mM}$ ) nicht zu einer Hydrolyse. Im Inneren der Zelle läuft aufgrund der geringen Chloridkonzentration ( $\sim 4 \text{ mM}$ ) ein Austausch der Chloridionen durch  $\text{H}_2\text{O}$ -Moleküle ab [22] (s. Abb. 2). Die entstandenen reaktiven Aquokomplexe sind nach außen positiv geladen und können die Zellmembran nicht mehr auf passivem Wege verlassen. Diese Elektrophile stellen die eigentliche Wirkform des Cisplatins dar und sind in der Lage mit Nukleophilen in der Zelle zu reagieren.



**Abb. 2: Hydrolyse-Reaktion von Cisplatin innerhalb der Zelle.**

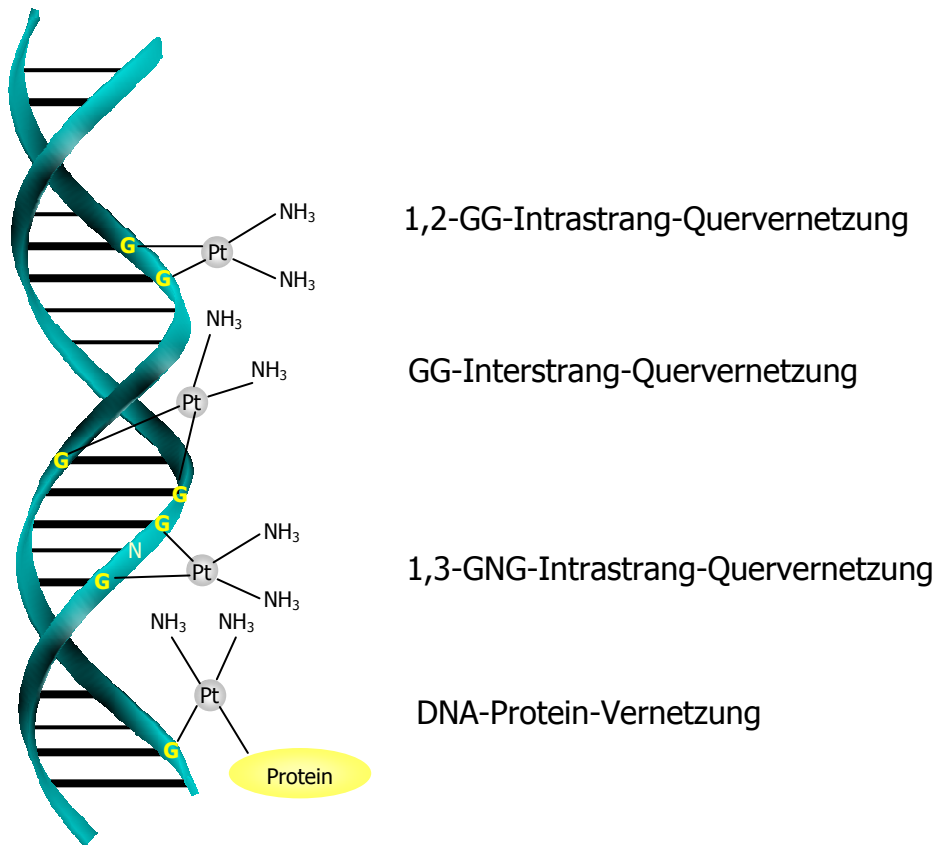
### Bildung von Platin-DNA Addukten

Cisplatin vermittelt seine zytotoxische Wirkung durch Interaktion mit der DNA. Es greift als reaktiver elektrophiler Aquokomplex bevorzugt an die nukleophilen N7-Positionen der Purin-Basen (s. Abb. 3) an und formt DNA-DNA Inter- und Intrastrang-Quervernetzungen [23;24].



**Abb. 3: Chemische Struktur der Purin-Basen.**

Die DNA-Addukte innerhalb eines Stranges werden bevorzugt gebildet und scheinen für 85-90 % aller Schädigungen verantwortlich zu sein, da für die Interstrang-Vernetzung eine größere Verdrehung der DNA nötig ist [25]. Auf einem Strang ist die Verknüpfung zwischen zwei N7-Positionen benachbarter Guaninbasen favorisiert (ca. 65 %), gefolgt von der Adduktbildung zwischen der N7-Position eines Guanins und der N7-Position eines benachbarten Adenins (ca. 25 %). 9 % der Intrastrang-Quervernetzungen stammen von 1,3-GNG Verbindungen, wobei N für ein beliebiges anderes Nukleosid steht (s. Abb. 4). Durch diese Wirkungsvermittlung lässt sich auch die Inaktivität der Transplatin-Verbindungen erklären. Sie sind aufgrund ihrer Geometrie nicht in der Lage Intrastrang-Quervernetzungen zu bilden.



**Abb. 4: Mögliche Adduktbildungen von Cisplatin mit Guanin in dsDNA.**

Cisplatin reagiert aber auch mit anderen nukleophilen Strukturen in der Zelle wie z.B. Proteinen, Membranphospholipiden, Mikrofilamenten und thiolhaltigen Molekülen (z. B. Glutathion), welches eine Inaktivierung des Moleküls zur Folge hat [24].

Die Formierung der DNA-Addukte ist der erste Schritt zur Vermittlung der zytotoxischen Wirkung von Cisplatin. Die Platinierung bewirkt eine Konformationsänderung der DNA durch ein Abknicken der Doppelhelix um 30-70°. Diese Destabilisierung kann vermehrt Strangbrüche hervorrufen. Außerdem führt die Deformation zunächst zur Inhibition der DNA-Synthese und der Transkription und im Weiteren zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose. Diese nachgeschalteten Effekte werden durch bestimmte Proteine vermittelt, welche die DNA-Addukte erkennen und daran binden [26;27]. Die Auswirkungen der Platin-DNA-Adduktbildung werden im nachfolgenden Abschnitt näher beschrieben.

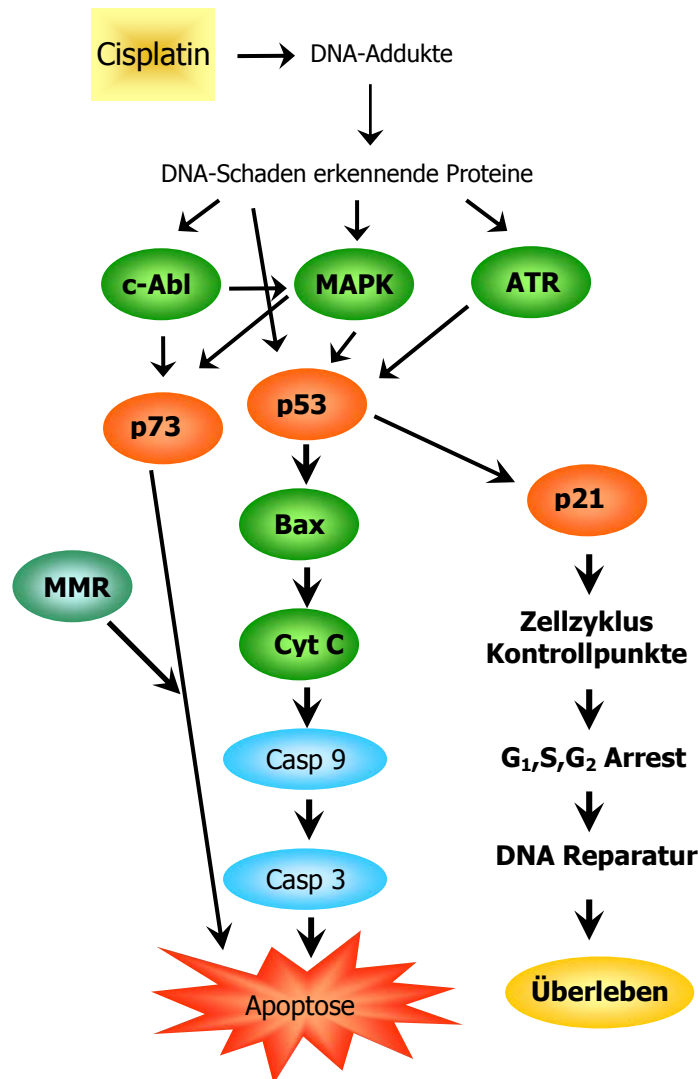
### **Auswirkungen der Platin-DNA-Adduktbildung**

Es wurde in mehreren Studien gezeigt, dass Cisplatin die DNA-Synthese inhibiert und somit eine weitere Zellvermehrung der Tumorzellen unterbunden wird. Dennoch sind die an der Synthese beteiligten DNA-Polymerasen noch zu einem gewissen Teil in der Lage, DNA-Addukte zu überwinden und DNA zu replizieren. Bei diesem auch als „replication bypass“ bezeichneten Prozess kommt es häufig zur Einführung von Mutationen [24].

Die Inhibition der DNA-Synthese stellt jedoch nur einen Aspekt der zytotoxischen Wirkung von Cisplatin dar. Des Weiteren wurde schon früh erkannt, dass eine Cisplatin-Behandlung die Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus arretiert. Diese Auswirkung wird auf die Unfähigkeit der Zelle zurückgeführt, Gene zu transkribieren, die für den Übergang in die Mitose nötig wären [28].

Ein wichtiger Aspekt in der Vermittlung der zytotoxischen Wirkung von Cisplatin ist das Erkennen von DNA-Schädigungen durch bestimmte Proteine. Dies führt im Weiteren zu einer Anzahl an Signalen, die entweder in einer erfolgreichen Reparatur der Schäden oder aber im Zelltod durch Apoptose enden. Ein Überblick der möglichen Reaktionen nach der Erkennung von DNA-Platinierung ist in Abb. 5 gegeben.

Die DNA-Schäden-erkennenden Proteine sind ganz unterschiedlicher Natur. Es handelt sich um Reparatur-Enzyme, Transkriptionsfaktoren, Histone und HMG-Box Proteine (High-Mobility Group) [24]. Einen wichtigen Stellenwert nehmen dabei die HMG-Box Proteine ein. Sie tragen ihren Namen aufgrund einer 80 Aminosäure-langen Domäne, die in einer Reihe von eukaryotischen DNA-bindenden Proteinen gefunden werden kann. Diese HMG-Domäne scheint die DNA-bindende Sequenz der Proteine darzustellen. Es werden verschiedene Mechanismen für die Vermittlung der zytotoxischen Wirkung von Cisplatin durch die DNA-bindenden Proteine vermutet. Eine Hypothese besteht darin, dass die Platin-DNA-Addukte Proteine von ihrer eigentlichen Bindestelle weglocken und damit deren natürliche Funktion unterbunden wird. Ermöglicht wird die Bindung dieser Proteine an DNA-Addukte, da diese eine strukturelle Homologie mit den eigentlichen Bindestellen an der DNA aufweisen.



**Abb. 5: Übersicht über einige Effekte, die Cisplatin in der Zelle auslöst. Nach Siddik et al. [27].**

Der Prozess wird auch als „Transcription factor hijacking“ bezeichnet, da viele der HMG-Box Proteine Transkriptionsfaktoren darstellen. Diese Transkriptionsfaktoren binden normalerweise an Promotoren oder Suppressoren und modulieren die DNA-Transkription. Durch das Abfangen der Faktoren wird die Tumorzelle extrem in ihrer normalen Zellaktivität gestört. Entdeckt wurde dieser Effekt bei frühen Untersuchungen des hUBF Proteins (human upstream binding factor), einem RNA-Polymerase I Transkriptionsfaktor, der von seiner eigentlichen Bindestelle an den rRNA-Promotor weggelockt wird. Somit ist im Folgenden die Transkription von rRNA Genen gestört [29;30]. Eine weitere Möglichkeit der Wirkungsvermittlung beruht darauf, dass die gebundenen Proteine die DNA-Schadstelle vor einer möglichen Reparatur durch DNA-Reparatur-Enzyme schützen („repair shielding model“). Somit

bleibt der DNA-Schaden erhalten und die Zelle wird über verschiedene Wege in den programmierten Zelltod geschickt. Gut untersucht ist dieser Effekt z. B. für das sehr häufig vorkommende HMG-Box Protein HMGB1. Zusätzlich scheint die Interaktion von HMGB1 mit p53 eine Konformationsänderung des HMG-Box Proteins zu bewirken, die die Bindung an DNA-Schadstellen verstärken. Außerdem fördert HMGB1 vermutlich über das MSH6-Protein den Mismatch-Repair-Mechanismus (MMR) [31;32]. Auf den MMR-Mechanismus wird später noch genauer eingegangen.

Zwei intrinsische Signalwege werden für die Apoptose-Vermittlung mitverantwortlich gemacht. Zum einen sind dies das Tumor-Suppressorgen p53 und seine nachgeschalteten Effekte und zum anderen eine Signaltransduktion über das p53-verwandte Gen p73.

Das Tumorsuppressorgen p53 spielt eine zentrale Rolle in der Chemotherapie-induzierten Apoptose. Als Transkriptionsfaktor reguliert es eine Reihe von anderen Genen, die entweder am Zellzyklus-Arrest oder an der Induktion der Apoptose beteiligt sind. Aufgrund seiner zentralen Position in diesem Mechanismus wird es auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet. P53 ist ein relativ instabiles Protein und wird schnell Ubiquitin-vermittelt in Proteasomen abgebaut. Kommt es zu einem genotoxischen Stress, wird es durch Phosphorylierung stabilisiert und aktiviert. Dies kann durch verschiedene Kinasen, wie z. B. den MAP-Kinasen (MAPK) oder aber auch der ATR-Kinase (ATM-and Rad3-related protein) erfolgen.

Eines der wichtigen von p53 induzierten Proteine ist das p21. Es handelt sich um einen Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor, der den Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase vermittelt, damit DNA-Reparaturmechanismen einsetzen können. Sind diese nicht erfolgreich, wird die Apoptose eingeleitet. Weiterhin aktiviert p53 die Transkription von Bax, einem Apoptose-Promotor. Bax-Homodimere, die nun vermehrt gebildet werden können, leiten das proapoptotische Signal weiter. Bax/Bcl-2-Heterodimere, welche die Apoptose unterdrücken, werden zurückgedrängt [33].

Der Apoptose-Induktionsweg über p73 wird nach der Schadenserkennung zunächst durch Phosphorylierung von p73 durch c-Abl, einer Tyrosin-Kinase, eingeleitet. Des



Weitern wird ein aktives MMR-System benötigt um das apoptotisches Signal zu übertragen [34].

Der Mismatch-Repair-Mechanismus (MMR) dient vornehmlich der Vermeidung von Mutationen nach der DNA-Replikation. Falsche Basenpaarungen (Mismatches) werden erkannt und repariert. Damit wird die Mutationsrate erniedrigt und die Integrität des Genoms aufrechterhalten [35].

Der Mechanismus beinhaltet eine Initiationsphase, in der die schadhafte Stelle auf dem neu synthetisierten Strang erkannt wird und sich ein Heterodimer aus MutS-homologen Proteinen anlagert. Danach erfolgen das Ausschneiden mittels Exonukleasen (z. B. ExoI) und die Resynthese durch eine DNA-Polymerase. Die durch Cisplatin-DNA-Addukte geschädigte DNA wird vom MMR-System ebenfalls erkannt, sie kann jedoch nicht repariert werden. Untersuchungen zeigten, dass das MMR-System immer den nicht geschädigten Tochter-Strang „repariert“ und der eigentlich geschädigte platinierter Strang nicht angetastet wird. Die fehlerhafte Reparatur setzt einen Teufelskreis in Gang, da die geschädigte DNA immer wieder als fehlerhaft erkannt wird. Aufgrund des Unvermögens, den Mismatch-Repair korrekt auszuführen wird die Zelle schließlich in die Apoptose geleitet [36;37]. Ein intaktes MMR-System stellt also einen Teil der Cisplatin-Wirkungsvermittlung dar. Ist dieses System nicht intakt, kommt es zu einem weniger stark ausgeprägten zytotoxischen Effekt durch Cisplatin.

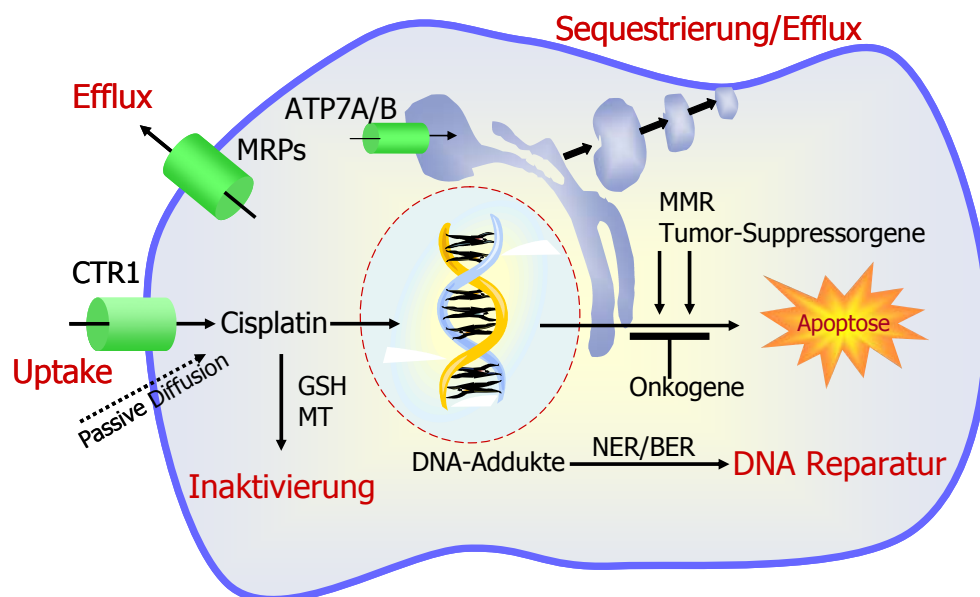
### **1.3.2 Unerwünschte Wirkungen von Cisplatin**

Der Einsatz von Cisplatin wird durch seine ausgesprochene Nephrotoxizität limitiert. Diesem dosisabhängigen Phänomen wird durch eine ausreichende Prä- und Posthydratation in Kombination mit forcierter Diurese mittels Furosemid oder Mannitol teilweise entgegengewirkt. Eine weitere Komplikation stellt die irreversible Ototoxizität dar, welche durch Schädigung von Zellen im Innenohr zustande kommt und zu Tinnitus und Hörverlust führt. Des Weiteren kann es bei längerer Hochdosistherapie zu einer peripheren Neuropathie kommen. Ein weiteres Problem bei der Behandlung ist das hoch emetogene Potenzial von Cisplatin. Eine Emeseprophylaxe ist unumgänglich und nach evidenzbasierten Leitlinien durchzuführen [38;39]. Es werden stark wirksame Antiemetika wie z.B. 5-HT<sub>3</sub>-

Rezeptorantagonisten oder die etwas neueren Neurokinin-1-Rezeptorantagonisten (Aprepitant) in Kombination mit Dexamethason mit Erfolg eingesetzt.

### 1.3.3 Cisplatin-Resistenz

Die Wirksamkeit von Cisplatin kann leider durch das Vorhandensein oder Auftreten einer Cisplatin-Resistenz gemindert sein. Die Resistenz kann sich im Laufe einer kontinuierlichen Cisplatinbehandlung entwickeln (sekundäre Resistenz) oder aber auch schon intrinsisch vorhanden sein, wie dies z. B. beim Kolorektalkarzinom oder beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom der Fall sein kann [40;41]. Die Resistenz gegenüber Cisplatin scheint ein multifaktorielles Geschehen zu sein, welches auf mehreren Ebenen der zytotoxischen Effektvermittlung von Cisplatin eingreift. Die Resistenzmechanismen können in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden; zum einen in Mechanismen die verhindern, dass Cisplatin die DNA erreicht, und zum anderen in Mechanismen, die nach der Bildung von DNA-Addukten die Induktion der Apoptose vereiteln [27;37]. Abb. 6 liefert einen schematischen Überblick über die einzelnen Vorgänge in der Zelle. Diese werden im Folgenden näher erläutert.



**Abb. 6: Schematische Übersicht über die verschiedenen Resistenzmechanismen einer Tumorzelle gegenüber Cisplatin.**

### **Verminderung der Akkumulation**

Eine verminderte Akkumulation von Cisplatin in der Zelle kann zum einen durch eine verminderte Aufnahme und zum anderen durch einen erhöhten Efflux zustande kommen. In zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien konnte bei Zellen mit erworbener Cisplatin-Resistenz eine verminderte Aufnahme beobachtet werden [42;43].

Die Aufnahme von Cisplatin in die Zelle scheint zum einen durch passive Diffusion abzulaufen. Diese Erkenntnis wird dadurch gestützt, dass die Cisplatin-Aufnahme proportional zur Konzentration ist und keine Sättigung eintritt. Außerdem kann die Akkumulation nicht durch strukturelle Analoga inhibiert werden.

Es zeigte sich jedoch, dass die Cisplatin-Aufnahme durch Inhibitoren der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und durch Benzaldehyd und ähnliche Aldehyd-Derivate moduliert werden kann [44;45]. Dies lässt auf die Beteiligung von aktiven Transportmechanismen oder von Ionenkanälen an der Cisplatin-Aufnahme in die Zelle schließen [27;43]. Untersuchungen in den letzten Jahren weisen auf die Rolle des Kupfertransporters CTR1 an der Aufnahme von Cisplatin in die Zelle hin [46]. Erste Untersuchungen in Hefen von Ishida et al. führten durch eine Inaktivierung von CTR1 zu einer Cisplatin-Resistenz. Gleiche Effekte konnten in CTR1-defizienten Mäusen beobachtet werden [47].

Die in der Membran des Golgi-Apparates lokalisierten Kupfertransporter ATP7A und ATP7B scheinen ebenso am zellulären Transport von Cisplatin beteiligt zu sein. Sie führen zu einer Sequestrierung von Cisplatin und zum Teil zu einer nachfolgenden exozytotischen Ausschleusung. Eine Überexpression dieser beiden P-Typ-ATPasen konnte in mehreren Cisplatin-resistenten Tumorzelllinien gefunden werden [48]. Auch in neun Ovarialkarzinom-Zelllinien war die ATP7B-Expression mit der Sensitivität gegenüber Cisplatin eng korreliert und wird als Marker für eine Chemoresistenz diskutiert [49].

Die „multidrug resistance-associated proteins“ (MRPs) umfassen eine Gruppe von sieben Proteinen (MRP1-7) und gehören zur Familie der ABC-Transporter. Diese Effluxpumpen werden in vielen Tumoren mit der Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika in Zusammenhang gebracht [50]. Für die Cisplatin-Resistenz

scheint jedoch nur das MRP2 von Bedeutung zu sein [51;52]. Die Beteiligung des „Multidrug Resistance P-Glykoproteins“ (MDR) an der Ausschleusung von Cisplatin wird zur Zeit eher ausgeschlossen [53-55].

### **Inaktivierung durch Glutathion und Metallothionine**

Ein weiterer Mechanismus der Cisplatin-Resistenz stellt die Inaktivierung der Substanz durch Thiol-haltige Moleküle dar. Speziell das Tripeptid Glutathion (GSH), welches bei Detoxifikationsprozessen der Zelle eine Rolle spielt, kann unter Beteiligung des Enzyms Glutathion-Transferase (GST) freie Radikale abfangen oder Reaktionen mit elektrophilen Agenzien eingehen. Somit wird die Bildung von Cisplatin-DNA-Addukten verhindert [56]. Eine erhöhte Glutathion-Konzentration ist in verschiedenen Cisplatin-resistenten Tumoren beobachtet worden, unter anderem auch in Ovarialtumoren [56].

Metallothionine (MTs) bilden als nukleophile Agenzien ebenfalls Cisplatin-Thiol-Konjugate [57]. Sie bestehen zu ca. 30 % aus Cystein und sind in ihrer physiologischen Funktion für den Metabolismus und die Detoxifikation von Schwermetallen zuständig. In Cisplatin-resistenten murinen und humanen Tumormodellen konnte eine erhöhte Konzentration von MTs gefunden werden [58;59]. Auch in MT-Überexpressionsstudien konnte eine 4fach erhöhte Resistenz gegenüber Cisplatin beobachtet werden [60]. Allerdings kann nicht immer eine erhöhte MT-Konzentration mit einer Cisplatin-Resistenz in Verbindung gebracht werden. Diese inkonsistenten Daten lassen vermuten, dass die Beteiligung der MTs an der Cisplatin-Resistenz gewebespezifisch ist und keinen Hauptresistenzmechanismus darstellt [37].

### **DNA-Reparatur**

Eine verstärkte Reparatur von Cisplatin-DNA-Addukten ist sehr häufig beschrieben. Für das fehlerfreie Funktionieren einer Zelle und somit eines Organismus ist DNA-Reparatur ein Mechanismus von großer Bedeutung. Mit Hilfe dieser Funktion können Fehler in der DNA, die durch äußere Einflüsse wie zum Beispiel UV-Licht oder

mutagene Chemikalien oder durch fehlerhafte Replikation entstehen, wieder behoben werden. Eine gesteigerte Reparaturrate nach DNA-Adduktbildung, einhergehend mit einer verminderten Zytotoxizität, wurde in mehreren murinen und humanen Tumorzelllinien gefunden [61;62]. Es sind mehrere unterschiedliche DNA-Reparaturmechanismen beschrieben. Die wichtigsten sind Nucleotide Excision-Repair (NER), Base Excision-Repair (BER) und Mismatch-Repair (MMR) [63].

NER ist der wichtigste Reparaturmechanismus bei größeren, sperrigen Adduktbildungen der DNA mit UV-Dimeren, polyzyklischen Aromaten und Platin-Verbindungen [63]. Der Mechanismus ist bereits gut untersucht und mehrfach beschrieben [36;56]. Es sind bisher 16 Proteine bekannt, die an den fünf Schritten dieses Mechanismus beteiligt sind. Nach dem Erkennen der defekten DNA wird der geschädigte DNA-Strang eingeschnitten, die betroffenen Basen ausgeschnitten und die entstandene Lücke durch eine DNA-Polymerase wieder aufgefüllt. Anschließend wird der geschnittene Strang religiert. Die am NER-Mechanismus beteiligten Gene können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die DNA-Schadenerkennungs- und Excisions-Gruppe (z. B. ERCC1 und XPA) und die Helikase-Gruppe (z. B. ERCC2 und ERCC3) [63]. Das ERCC1-Gen erfüllt wohl die Funktion beider Untergruppen und scheint eine wichtige Rolle zu spielen. Eine Überexpression dieses Gens wurde in mehreren resistenten humanen Tumorzellen und Patientenproben gefunden [24;42;64].

Der Base Excision Repair (BER) Mechanismus setzt bei kleineren DNA-Schäden ein, wie sie z.B. durch Alkylantien und Anthracycline entstehen. Es wird dabei eine Base oder eine kleine Anzahl von Basen ausgeschnitten und ersetzt. Dieser Mechanismus scheint bei der Cisplatin-Resistenz keine große Rolle zu spielen [63;63].

Der MMR-Mechanismus wurde bereits bei der Wirkungsvermittlung von Cisplatin besprochen. Das Fehlen eines intakten MMR-Mechanismus wurde in mehreren Untersuchungen mit dem Auftreten einer Cisplatin-Resistenz in Zusammenhang gebracht [36]. Speziell bei verschiedenen Ovarialkarzinom-Zelllinien wurde die Entwicklung eines fehlerhaften MMR-Systems im Zuge des Erwerbes einer Cisplatin-Resistenz beobachtet [65]. Um eine genomische Stabilität zu gewährleisten, kommt

es normalerweise erst nach einer Reparatur von DNA-Schäden zu einer DNA-Replikation. Durch ein defektes MMR-System aber kommt es zu einem so genannten „Replicative Bypass“, die DNA-Schäden werden toleriert und DNA synthetisiert.

### **Verhinderung der Apoptose**

Idealerweise tritt nach DNA-Schädigung durch Cisplatin der programmierte Zelltod, die Apoptose, ein. An diesem Prozess sind zahlreiche Proteine in einem verzweigten Signalnetzwerk beteiligt. Alle Störungen in diesen Signalwegen, sei es die Erhöhung antiapoptotischer Signaltransduktion oder die Erniedrigung proapoptotischer Signale, stellen einen potentiellen Resistenzmechanismus gegenüber Cisplatin dar.

So wurde eine Überexpression von Faktoren, die auf die Apoptose inhibitorisch wirken, mehrfach in Cisplatin-resistenten Tumoren gefunden. Es zeigte sich beispielsweise eine Erhöhung von Xiap (X-linked inhibitor of apoptosis protein), Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> [66-68].

In Tumoren liegt das p53-Gen oft in mutierter Form vor. Dies führt zu Defekten in der Weiterleitung von apoptotischen Signalen und letztendlich zu einer Toleranz der DNA-Schäden [27;33]. Die Ergebnisse zu Untersuchungen des Beitrags von p53 zu einer Cisplatin-Resistenz sind jedoch nicht einheitlich. In Ovarialtumoren wurde in mehreren Studien ein Anstieg der Resistenz gefunden, wenn das p53-Gen mutiert war oder die Expression *in vitro* unterdrückt wurde [69-71]. Es wurde aber auch ein Ansprechen auf Cisplatin bei mutiertem p53 *in vitro* und *in vivo* beobachtet [72;73].

Von großem Interesse sind in den letzten Jahren Forschungen, die sich mit Wachstumsfaktor-Rezeptoren aus der Familie der Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) und den von ihnen vermittelten Signaltransduktionswegen beschäftigen. RTKs sind membrangebundene Proteine mit einer extrazellulären Ligand-Bindungsdomäne, einem transmembranären Segment und einer intrazellulären Domäne, an die Tyrosin-Reste gebunden sind. Durch Ligandbindung kommt es zu einer Dimerisierung, welche wiederum eine Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten und damit eine Aktivierung proliferativer und antiapoptotischer Signale verursacht. Vor allem die

ERBB-Familie mit den vier Rezeptoren ERBB1-4 (auch EGFR1-4) wird im Zusammenhang mit Chemoresistenzen intensiv erforscht [74]. So geht z. B. das vermehrte Auftreten von ERBB2 in Brust- und Ovarialkarzinom-Patientinnen einher mit einem schlechten Ansprechen auf eine Cisplatintherapie [75;76]. Von zentraler Bedeutung scheint in diesem Zusammenhang die starke Aktivität der Protein-Kinase B (PKB), auch Akt genannt, zu sein. Diese wirkt sich inhibitorisch auf proapoptotische Faktoren wie BAD, Pro-Caspase 9 und Bax aus und vermittelt somit das Überleben der Zelle. Akt wiederum wird von der PI3-Kinase (Phosphoinositid-3-Kinase) aktiviert, welche wiederum direkt von den membranständigen Wachstumsfaktor-Rezeptoren aktiviert wird.

Die hier dargelegten Resultate belegen einmal mehr den multifaktoriellen Charakter der Cisplatin-Resistenz und verdeutlichen den Bedarf an Erforschung der einzelnen Faktoren und deren Zusammenspiel.

## 2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Cisplatin stellt ein sehr potentes Chemotherapeutikum dar, das in der Behandlung einiger Tumoren erfolgreich eingesetzt wird. Seine Potenz kann jedoch durch das Auftreten von Resistenzen gemindert werden.

Bei der Cisplatin-Resistenz handelt es sich um ein bereits umfangreich untersuchtes Phänomen, welches als ein multifaktorielles Geschehen begriffen wird. Der heutige Wissensstand lässt jedoch noch keine hinreichende Vorhersage des klinischen Ansprechens auf Cisplatin und keine Möglichkeiten der Überwindung der Cisplatin-Resistenz zu.

In dieser Arbeit sollte die Genexpression einer Cisplatin-sensitiven mit einer Cisplatin-resistenten Ovarialkarzinom-Zelllinie mittels Suppressiver Subtraktiver Hybridisierung verglichen werden. Ziel war es, weitere Gene zu finden und zu charakterisieren, die an dem multifaktoriellen Geschehen der Cisplatin-Resistenz beteiligt sind.

Des Weiteren sollten, ausgehend von den differentiell exprimierten Kandidatengen, noch nicht bekannte Zusammenhänge im Ablauf der Cisplatin-Resistenz aufgedeckt werden. In diesem Zusammenhang sollte die Rolle des Kandidatengenes EMP1 näher untersucht werden. Ausgehend von EMP1-überexprimierenden Subzelllinien der Cisplatin-sensitiven und Cisplatin-resistenten Ovarialkarzinom-Zelllinien sollte die Beteiligung von EMP1 an der Chemosensitivität gegenüber Cisplatin analysiert werden.



## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Name	Art. Nr.	Hersteller
Ampicillin-Na	K029.1	Roth, Karlsruhe, Karlsruhe
Ampuwa, steriles Wasser	3655641	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Aprotinin	A2132	AppliChem, Darmstadt
BES	B9879	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
$\beta$ -Glycerolphosphat	G6251	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Bicinchoninsäure-Monohydrat	14339	Fluka, Seelze
Bovines Serumalbumin (BSA)	A7906	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Bovines Serumalbumin (für BrdU/ICC)	A7030	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Calciumchlorid	1.02382	Merck, Darmstadt, Darmstadt
Casy <sup>®</sup> ton, Isotone Salzlösung	43001	Schärfe System, Reutlingen
Chloroform	1.02445	Merck, Darmstadt, Darmstadt
Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) (v/v)	C0549	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Chloroquin-Diphosphat	25745	Fluka, Seelze
CIAP Phosphatase (1U/ $\mu$ l)	EF0341	Fermentas, St. Leon-Rot
CIAP Phosphatase Reaktionspuffer 10X	EF0341	Fermentas, St. Leon-Rot
Cisplatin	P4394	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
CleanGel Long10		ETC, Kirchentellinsfurt
DAPI	D9564	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Delect-Puffer, pH 7,3	1002-08	ETC, Kirchentellinsfurt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	D5758	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	4720	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	1.06559	Merck, Darmstadt, Darmstadt
DMEM	D5671	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
DNA Leiter 100 bp		Biolabs Inc., Vancouver, Kanada
DNA-Long-Run Puffer	1002-09	ETC, Kirchentellinsfurt

<b>Name</b>	<b>Art. Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
DNaseI, RNase frei	107767850 01	Roche Applied Science, Mannheim
dNTP (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	DNTP10	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
DTT	A1101	AppliChem, Darmstadt
EcoRI [12 U/μl]	R6011	Promega, Mannheim
EDTA	E9884	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
EDTA-Lösung [50 mM]	S4809	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
EGTA	E3889	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Eisessig	A6283	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Essigsäure	1.00058	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut p.a.	1.00983	Merck, Darmstadt
Formaldehyd 37 %	F1635	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Formamid	F7503	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Fötales Kälberserum (FKS)	F7524	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder [0,5 μg/μl]	SM0311	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder [0,1 μg/μl]	SM0243	Fermentas, St. Leon-Rot
Geneticindisulfat	0239	Roth, Karlsruhe
Glycerol 99,5%ig	3783.1	Roth, Karlsruhe, Karlsruhe
Glycin	23390	Serva, Heidelberg
Hefeextrakt	Y00500	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Hepes	H3375	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
imMedia™ Amp Blue	Q60220	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Isoamylalkohol	I3642	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Isopropanol absolut p.a.	1.09634	Merck, Darmstadt
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	P746.1	Roth, Karlsruhe
K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] × 3 H <sub>2</sub> O	P745.1	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	1.04873	Merck, Darmstadt
Kanamycin-Monosulfat	K4000	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Kodak GBX Fixer and Developer Twin Set	190-1859	Kodak über Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Kristallviolett	T123	Roth, Karlsruhe
Kupfersulfat-Pentahydrat	197730010	Acros, Geel, Belgien
LB Agar-Tablets	L7025	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

<b>Name</b>	<b>Art. Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
LB-Medium imMedia™ Amp Blue	Q602-20	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Leupeptin-Hemisulfat	A2183	AppliChem, Darmstadt
L-Glutamin [200 mM]	G7513	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Loading Dye-Lösung 6X	R0611	Fermentas, St. Leon-Rot
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	R2189.2	Roth, Karlsruhe
Mineralöl	M5904	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
MTT	M2128	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
NaF	A0401	AppliChem, Darmstadt
Natriumacetat	6773	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat-Puffer (pH 5,2)	S7899	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumcarbonat	1.06393	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	1.06404	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	1.06346	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	1.06329	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid p.a.	206060010	Acros Organics, Geel, Belgien
Natriumthiosulfat	S1648	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Paraformaldehyd	0335.1	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Lösung [10000 I.E./ml; 10 mg/ml]	P0781	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Petroleumbenzin	24551	Riedel-de-Haën, Seelze
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) (v/v/v)	P3803	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Phusion™ HF Buffer 5X	F-540S	Finnzymes, Espoo, Finnland
Phusion™ Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase [2 U/μl]	F-540S	Finnzymes, Espoo, Finnland
Puffer Tango™ 10X	BY5	Fermentas, St. Leon-Rot
Reinstwasser		gewonnen mittels Millipore Elix®
RNA Ladder High Range [0,5 mg RNA/ml]	SM0421	Fermentas, St. Leon-Rot
RPMI 1640	R8758	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Salzsäure 37%ig	1.00317	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure konz.	1.00731	Merck, Darmstadt
SDS	A2572	AppliChem, Darmstadt
Seakem® LE Agarose	50001	Cambrex, Charles City, USA
SeaPlaque® GTG Agarose	50111	Cambrex, Charles City, USA

<b>Name</b>	<b>Art. Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
Silbernitrat	S0139	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
SmaI [10 U/ $\mu$ l]	ER0661	Fermentas, St. Leon-Rot
SYBR <sup>®</sup> Green II	S9305	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
T4-DNA-Ligase	EL0015	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase Ligationspuffer 10X	EL0015	Fermentas, St. Leon-Rot
Tri <sup>®</sup> -Reagenz	T9424	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tricin	93355	Fluka, Seelze
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	1.06432	Merck, Darmstadt
Triton X 100	3051	Roth, Karlsruhe
Trizma <sup>®</sup> -Base (pH 10,5-12,0)	T6791	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Trypsin-EDTA 0,25 %ig [0,25 % Trypsin, 0,02 % EDTA]	T4049	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Trypsin-EDTA 1X [0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA]	T3924	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Trypton/Pepton	8952.1	Roth, Karlsruhe
Tween <sup>®</sup> 20	P1379	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
XbaI [10 U/ $\mu$ l]	ER0681	Fermentas, St. Leon-Rot
X-Gal	B4252	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
$\beta$ -Dinatrium-Glycerolphosphat- Monohydrat	A2253	AppliChem, Darmstadt

### 3.1.2 Puffer und Lösungen

#### BBS Puffer 2X

BES	50 mM	pH-Wert exakt auf 6,95 einstellen, sterilfiltrieren, aliquotieren, Lagerung bei -20 °C
NaCl	280 mM	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 mM	

#### CaCl<sub>2</sub>-Lösung

CaCl <sub>2</sub>	2,5 M	in Reinstwasser lösen, sterilfiltrieren, Lagerung bei RT
-------------------	-------	----------------------------------------------------------

#### Cisplatin-Stammlösung

Cisplatin	5 mM	aliquotieren, Lagerung bei -20 °C
NaCl-Lösung		

#### Cisplatin-Verdünnungsreihe

Cisplatin-Stammlösung	31,6 nM, 100 nM	in 0,9%iger NaCl-Lösung herstellen, aliquotieren, Lagerung bei -20 °C
[5 mM]	3,16 µM, 10 µM	
	31,6 µM, 100 µM	
	316 µM, 1 mM	
	3,16 mM	

#### DMEM-Medium

DMEM	500 ml	Lagerung bei 4 °C
FKS	10 % (v/v)	
Penicillin	100 I.E./ml	
Streptomycin	0,1 mg/ml	
L-Glutamin	8 mM	

#### DEPC-Lösung 0,1 % (v/v)

DEPC	0,5 ml	bei RT 16 h inkubieren, dann autoklavieren, Lagerung bei 4 °C
Reinstwasser	ad 500 ml	

#### DNaseI-Puffer

Tris-HCl	100 mM	pH-Wert auf 8,3 einstellen, autoklavieren; Lagerung bei 4 °C
KCl	500 mM	
MgCl <sub>2</sub>	15 mM	

#### Entwicklungslösung Silberfärbung

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2,5 % (w/v)	in Reinstwasser, frisch herstellen
Formaldehyd	0,037% (v/v)	
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,002 % (m/v)	

#### Fixierlösung Silberfärbung

Ethanol p.a.	15 % (v/v)	in Reinstwasser, Lagerung bei RT
Essigsäure p.a.	5 % (v/v)	

#### Fixierungs-Puffer X-Gal Färbung 10X

Formaldehyd	20 % (v/v)	in 10X PBS-Puffer, bei RT lagern
Glutaraldehyd	2 % (v/v)	

**Glycerol-Lösung 60%ig**

99,5 % (v/v) Glycerol	76,1 g
Reinstwasser	39,7 g

Sterilfiltrieren,  
Lagerung bei 4 °C**Gel-Ladepuffer**

Bromphenolblau	2,5 mg/ml
Glycerol	30 % (v/v)

in Reinstwasser,  
Lagerung bei 4 °C**Geneticin-Stammlösung**

aktives Geneticin	100 mg/ml
-------------------	-----------

in Reinstwasser,  
sterilfiltrieren, aliquotieren,  
Lagerung bei  
-20 °C**Hepes-Puffer 10X (RNA-Gele)**

EDTA	10 mM
NaCH <sub>3</sub> COO x 3 H <sub>2</sub> O	50 mM
Hepes	200 mM
DEPC-Wasser	ad 1000 ml

mit NaOH auf pH 7,2  
einstellen; autoklavieren;  
Lagerung bei 4 °C**Hepes-Laufpuffer 1X**

10X Hepes-Puffer	1:10 mit DEPC-Wasser verdünnen
------------------	-----------------------------------

bei Bedarf frisch herzustellen

**Imprägnierlösung Silberfärbung**

Glycerol	10 % (v/v)
----------	------------

In Reinstwasser, Lagerung bei  
RT**LB-Agar**

Tryptone	5 g
Hefeextrakt	2,5 g
NaCl	5 g
Agar	3,5 g
Reinstwasser	ad 500 ml

Autoklavieren, abkühlen  
lassen auf ca. 50 °C, dann  
Zugabe des Antibiotikums; im  
noch flüssige Zustand  
Agarplatten damit gießen**LB-Medium**

Trypton	5 g
Hefeextrakt	2,5 g
NaCl	5 g
Reinstwasser	ad 500 ml

Autoklavieren, abkühlen  
lassen auf ca. 50 °C, dann  
Zugabe des Antibiotikums;  
Lagern bei 4 °C**MTT-Stammlösung**

MTT	50,0 mg
1X PBS Puffer	ad 10,0 ml

Lagerung lichtgeschützt bei  
4 °C**MTT-Lyse-Lösung**

Isopropanol absolut	50 ml
HCl 37%ig (m/v)	165 µl

Lagerung bei RT

**Natriumchlorid-Lösung 0,9 %ig (m/v)**

NaCl	9,0 g
Reinstwasser	ad 1000,0 ml

Sterilfiltrieren  
Lagerung bei -20 °C

**NTE-Puffer**

NaCl	10 mM	in 1X TE-Puffer pH 7,5 für molekularbiologisches Arbeiten
------	-------	-----------------------------------------------------------

**PBS-Puffer 10X (Phosphate buffered saline)**

NaCl	1,37 mM	pH auf 7,4 einstellen, autoklavieren, Lagerung bei 4 °C
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	80,57 mM	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14,7 mM	
KCl	26,8 mM	

**PBS-Puffer 1X (Phosphate buffered saline)**

PBS-Puffer 10X	1:10 mit Reinstwasser verdünnen	sterilfiltrieren, bei Bedarf herstellen, Lagerung bei 4 °C
----------------	---------------------------------	------------------------------------------------------------

**Primer-Stammlösung**

Primer Lyophilisat	125 µM	in 1X TE-Puffer pH 7,5 für molekularbiologisches Arbeiten, Lagerung bei -20 °C
--------------------	--------	--------------------------------------------------------------------------------

**Primer-Gebrauchslösung**

	12,5 µM	in 1X TE-Puffer pH 7,5 für molekularbiologisches Arbeiten, Lagerung bei 4 °C
--	---------	------------------------------------------------------------------------------

**RPMI 1640-Medium**

RPMI 1640	500 ml	Lagerung bei 4 °C
FKS	10 % (v/v)	
Penicillin	100 I.E./ml	
Streptomycin	0,1 mg/ml	
L-Glutamin	2 mM	

**SDS 20 %**

SDS	20 % (m/v)	in Reinstwasser, bei RT lagern
-----	------------	--------------------------------

**Silber-Stammlösung**

AgNO <sub>3</sub>	2 % (m/v)	in Reinstwasser, bei 4 °C lichtgeschützt lagern
-------------------	-----------	-------------------------------------------------

**Silberlösung für Silberfärbung**

AgNO <sub>3</sub> -Stammlsg.	0,1% (m/v)	in Reinstwasser, frisch herstellen
Formaldehyd	37% (v/v)	

**SOC-Medium**

Tryptone	20 g	autoklavieren, abkühlen lassen, dann Zugabe von 20 ml 1 M Glucose
Hefeextrakt	5 g	
NaCl	0,5 g	
250 mM KCL	10 ml	
2 M MgCl <sub>2</sub>	5 ml	
Reinstwasser	ad 1000 ml	

**Strip-Lösung (Differentielles Screening)**

NaOH	0,2 M	in Reinstwasser, Lagerung bei 4 °C
SDS	0,1 %	

**SSC 20X**

NaCl	3 M	in Reinstwasser, auf pH 7,0 einstellen, bei RT lagern
Na <sub>3</sub> Citrat	0,3 M	

**Stopplösung Silberfärbung**

Glycin	2,0 % (m/v)	in Reinstwasser, bei Bedarf frisch herzustellen
Na <sub>2</sub> EDTA	0,5 % (m/v)	

**SYBR®Green II-Lösung 10X**

SYBR®Green II	1:100 mit 1X TE-Puffer pH 7,5 verdünnen	aliquotieren, Lagerung bei -20 °C
---------------	--------------------------------------------	--------------------------------------

**TAE-Puffer 50X**

Trizma®-Base pH 10,5 – 12,0	2 M	pH-Wert auf 8,5 einstellen; autoklavieren; Lagerung bei 4 °C
Essigsäure	1 M	
EDTA	0,5 M	
Reinstwasser	ad 1000 ml	

**TAE-Laufpuffer 1X**

50X TAE-Puffer	1:50 mit Reinstwasser verdünnen	bei Bedarf frisch herzustellen
----------------	------------------------------------	--------------------------------

**TE-Puffer 1X, pH 7,5 für UV-Messung**

Tris-HCl	10 mM	auf pH 7,5 einstellen, autoklavieren, Lagerung bei 4 °C
EDTA	0,1 mM	

**TE-Puffer 1X, pH 7,5 für molekularbiologische Arbeiten**

20X TE-Puffer aus PicoGreen® ds Quantitation Kit	1:20 mit Ampuwa verdünnen	Lagerung bei 4 °C
-----------------------------------------------------	------------------------------	-------------------

**Waschlösung hochstringent (Differentielles Screening)**

SSC	0,5X	in Reinstwasser, Lagerung bei 4 °C
SDS	0,1 %	

**Waschlösung mittelstringent (Differentielles Screening)**

SSC	1X	in Reinstwasser, Lagerung bei 4 °C
SDS	0,1 %	

**Waschlösung niedrigstringent (Differentielles Screening)**

SSC	2X	in Reinstwasser, Lagerung bei 4 °C
SDS	0,1 %	

**X-Gal Stammlösung**

X-Gal	20 mg/ml in DMF	Lagerung bei -20 °C für 1 Monat
-------	-----------------	------------------------------------



**Zell-Lyse-Puffer**

EDTA	1 mM	in 1X PBS-Puffer, pH 7,2-7,4;
Tween 20	0,005 %	25 µg/ml Pepstatin und 3
Triton X 100	0,5 %	µg/ml Aprotinin vor Gebrauch
NaF	10 mM	frisch hinzugeben
NaCl	150 mM	
β-Glycerolphosphat	20 mM	
DTT	1 mM	

**3.1.3 Kits**

**Advantage<sup>®</sup> cDNA PCR Kit**, Kat. Nr. 639 102, Clontech Laboratories,  
Palo Alto, USA

**Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetrisch)**, Kat. Nr. 11647229001, Roche  
Applied Science, Mannheim

**DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II**, Kat. Nr.  
11585614910, Roche Applied Science

**DIG Wash and Block Buffer Set**, Kat. Nr. 11585762001, Roche Applied Science

**DNA Extraction Kit**, K0513, Fermentas, St. Leon-Rot Life Sciences, St. Leon-Rot

**ECL Plus Western Blotting Detection Reagents**, Kat. Nr. RPN2132, Amersham  
Biosciences

**GenElute<sup>™</sup> mRNA Miniprep Kit**, MRN10, Sigma

**High-Capacity cDNA Archive Kit**, Art. Nr. 4322171, Applied Biosystems,  
Darmstadt

**High Purity Plasmid Miniprep System**, 11449-014, Marligen Biosciences,  
bezogen über Biocat, Heidelberg

**HotStarTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase Kit**, Kat. Nr. 203203, Qiagen, Hilden

**PicoGreen<sup>®</sup> dsDNA Quantitation Kit**, Kat. Nr. P-7589, Molecular Probes, Eugene,  
OR, USA

**PCR-Select<sup>™</sup> cDNA Subtraction Kit**, Kat. Nr. K1804-1, Clontech Laboratories

**QuantiTect<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit**, Kat. Nr. 204143; Qiagen, Hilden

**RNeasy Mini Kit**, Kat. Nr. 74104, Qiagen, Hilden

**TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit**; Kat. Nr. K4550-01, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

### 3.1.4 Primer

Primer-Name	Gen-Symbol	Accession Nr.	Sequenz 5' - 3'
ACTB L ACTB R	ACTB	NM_001101	TCCTTCCTGGGCATGGAGT GCACTGTGTTGGCGTACAG
B2M L B2M R	B2M	NM_004048	CACCCCCACTGAAAAAGATG CAAACCTCCATGATGCTG
BTBD1-L BTBD1-R	BTBD1	NM_025238	TGAGGAATTTGCAGCAGGTC AGCATCTTGGTCGGTCAATG
DDX21 L DDX21 R	DDX21	NM_004728	TCAGCTATAAAGCAGGATGC ATGTCTAACCCACGTGCAG
E61 L E61 R	E61	NM_000365	CTTCCTTGTGGGTGGTGCTTC TAGTTTGGATGAGGCCACAG
EMP1 L EMP1 R	EMP1	NM_001423	TCATATGCCAGTGAAGATG AGAGCTGGAACACGAAGAC
EMP1-293-L-Span EMP1-293-R	EMP1	NM_001423	CAATGTCTGGTTGGTTTCCAATACG TGTCTTGAGGGCATCTTCACTGG
G3PDH5 <sup>r*</sup> G3PGH3 <sup>r*</sup>	-	-	ACCACAGTCCATGCCATCAC TCCACCACCCTGTTGCTGTA
GUS-B L GUS-B R	GUS B	NM_000181	TTCACCAGGATCCACCTCTG AGCACTCTCGTCGGTGACTG
HF1 L HF1 R	HF1	NM_000186	CAGAGACACCTCCTGTGTG TGATACAAGTTCTGGCATTG
HPRT1 L HPRT1 R	HPRT1	NM_000194	CTGGCGTCGTGATTAGTG CACACAGAGGGCTACAATG
M13 L M13 R	-	-	CAGGAAACAGCTATGAC GTAAAACGACGGCCAG
NP1 <sup>*</sup>	-	-	TCGAGCGGCCG <u>CCCGGGC</u> AGGT <i>Sma</i> I Restriktionsschnittstelle unterstrichen
NP2R <sup>*</sup>	-	-	AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT
NP2Rs <sup>*</sup>	-	-	GGTCGCGGCCGAGGT
PI15 L PI15 R	PI15	NM_015886	TCTGAGCCCTAGGATTGATTC AAGCACCAGCTTAGCACAG
RPL13 L RPL13 R	RPL13	NM_000977	GCTCATGAGGCTACGGAAAC TATTGGGCTCAGACCAGGAG
RPLP0 L RPLP0 R	RPLP0	NM_001002	AGCTCTGGAGAACTGCTG CAGCAGCTGGCACCTTATTG

\* aus dem PCR-select™ cDNA Subtraction Kit (SSH)

Primer-Name	Gen-Symbol	Accession Nr.	Sequenz 5' - 3'
RPS 27 L RPS 27 R	RPS27	NM_001030	TACGCACACGAGAACATGC AGTGGAGCAGCCAACACAC
TFR L TFR R	TFR	NM_003234	GACTTTGGATCGGTTGGTG CAGTAACCGGATGCTTCAC
TRA1 L TRA1 R	TRA1	NM_003299	ACATTCCCTCTCCACACAGG TGATGCAAAGGTGGAAGAAG
UBE2D2 L UBE2D2 R	UBE2D2	NM_003339	ACCACCTAAGGTTGCATTTAC TAGATCCGAGCAATCTCAGG
YWHAZ L YWHAZ R	YWHAZ	NM_003406	GACAGCTTTTGATGAAGCCATTG TCCACAATGTCAAGTTGTCTCTCAG

### 3.1.5 Vektoren

Name	Hersteller
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
pCMV-SPORT6	Biocat, Heidelberg
pcDNA <sup>™</sup> 1.2/V5-GW/lacZ	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
pcDNA3.1/V5-His	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

### 3.1.6 Antikörper

Name Primärantikörper	Art. Nr.	Hersteller
Humaner polyklonaler EMP1-AK	H00002012-A01	Abnova, Taiwan
Humanes rekombinantes EMP1-Protein	H00002012-P01	Abnova, Taiwan
Goat Anti-human p53 IgG	AF1355	R&D Systems, Wiesbaden
Goat Anti-human p21 IgG	AF1047	R&D Systems, Wiesbaden
Sheep anti-human $\beta$ Actin IgG	AF4000	R&D Systems, Wiesbaden
Name Sekundärantikörper	Art. Nr.	Hersteller
Rabbit Anti-Mouse IgG-HRP		Dianova, Hamburg
Donkey Anti-Goat IgG-HRP	HAF109	R&D Systems, Wiesbaden
Donkey anti-sheep IgG-HRP	HAF016	R&D Systems, Wiesbaden
Alexa Fluor <sub>488</sub> Goat-Anti-Mouse IgG	A-11001	Molecular Probes, Karlsruhe

### 3.1.7 Geräte

Gerät	Hersteller
Begasungsbrutschrank	Forma Scientific/Thermo, Langenselbold
Bio-Rad Mini-Sub <sup>®</sup> Cell GT Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories, München
Bio-Rad Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories, München
Casy <sup>®</sup> 1 Zellzähler	Schärfe System, Reutlingen
DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Elektrophoresekammer Multiphor II	Pharmacia LKB, Freiburg
Färbewanne Automated Gel Stainer Autostainer	Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden
IKA-Schüttler	MTS2 Janke+Kunkel Labortechnik, Staufen
Intas Manuelles Zoom Objektiv	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Intas Multi-Darkbox	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Intas UV-Kasten (Weißlicht und 312 nm UV-Licht)	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Inversmikroskop Axiovert <sup>®</sup> 25	Carl Zeiss AG, Göttingen
Laminar-Air-Flow-Werkbank	Heraeus, Hanau
LAS-3000 CCD Kamera	Fujifilm, Düsseldorf
LAS-3000 Intelligent Dark Box	Fujifilm, Düsseldorf
Microcomputer Electrophoresis Power Supply E752	Renner GmbH, Dannstadt
Opticon DNA Engine	MJ Research, Waltham, MA, USA
Pipette 0.5-10 µl Eppendorf	Eppendorf, wesseling
Pipette 0.5-2.5 µl Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories, München
Polarstar <sup>®</sup> -Galaxy	BMG Lab-Technologies, Offenburg
Sony Intas Video Graphic Printer UP- 890-CE	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Suprasil <sup>®</sup> Quarzglas Präzisionsküvetten	Hellme, Mülheim
UV/VIS-Spektrophotometer Ultrospec <sup>®</sup> 2100 pro	Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Schweden

**3.1.8 Verbrauchs- und sonstiges Arbeitsmaterial**

<b>Name</b>	<b>Art. Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
Casy <sup>®</sup> cups		Schärfe System, Reutlingen
CleanGel DNA-HP 15 % (PAA-Gel)	1001-24	ETC, Kirchentellinsfurt
CleanGel Long-10 (PAA-Gel)	1001-06	ETC, Kirchentellinsfurt
Cryo-Röhrchen Mikro-Schraubröhre 2 ml	72.693.100	Sarstedt, Nümbrecht
Drying Cardboards	1003-18	ETC, Kirchentellinsfurt
Einmalspritzen (10 ml)		Braun, Melsungen
Elektrodenstreifen	1003-16	ETC, Kirchentellinsfurt
Filterspitzen		
2,5 µl Safe Seale Premium Tips	090005	Biozym, Hessisch Oldendorf
0,5 - 10 µl Filter Tips	S1121-4810	Starlab, Ahrensburg
1-100 µl Bevelled Filter Tips	S1120-1840	
Gewebekulturschalen (Ø 100 mm)	664160	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kodak Bio-Max MR Film	895 2855	Kodak über Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Nylon Membran PALL Biodyne PLUS P/N 60406	732-3025	KMF Laborchemie, Stankt Augustin
PCR-Reaktionsgefäße		ABgene, Hamburg
PCR Low Profile Thermo-Strips	AB 0771/W	
PCR Low Profile Thermo-Strips	AB 0700/W	
PCR Ultra Clear Strips	AB 0866	
PCR-Reaktionsgefäße		Biozym, Hessisch Oldendorf
8er Streifen farblos	712050	
8er Streifen weiß	712060	
Deckel ultraklar	712100	
Petrischalen	353003	Becton Dickinson-Falcon, USA
Pipettenspitzen		StarLab, Ahrensburg
0,5-10 ml Natural Pipette Tips	S1111-4000	
101-1000 µl, Natural, Graduated Pipette Tips	S1111-2020	
PP-Reaktionsgefäße		Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
1,5 ml	616201	
2 ml	623201	
PP-Röhrchen (Cellstar <sup>®</sup> )		Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
15 ml	188271	
50 ml	227261	

<b>Name</b>	<b>Art. Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
Sterilfilter (0,2 µm, Celluloseacetat)		Merck, Darmstadt
Zellkulturflaschen Filter Top		Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
T25	690175	
T75	658175	
T175	660175	
Zellkultur Multiwell-Platten		Greiner Bio-One GmbH
6-Well	657160	
24-Well	662160	
96-Well	655180	

## 3.2 Zellkultur

### 3.2.1 Zelllinien und Nährmedien

In dieser Arbeit wurden humane Zelllinien aus verschiedenen Geweben auf ihre differentielle Genexpression untersucht. Bis auf die Zelllinie HEK293 handelt es sich bei den Zelllinien um Tumorzelllinien. Tab. 1 zeigt die untersuchten Zelllinien, die Art der Zelllinien und die verwendeten Nährmedien auf.

**Tab. 1: Untersuchte Zelllinien, Art der Zelllinien und verwendete Nährmedien**

Zelllinie	Ursprung	Nährmedium
1321N1	Astrozytom	DMEM-Medium
2102	Hodenkarzinom	RPMI 1640-Medium
2102KLE	Hodenkarzinom	RPMI 1640-Medium
A2780	Ovarialkarzinom	RPMI 1640-Medium
A2780cis	Ovarialkarzinom	RPMI 1640-Medium
CaCo2	colorektales Adenokarzinom	DMEM-Medium; 20 % FKS
CAL27	squamöszelliges Zungenkarzinom	DMEM-Medium
CAL27res	squamöszelliges Zungenkarzinom	DMEM-Medium
DU145	humanes Prostatakarzinom	RPMI 1640-Medium
HEK293	humane embryonale Niere	DMEM-Medium
HepG2	humanes hepatozelluläres Leberkarzinom	RPMI 1640-Medium
HT29	kolorektales Adenokarzinom	DMEM-Medium
K562	chronische myeloische Leukämie (CML)	RPMI 1640-Medium
KYSE510	squamöszelliges Ösophaguskarzinom	RPMI 1640-Medium
MCF7	Mammakarzinom	DMEM-Medium
NW1539	Melanom	DMEM-Medium
T24	Blasenkarzinom	DMEM-Medium
U937	histiozytäres Lymphom	RPMI 1640-Medium

Die Zelllinien A2780, A2780cis, 1321N1, HT29, U937 wurden von der European Collection of Cell Culture (ECACC, Salisbury, Wiltshire, England) bezogen. Die Zelllinien CAL27, Kyse510, K562, Hek293, HepG2 und CaCo2 stammen von der

Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland). Die Zelllinie CAL27res wurde von Frau Dr. E. Gosepath (Universität Bonn) durch kontinuierliche Behandlung mit Cisplatin aus der parentalen Zelllinie CAL27 generiert. Die Hodenkarzinom-Zelllinien 2102 und 2102KLE wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. Voigt (Universität Halle-Wittenberg) zu Verfügung gestellt. DU145, MCF7 und T24 wurden erhalten von Dr. R. Hartmann (Universität Saarbrücken) und NW1539 stammt von Herrn Prof. G. Bendas (Universität Bonn).

### 3.2.2 Kultivierung

#### Propagieren der Zellen

*Als Zellkultur bezeichnet man das Kultivieren von Zellen höherer eukaryotischer Lebewesen. Um die Kontamination mit Bakterien und Viren zu vermeiden muss in einer keimfreien Umgebung unter einer Sicherheitswerkbank (Laminar Air Flow) gearbeitet werden. Damit für die eukaryotischen Zellen optimale physiologische Bedingungen eingehalten werden können, werden sie bei 37 °C und einem pH-Wert von 7,2-7,4 kultiviert. Der pH-Wert wird durch das Puffersystem von im Nährmedium (NM) enthaltenem Bicarbonat, und dem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % im Brutschrank konstant gehalten.*

Erreichten die Zellen in der Zellkulturschale eine Konfluenz von ca. 80 % wurden sie passagiert. Das Nährmedium wurde abgesaugt und durch 2maliges spülen mit 2 ml 1X PBS-Puffer vollständig entfernt. Dann wurden die Zellen zunächst mit Trysin-EDTA (2 ml/T75-Schale) für ca. 2 min inkubiert, bis sie sich vom Boden der Schale lösten. Durch Zugabe von 8 ml NM wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette vom Boden vollständig ab gespült. Die abgelösten Zellen wurden in ein 15-ml-PP-Röhrchen überführt und zentrifugiert (4 min, 4 °C, 266 g). Die überstehende Flüssigkeit wurde abgesaugt und das Zellpellet in NM resuspendiert. Ein entsprechender Anteil der Zellsuspension wurde dann zusammen mit 20 ml NM in die Zellkulturschale zurückgegeben.



### **Langzeitlagerung**

Eine ca. 80-90 % konfluente Zellkulturschale (T175) wurde nach zweimaligem Spülen mit je 2 ml 1X PBS-Puffer trypsiniert, die Zellen dann zentrifugiert und in 2,7 ml NM resuspendiert. Davon wurden in jedes Kryo-Röhrchen 0,9 ml pipettiert und mit 10 % DMSO versetzt. Zunächst wurden die Zellen bei -80 °C eingefroren und zur Langzeitlagerung nach einem Monat in einen Flüssigstickstofftank (-196 °C) überführt.

### **Auftauen der Zellen**

Die in den Kryo-Röhrchen eingefrorenen Zellen aus dem Flüssigstickstofftank wurden sofort in einem auf 37 °C aufgeheiztem Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in eine T75 Zellkulturschale gegeben und diese mit 20 ml NM gefüllt.

### **3.2.3 Bestimmung der Zellzahl**

Der CASY<sup>®</sup>-Zellzähler ermöglicht die Bestimmung von Zellzahl, mittlerem Zelldurchmesser und mittlerem Zellvolumen. Er beruht auf der Methode des Coulter-Counters und arbeitet also mit der Widerstandsmesstechnik. Zur Zellzahlbestimmung wurden 20 µl Zellsuspension in 10 ml sterilfiltrierte Casy<sup>®</sup>ton-Lösung gegeben und im CASY<sup>®</sup>-Zellzähler vermessen.

### **3.2.4 Cisplatin-Inkubation der Zelllinien**

#### **Aufrechterhaltung der Cisplatin-Resistenz**

Zur Aufrechterhaltung der Resistenz gegenüber Cisplatin wurde die Zelllinie A2780cis alle 3-4 Passagen mit 5 µM Cisplatin inkubiert. Das Cisplatin wurde nach dem Passagieren der Zellen für 24 h zu dem NM dazugegeben und mit dem nächsten Wechsel des NM entfernt. Vor der Zugabe des neuen NM wurden die Zellen 2-mal mit 1X PBS-Puffer gewaschen, um das Cisplatin komplett zu entfernen.

## SSH

Vor der SSH-Analyse wurden die Zelllinien A2780 und A2780cis mit 10  $\mu\text{M}$  Cisplatin für 24 h inkubiert. Nach einer Auswaschphase von 0,5 h erfolgte die Isolierung der totalRNA wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben.

## Differentielle Genexpressionsanalyse in 18 Zelllinien

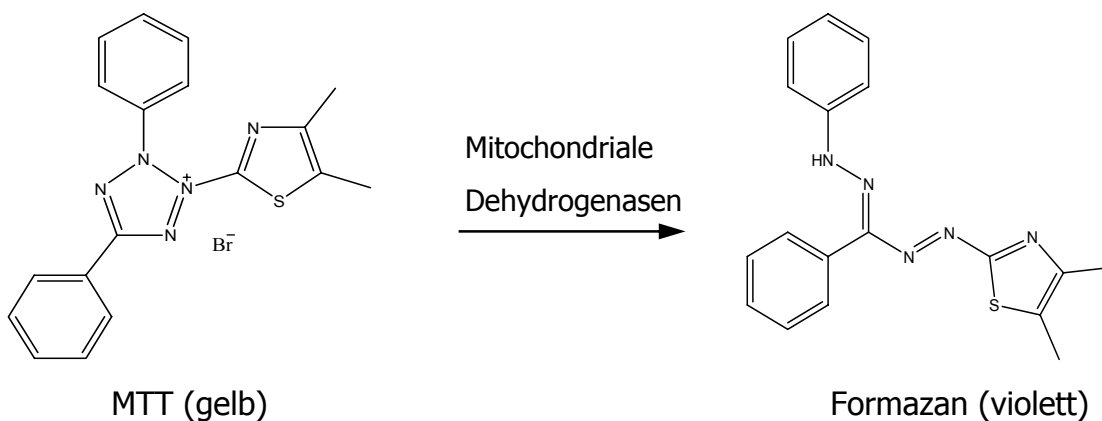
Vor der Untersuchung der differentiellen Genexpression mittels qRT-PCR der in Tab. 1 aufgeführten Zelllinien wurden diese mit Cisplatin inkubiert. Einen Tag vor der Inkubation wurden die Zelllinien in je zwei T25-Zellkulturflaschen pro Zelllinie ausgesät. Am Tag des Versuchsstarts wurde in je einer Zellkulturflasche je Zelllinie dem neuen NM Cisplatin zugefügt. Die Cisplatinkonzentrationen, mit denen inkubiert wurde, sind in Tab. 2 aufgelistet. Sie entsprechen der jeweiligen 1-2,5fachen  $\text{IC}_{50}$  der Zelllinien (bis auf HEK293; 4fache  $\text{IC}_{50}$ ). Die  $\text{IC}_{50}$  ist anhand vorhergehender Experimente ermittelt worden (s. Kapitel 3.3.2 und 4.3.1) Die jeweilige unbehandelte Kontrolle erhielt ebenfalls neues NM. Die Inkubation mit Cisplatin wurde für 24 h durchgeführt und anschließend eine Cisplatin-freie Auswaschphase von 48 h eingehalten, bevor die totalRNA isoliert wurde (s. Kapitel 3.5.1).

**Tab. 2: Cisplatinkonzentrationen [ $\mu\text{M}$ ], mit denen die Zelllinien für 24 h inkubiert wurden.**

Zelllinie	Cisplatin [ $\mu\text{M}$ ]	Zelllinie	Cisplatin [ $\mu\text{M}$ ]
1321N1	2,8	2102	5,0
KYSE510	2,5	T24	12,0
HEK293	8,0	MCF7	8,0
CAL27	4,0	1539	15,0
A2780	5,0	A2780cis	20,0
DU145	4,0	K562	9,0
HepG2	5,0	HT29	30,0
U937	4,0	CaCo2	25,0
2102KLE	6,0	CAL27res	40,0

### 3.3 MTT-Test

Der MTT-Test dient der Bestimmung der Aktivität einer zytotoxischen Verbindung gegenüber lebenden Zellen. Er liefert eine Aussage über die Stoffwechselaktivität bzw. Vitalität noch lebender Zellen und ermöglicht die Ermittlung des  $IC_{50}$ -Wertes ( $IC_{50}$  = Inhibitory Concentration; 50 %) [77]. Der  $IC_{50}$ -Wert ist die Konzentration eines Zytostatikums, bei der noch 50 % der Zellen Dehydrogenaseaktivität besitzen. Er wurde zur Bestimmung der Cisplatin-Sensitivität der verwendeten Zelllinien eingesetzt. Das Reagenz MTT (3-(4,4-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) wird durch die zellulären mitochondrialen Dehydrogenasen zu einem violetten Formazan-Produkt umgesetzt (Abb. 7). Mit Zunahme der Cisplatinkonzentration entsteht weniger violetter Farbstoff, da die Anzahl noch lebender Zellen abnimmt.



**Abb. 7: Reduktion des MTT zu Formazan.**

#### 3.3.1 Ermittlung der optimalen Zellzahl für den MTT-Test

Für die Ausführung der MTT-Tests in 96-Well-Platten wurde zunächst für jede Zelllinie die optimale Zellzahl bestimmt. Dafür wurden zwischen 1000 und 10000 Zellen in ein Well einer 96-Well-Platte ausgesät und ihr Wachstum über den MTT-Test-Zeitraum von 72 h beobachtet. Die Dichte der Bewachung eines Wells (Konfluenz) wurde optisch mit Hilfe eines Mikroskops (Inversmikroskop Axiovert<sup>®</sup> 25) ausgewertet. Es wurde diejenige Zellzahl als optimal betrachtet, die nach 72 h zu einer Konfluenz des Wells von 80-90 % führte.

### 3.3.2 Durchführung des MTT-Tests

Die Zellen wurden trypsiniert, zentrifugiert und in NM resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zellzahlbestimmung mit dem CASY<sup>®</sup>-Zellzähler. Die Zellen wurden je nach Art der Zelllinie in der vorher ermittelten optimalen Zellzahl in eine 96-Well-Platte mit jeweils 90 µl NM ausgesät. Nach dem Anwachsen der Zellen (ca. 4 h) wurden sie mit je 10 µl neun unterschiedlicher Cisplatinverdünnungen im Bereich von 3,16 nM bis 0,316 mM (Endkonzentration) behandelt. Je drei Wells wurden mit der gleichen Konzentration inkubiert, die äußere Reihe der Platte wurde jeweils ausgespart. Die Zellen für den unbehandelten Referenzwert wurden mit 10 µl einer 0,9%igen NaCl-Lösung versetzt. Nach 71 h erfolgte die Zugabe von 20 µl MTT-Lösung je Well (5 mg MTT/ml in PBS Puffer). Die Inkubationsdauer betrug 45 - 60 min, bis Formazankristallnadeln mikroskopisch sichtbar wurden. Zum Abstoppen der Reaktion und zur Lyse der Zellen und Formazannadeln wurden dann 150 µl MTT-Lyse-Lösung pro Well hinzugegeben. Die Solubilisierung der Nadeln erfolgte bei 4 - 8 °C für 1 - 2 h. Die photometrische Absorptionsmessung erfolgte in einem Mikroplatten-Leser (Polarstar<sup>®</sup>-Galaxy) bei 595 nm und 690 nm. Die Absorption bei 690 nm dient zur Hintergrundbestimmung und wird von dem Absorptionswert des Formazans bei 595 nm abgezogen. Bei 690 nm wird die Absorption der vorhandenen Zelltrümmer und Proteine erfasst. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism<sup>®</sup> Version 4.0 für Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Zur Ermittlung der IC<sub>50</sub>-Werte wurde eine nichtlineare Kurvenanpassung (sigmoidale Konzentrations-Wirkungskurve) mit variabler Steigung nach der Hill-Gleichung (s. Formel 1) durchgeführt.

#### Formel 1

$$Y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{(\log \text{IC}_{50} - X) \text{Hill-Steigung}}}$$

Bottom = geringster y-Wert

Top = höchster y-Wert

Hill-Steigung = Steigung im Wendepunkt der Kurve

IC<sub>50</sub> = Wirkstoff-Konzentration, bei der 50 % des maximalen Effektes auftritt

X = log [Cisplatin], M

### 3.3.3 Ermittlung des Cisplatin-Resistenzgrades einer Zelllinie

Der Resistenzfaktor (RF) gibt an, um welchen Faktor eine Subzelllinie mehr Cisplatin toleriert als die native (sensitive) Ursprungszelllinie. Er ergibt sich aus dem Quotienten der beiden  $IC_{50}$ -Werte der Zelllinien nach Formel 2.

**Formel 2**

$$\text{Resistenzfaktor} = \frac{IC_{50}(\text{resistente Zelllinie})}{IC_{50}(\text{sensitive Zelllinie})}$$

Die Signifikanz des RF wurde mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test ermittelt. In die Berechnung gingen die  $pIC_{50}$ -Werte, die SD der  $pIC_{50}$ -Werte und die Anzahl der Experimente mit ein.

## 3.4 BrdU-Test

*Der BrdU-Test ist ein nicht-radioaktiver Test zur Bestimmung der Proliferationsrate von Zellen. Dabei wird das Thymidinanalogon BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) während der DNA-Synthese an Stelle von Thymidin in die DNA eingebaut und kann anschließend mittels eines spezifischen Antikörpers erkannt werden. Die Umsetzung eines Substrates (TMB; 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) durch an den Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP = Horseradish Peroxidase) kann anschließend detektiert und quantifiziert werden. Die Menge des gebildeten Farbstoffes ist proportional zu den inkorporierten BrdU-Basen.*

Für die Durchführung des BrdU-Tests wurde das Zell-Proliferations-ELISA BrdU Kit der Firma Roche Diagnostics GmbH verwendet.

Es wurden zwischen 6000 und 9000 Zellen/Well einer 96-Well-Platte am Vortag des Versuches ausgesät und mit 90  $\mu$ l NM je Well versetzt. Am 1. Versuchstag wurde das NM erneuert und die Zellen wurden mit verschiedenen Cisplatinkonzentrationen im Bereich von 3,16 nM bis 0,316 mM für 72 h inkubiert. Nach 70 h wurden 10  $\mu$ l/Well BrdU-Markierungsreagenz hinzugegeben und für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Entfernen des NM durch vorsichtiges Ausschlagen wurden die Zellen an

der Plattenoberfläche fixiert durch Inkubation mit 150 µl der FixDenat-Lösung für 30 min bei RT. Es folgte dann die Inkubation mit dem Anti-BrdU-POD-Antikörper für 90 min bei RT. Anschließend wurde gründlich mit 3 mal 170 µl Waschpuffer je Well gewaschen und nach Zugabe von 100 µl TMB-Substratlösung bis zu einer deutlichen Blaufärbung detektiert (5-30 min). Die Farbentwicklung wurde durch Zugabe von 30 µl Stopp-Lösung (1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) beendet und nach gutem Mischen wurde die Absorption des entstanden Farbestoffes bei 450 nm (690 nm Referenzwellenlänge) in einem Mikroplatten-Leser (Polarstar<sup>®</sup>-Galaxy) gemessen.

## 3.5 RNA Isolierung

### 3.5.1 Isolierung der totalRNA

*Die Isolierung der totalRNA mit TRI<sup>®</sup>-Reagenz ist eine Erweiterung der Ein-Schritt-Methode von Chomczynski und Sacchi [78]. Das Reagenz ermöglicht die simultane Isolierung von DNA, RNA und Proteinen. Zunächst wird das Zellmaterial mit der einphasigen Lösung aus Guanidinthiocyanat und Phenol (TRI<sup>®</sup>-Reagenz) gelöst und lysiert. Nach der Zugabe von Chloroform und einer Zentrifugation trennt sich das Gemisch in drei Phasen: eine wässrige RNA-haltige obere Phase, eine DNA-haltige Interphase und eine organische untere Phase, in der die Proteine zu finden sind. Die gewünschte Phase kann nun isoliert und das Produkt (z.B. RNA) gefällt werden.*

Eine ca. 80-90 % konfluente T25 Zellkulturschale (ca. 5-10 x 10<sup>6</sup> Zellen) wurde mit 1 ml eiskaltem 1X PBS-Puffer gewaschen und sofort mit 1 ml TRI<sup>®</sup>-Reagenz versetzt. Mit dem Zellschaber wurden die Zellen gelöst, mit der Pipette mehrmals auf- und abpipettiert, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei RT inkubiert. Pro 1 ml TRI<sup>®</sup>-Reagenz wurden dann 0,2 ml Chloroform hinzugegeben und 15 sec auf dem Schüttelmischer gemischt. Es folgte eine Inkubation bei RT für 10 min. Zur Trennung der Phasen wurde der Ansatz bei 4 °C und 14000 g für 10 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde dann vorsichtig in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 0,5 ml Isopropanol hinzugegeben. Nach kurzem Mischen wurde erneut zentrifugiert (4 °C, 14000 g, 20 min). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet mit 1 ml 75%igem EtOH gewaschen und erneut

zentrifugiert (4 °C, 14000 g, 10 min). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, evtl. vorhandene Tropfen an der Gefäßwand und am Pellet vorsichtig mit einer Pipettenspitze entfernt (Kapillareffekt) und das Pellet an der Luft angetrocknet. Das angetrocknete Pellet (gallertartig) wurde in 50-100 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

### 3.5.2 Isolierung der mRNA

*Die mRNA-Proben für die SSH wurden mit dem GenElute™ mRNA Miniprep Kit der Firma Sigma aus der vorher gewonnenen totalRNA (s. 3.5.1) isoliert. Die Trennsäulen sind mit Oligo-dT Polystyren-Kügelchen gefüllt, welche eine Bindung des Poly-A<sup>+</sup>-Endes der mRNA ermöglicht. Mit einem speziellen Puffer kann die mRNA anschließend eluiert werden.*

120 µl Elutionslösung pro Ansatz wurden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß in einem Heizblock auf 70 °C aufgewärmt. Die Oligo-dT-Polystyren-Kügelchen wurden auf RT gebracht. Je totalRNA-Ansatz wurden 400 µg totalRNA in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit RNase-freiem Wasser zu 250 µl ergänzt. Nach der Zugabe von 250 µl 2X Bindelösung wurde der Ansatz kurz auf dem Schüttelmischer gemischt. Anschließend wurden 15 µl Oligo-dT-Polystyren-Kügelchen hinzugegeben und gut gemischt. Zur Denaturierung der RNA wurde sie für 3 min auf 70 °C erhitzt. Dann wurde der Ansatz für 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 2 min bei 16000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl Waschlösung aufgenommen, gemischt und auf die GenElute Säule gegeben. Die Säule wurde für 1-2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Durchfluss anschließend verworfen. Der Waschschrift wurde wiederholt. Zur Elution der mRNA wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß gesetzt und 50 µl der auf 70 °C erhitzten Elutionslösung auf die Säule gegeben. Dann wurde für 2-5 min bei 70 °C inkubiert und anschließend für 1 min bei 16000 g zentrifugiert. Dieser Elutionsschritt wurde wiederholt. Die gewonnene mRNA wurde bei -70 °C gelagert.

## 3.6 Gelelektrophorese

*Die Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung und Identifizierung von Nukleinsäuren und Proteinen. Sie beruht auf der Wanderung von geladenen Molekülen im elektrischen Feld. Die negativ geladenen Nukleinsäuren DNA und RNA wandern also gemäß ihrer Größe, Ladung und Konformation unterschiedlich schnell zur Anode. Mit einem entsprechenden Referenz-Größenmarker können die erhaltenen einzelnen DNA/RNA Banden zugeordnet und identifiziert werden.*

### 3.6.1 DNA-Agarose-Gel

Ein 2 %iges Agarose-Gel wurde durch Aufkochen der Agarose in 1X TAE-Puffer gelöst. Unter ständigem Rühren wurde die Lösung auf ca. 50-60 °C abgekühlt und in die Gelform gegossen. Nach dem Abkühlen wurde das Gel in die mit 1X TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (Bio-Rad Mini-Sub<sup>®</sup> Cell GT Elektrophoresekammer) gelegt. Zu einem 10 µl PCR-DNA-Ansatz wurden 2 µl der 6X Loading Dye-Lösung und 1 µl der 1:100 SYBRGreen<sup>®</sup> II-Lösung pipettiert. Von dieser Mischung wurden 10 µl in die Geltaschen geladen. Als Referenz dienten 4 µl einer entsprechend DNA-Leiter (GeneRuler<sup>™</sup>), versetzt mit 1 µl SYBRGreen<sup>®</sup> II-Lösung. Anschließend wurde das Gel bei 80 V für 35 min laufen gelassen. Zur Detektion wurde das Gel auf eine UV-Lampe (Intas UV-Kasten mit 312 nm UV-Licht in Intas Multi-Darkbox) gelegt und somit der SYBRGreen<sup>®</sup> II-Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt.

### 3.6.2 RNA-Agarose-Gel

*Zur Untersuchung der RNA Proben auf Reinheit und Intaktheit wurde eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Zugabe von Formaldehyd zu den Proben und in das Gel stört die Ausbildung von Sekundärstrukturen der RNA-Moleküle, die die Wanderung im elektrischen Feld verändern würden. Alle Lösungen, mit denen die RNA-Probe während der Analyse in Berührung kommen, werden mit nukleasefreiem DEPC-Wasser durchgeführt. Ebenso werden nur nukleasefreie Gebrauchsmaterialien verwendet. So wird ein Abbau der empfindlichen RNA durch Ribonukleasen unterbunden.*



Für das 1,2%ige RNA-Agarose-Gel wurde Agarose mit DEPC-Wasser durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Unter ständigem Rühren wurde die Lösung auf ca. 50-60 °C abgekühlt und 5 ml 10X Hepes-Puffer, sowie 0,9 ml 37%iger Formaldehyd zugegeben. Nach dem Mischen wurde die noch flüssige Agarose ohne Blasenbildung in die Gelform gegossen. Das erstarrte Gel wurde in die mit 1X Hepes-Laufpuffer gefüllte Gelkammer (Bio-Rad Mini-Sub<sup>®</sup> Cell GT Elektrophoresekammer) gesetzt und der Puffer ergänzt, bis das Gel vollständig bedeckt war. Während das Gel erstarrte, wurden die Proben vorbereitet. Dafür wurden 2 µg RNA mit DEPC-Wasser auf 4 µl aufgefüllt, 4 µl 2X RNA-Loading-Dye-Lösung hinzugegeben und für 10 min auf 70 °C erhitzt. 2 µl der RNA-Leiter wurden ebenfalls 1:1 mit dem 2X RNA-Loading-Dye-Lösung gemischt und erhitzt. Danach wurden die Proben bis zum Laden in die Geltaschen sofort auf Eis gelagert. Das Gel wurde anschließend für 5 min bei 180 V und dann für 10 min bei 140 V entwickelt. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht wie in dem Kapitel 3.6.1 beschrieben.

### **3.6.3 DNA-Polyacrylamid-Gel**

#### **DNA-Polyacrylamid-Gel zur Kontrolle des RsaI-Verdaus**

Das DNA-Gel (PAA Gel, CleanGel DNA-HP 15 %) wurde 1,5 h in Rehydratisierungspuffer auf dem IKA-Schüttler quellen gelassen. Ebenso wurden 6 Elektrodenstreifen mit je 10 ml Rehydratisierungspuffer getränkt. Nach dem Quellen wurde das Gel vorsichtig mit dem Filterpapier obenauf und an den Rändern getrocknet. Zur Benetzung wurden 2 ml Petroleumbenzin auf die Elektrophoreseplatte (Elektrophoresekammer Multiphoer II) gegeben. 0,5 µl der 100 bp DNA-Leiter (Biolabs) wurden mit je 6 µl sterilem Wasser verdünnt und in eine äußere Geltasche geladen. Von der unverdauten cDNA wurden jeweils 2,5 µl und von der verdauten cDNA 5,0 µl aufgetragen. Nach dem Platzieren der benetzten Elektrodenstreifen auf das Gel und dem Auflegen der Elektroden wurde die Gelelektrophorese nach den Bedingungen in Tab. 3 durchgeführt.

**Tab. 3: Bedingungen für die Gelelektrophorese mit dem PAA-Gel CleanGel DNA-HP 15% zur Kontrolle des RsaI-Verdaus.**

Spannung [V]	Stromstärke [mA]	Zeit [min]
250	22	20
425	30	50
525	30	20

### **DNA-Polyacrylamid-LongRun-Gel**

Das DNA-Polyacrylamid-LongRun-Gel (PAA Gel, CleanGel Long-10) wurde 1,5 h in 40 ml DNA-LongRun-Puffer auf dem IKA-Schüttler quellen gelassen. Ebenso wurden 6 Elektrodenstreifen mit je 10 ml DNA-LongRun-Puffer getränkt. Nach dem Quellen wurde das Gel vorsichtig mit dem Filterpapier obenauf und an den Rändern getrocknet. Zur Benetzung wurden 2 ml Petroleumbenzin auf die Elektrophoreseplatte (Elektrophoresekammer Multiphoer II) gegeben. 5,0 µl der 100 bp DNA-Leiter (Biolabs) wurden mit je 6 µl sterilem Wasser verdünnt. Je 8 µl der Proben und des Standards wurden auf das Gel geladen. Nach dem Laden des Gels wurden die Elektrodenkontaktstreifen auf die Enden des Gels gelegt, die Elektroden aufgesetzt und angeschlossen (Microcomputer Electrophoresis Power Supply E752). Die Elektrophorese wurde anschließend nach den in Tab. 4 aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

**Tab. 4: Bedingungen für die Elektrophorese mit dem PAA-LongRun-Gel.**

Spannung [V]	Stromstärke [mA]	Zeit [min]
150	15	30
400	31	10
500	25	45
800	28	140

Anschließend erfolgte die Detektion mittels einer Silberfärbung. Die Silberfärbung ist im Kapitel 3.6.4 (Silberfärbung) beschrieben.

### 3.6.4 Silberfärbung

Die Silberfärbung erfolgte in einer Färbewanne, an die eine Pumpe und eine Absaugvorrichtung angeschlossen waren (Automated Gel Stainer Autostainer, Amersham Pharmacia Biotech). Das Zugeben und Absaugen der einzelnen Lösungen wurde nach vorangegangener Programmierung entsprechend dem Protokoll der Firma ETC Elektrophorese-Technik automatisch durchgeführt (s. Tab. 5).

**Tab. 5: Protokoll der Silberfärbung.**

Schritt	Lösung	Volumen [ml]	Zeit [min]
Fixieren	Fixierlösung	250	45
Waschen	Reinstwasser	3 mal 250	3 mal 15
Färben	Silberlösung	200	45
Waschen	Reinstwasser	100	0,5
Entwickeln	Entwicklungslösung	200	5
Entwicklungsstopp	Stopplösung	250	20
Imprägnieren	Imprägnierlösung	200	30
Waschen	Reinstwasser	100	1

Das Gel wurde anschließend über Nacht bei RT getrocknet.

## 3.7 Quantifizierung von Nukleinsäuren

### 3.7.1 Quantifizierung von RNA und DNA mittels UV-Spektroskopie

Die Quantifizierung von RNA und DNA erfolgte in einem UV/Vis-Spektrophotometer (Ultrospect<sup>®</sup> 2100 pro) bei 260 nm in Quarzküvetten (Suprasil<sup>®</sup>). Um in einem Absorptionsbereich von 0,15 bis 1,0 messen zu können, wurden die RNA/DNA Proben mit 1X TE-Puffer zwischen 1:100 und 1:33,3 verdünnt. Um eine Aussage über die Reinheit der RNA/DNA-Proben zu erhalten, wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen. Sie liefert eine Aussage über das Vorhandensein von UV-absorbierenden Substanzen in diesem Bereich, wie z. B von Proteinen. Das Verhältnis von  $A_{260}/A_{280}$  sollte bei einem neutralen pH-Wert von 7,5 zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Die Konzentration der RNA/DNA-Probe errechnet sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz nach der Formel 3.

**Formel 3**  $A_{260} \times K \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g Nukleinsäure/ml}$  [79]

K = Konstante, die den Absorptionskoeffizienten von RNA bzw. DNA und die Schichtdicke der Küvette (1 cm) enthält

$K_{\text{RNA}} = 40$ ;  $K_{\text{DNA}} = 50$

### 3.7.2 Quantifizierung von dsDNA mit PicoGreen®

*Die Quantifizierung der DNA erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen® der Firma Molecular Probes. Durch die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes an Nukleinsäuren wird seine Fluoreszenz um ein Vielfaches verstärkt. Es handelt sich um einen sehr sensitiven Farbstoff, der es ermöglicht, bis zu 1 ng/ml DNA zu detektieren.*

Zunächst wurde der 20X TE-Puffer 20fach mit Ampuwa-Wasser zu einer 1X Arbeitslösung verdünnt. Für eine Bestimmung in höherem Konzentrationsbereich (20 ng/ml - 1 µg/ml) wurde die PicoGreen®-Stammlösung anschließend 200fach mit 1X TE-Puffer verdünnt, für eine Bestimmung in niedrigerem Konzentrationsbereich (1-50 ng/ml) wurde die PicoGreen®-Stammlösung anschließend 2000fach mit 1X TE-Puffer verdünnt. Sowohl die PicoGreen®-Stammlösung, als auch die Verdünnungen wurden unter Lichtausschluss aufbewahrt. Die Herstellung einer λ-DNA-Standardlösung in 1X TE erfolgte durch 50fache Verdünnung des λ-DNA-Standards für den hohen Konzentrationsbereich (2 µg/ml), oder einer 200fachen Verdünnung für den niedrigen Konzentrationsbereich (50 ng/ml). Mit dem verdünnten λ-DNA-Standard wurde eine fünf Punkte umfassende Standardkurve in den Konzentrationsbereichen 2 ng bis 2 µg (hoher Konzentrationsbereich) bzw. 50 pg bis 50 ng (niedriger Konzentrationsbereich) durch Verdünnung mit 1X TE-Puffer erstellt. Der Kontrollwert enthielt nur 1X TE-Puffer. Jeweils 100 µl dieser Stammlösungen wurden in Duplikaten in ein Well einer 96-Well-Platte vorgelegt, ebenso 100 µl der zu untersuchenden DNA-Lösung. Anschließend wurden jeweils 100 µl der entsprechenden PicoGreen®-Verdünnung zugegeben und unter Lichtausschluss 2 – 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz im Mikroplattenleser (PolarStar® Galaxy) bei einer Excitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm vermessen. Nach dem Abzug der Fluoreszenz-

leerwerte konnte mittels linearer Regression der Standardwerte die Konzentration der Proben ermittelt werden.

### 3.8 Alkoholfällung von Nukleinsäuren

Zu einem Teil DNA-Lösung wurde ein Teil Natriumacetat-Puffer und 30 Teile eiskalter 95%iger Ethanol gegeben, und dieser Ansatz wurde für mindestens 1 h bei -80 °C gelagert. Dann folgte eine Zentrifugation der Präzipitate für 20 min bei 12000 g und 4 °C. Die Pellets wurden nach der Abnahme des Überstandes mit je 200 µl 85%igem Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet.

### 3.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

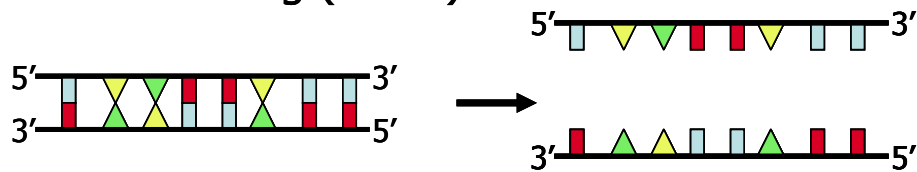
*Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur in-vitro-Vervielfältigung von DNA, die 1985 von Karry Mullis entwickelt wurde [80]. Die PCR-Reaktion verläuft zyklisch, wobei sich ein Zyklus in drei Abschnitte einteilen lässt: 1. Denaturierung, 2. Annealing und 3. Elongation (s. Abb. 8).*

*Während der Denaturierung, die bei 94 °C durchgeführt wird, trennen sich die beiden Stränge der cDNA. Für die Hybridisierung (Annealing) von kurzen Oligonukleotiden, den Primern, wird die Temperatur auf 50-60 °C abgesenkt. Die Primer sind jeweils komplementär zu dem einen Ende des (+)-Stranges bzw. dem anderen Ende des (-)-Stranges der zu amplifizierenden DNA-Region. Anschließend erfolgt bei ca. 72 °C die Verlängerung der kurzen Primer-DNA durch das Enzym DNA-Polymerase anhand der cDNA-Einzelstrangmatrize (Elongation). Da die Amplifikation an beiden Strängen der Ausgangs-cDNA stattfindet, kommt es innerhalb eines Zyklus zu einer Verdopplung der cDNA-Menge.*

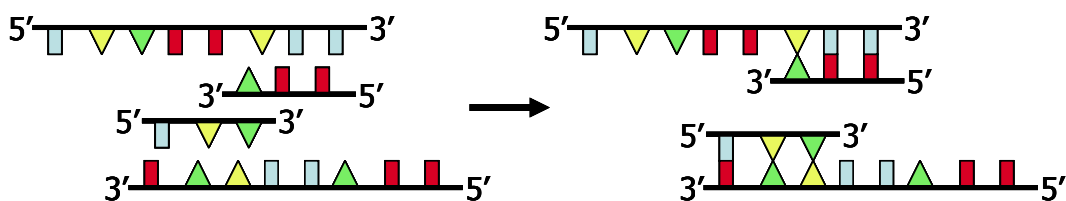
*Eine PCR-Reaktion umfasst üblicherweise 35 - 40 Zyklen. Sie ist natürlich limitiert durch die Menge an noch zur Verfügung stehenden Primern und Nukleotiden. Des Weiteren nehmen die Stabilität und damit auch die Effektivität der Polymerase durch das ständige Aufheizen ab. Ein weiterer Grund für die Abnahme der Effizienz der PCR-Reaktion bei höheren Zyklen ist die Hemmung der Reaktion durch die entstandenen Produkte und Pyrophosphate. Die Amplifikationsprodukte hybridisieren*

in verstärktem Maße mit sich selber und nicht mit den Primern. Aus diesem Grunde ist eine quantitative Aussage nur bis zu einem Zyklus von 30 bis 35 aussagekräftig.

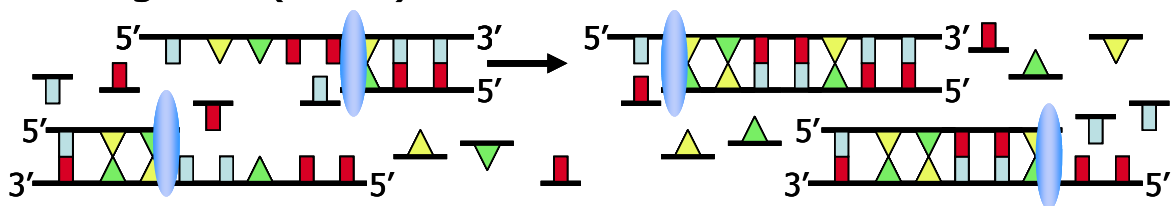
### 1. Denaturierung (94 °C)



### 2. Annealing (50-60 °C)



### 3. Elongation (72 °C)



**Abb. 8: Das Prinzip der PCR-Reaktion.**

Durch die Entdeckung thermostabiler Polymerasen konnte die PCR-Reaktion stark vereinfacht und automatisiert werden. Musste ursprünglich nach jedem Aufheizen neues Enzym zu der Reaktion hinzu gegeben werden, können nun alle Zyklen ohne Unterbrechung hintereinander ablaufen. Die erste thermostabile Polymerase wurde aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermophilus aquaticus*, welches in ca. 70 °C heißen Quellen lebt, gewonnen. Entsprechend ihrer Herkunft trägt sie den Namen Taq-Polymerase. Die Taq-Polymerase besitzt neben der 5'-3'-Polymeraseaktivität auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Sie ist also auch in der Lage, Nukleotide, die ihr während ihrer 5'-3'-Synthese im Wege sind, abzubauen. Allerdings besitzt sie keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, das so genannte Proofreading, welche eine Korrektur fehlerhaft eingebauter Basen ermöglicht. Enzyme mit dieser zusätzlichen Funktion

sind z. B. die Pfu-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*) und die Pwo-Polymerase (aus *Pyrococcus woesei*). Ein großer Nachteil dieser beiden Enzyme ist ihre geringe Prozessivität. Unter der Prozessivität versteht man die durchschnittliche Anzahl an Nukleotiden, die ein Enzym in die DNA einbaut, bevor es wieder von der Matrize abdissoziiert. Dadurch ergibt sich eine relativ langsame DNA-Syntheserate. Aufgrund ihrer hohen Prozessivität ist die Taq-Polymerase auch heute noch eine der am häufigsten eingesetzten DNA-Polymerasen. Eine weitere DNA-Polymerase ist die Tth-Polymerase (aus *Thermus thermophilus*), die sich durch eine zusätzliche Reverse-Transkriptase-Aktivität auszeichnet [81;82]. Die Eigenschaften der thermostabilen DNA-Polymerasen sind in Tab. 6 zusammengefasst [83;84].

**Tab. 6: Eigenschaften thermostabiler DNA-Polymerasen nach C. Mülhardt [81].**

	Taq	Pfu/Pwo	Tth
5'-3'-Polymeraseaktivität	+	+	+
5'-3'-Exonukleaseaktivität	+	+	+
3'-5'-Exonukleaseaktivität (Proofreading)	-	+	-
Reverse-Transkriptase-Aktivität	-	+	-
Prozessivität	hoch	gering	hoch
Ungefähre Fehlerhäufigkeit je eingebauter Base	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$

### 3.9.1 Reverse Transkription (RT)

Bei der Reversen Transkription (RT) wird ausgehend von einem RNA-Template cDNA (complementary DNA) synthetisiert. Dies geschieht durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT), welches RNA als Matrize benötigt und komplementär dNTP-Bausteine zu einem cDNA-Strang zusammensetzt. Reverse Transkriptasen sind also RNA-abhängige DNA-Polymerasen. Hauptsächlich Verwendung finden zwei Reverse Transkriptasen aus zwei verschiedenen Viren: Die RT aus dem Avian myoblastosis virus (AMV-RT) und die RT aus dem Moloney murine leukemia virus (MMLV-RT). Als Angriffspunkt für die Polymerase dienen entweder Oligo-dT-Primer oder so genannte Random-Primer. Oligo-dT-Primer bestehen aus 16-20 Thymidinbasen und sind somit komplementär zum Poly-A<sup>+</sup>-Ende von mRNAs. Theoretisch kann man mit ihnen die komplette cDNA vom Poly-A<sup>+</sup>-Ende der mRNA bis zum 5'-Ende synthetisieren.

*Allerdings brechen die meisten RTs die Synthese früher ab. Eine andere Möglichkeit besteht in der Nutzung von „Zufalls-Primern“ (Random-Hexameren oder -Nonameren), die irgendwo an die mRNA hybridisieren, so dass alle mRNA-Bereiche nach der Synthese vorhanden sind. Ein Nachteil besteht darin, dass sie nicht spezifisch nur an mRNAs binden [81].*

Die Reverse Transkription wurde mit dem „High capacity cDNA archive“ Kit der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde von 100 µl auf 20 µl reduziert und statt der im Kit vorhandenen Random-Primer wurden Oligo-dT-Primer verwendet. Pro Reaktion wurden 2 µg totalRNA eingesetzt. Es wurde folgender Ansatz aus Tab. 7 auf Eis zusammenpipettiert.

**Tab. 7: Ansatz der Reversen Transkription.**

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
10X Reverse Transkriptase Puffer	2 µl	1X
25X dNTPs	0,8 µl	1X
Oligo-dT-Primer (Fermentas, St. Leon-Rot)	1 µl	0,025 µg/µl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase [50 U/µl]	1 µl	2,5 U/µl
totalRNA-Probe	2 µg	0,1 µg/µl
Nukleasefreies Wasser (Ampuwa)	ad 20 µl	-

Der Ansatz wurde im Opticon Thermocycler bei 37 °C für 120 min inkubiert. Anschließend wurden die cDNA Proben 1:4 mit 1X TE-Puffer, pH 7,5 verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei 2 bis 6 °C.

### **3.9.2 Primer**

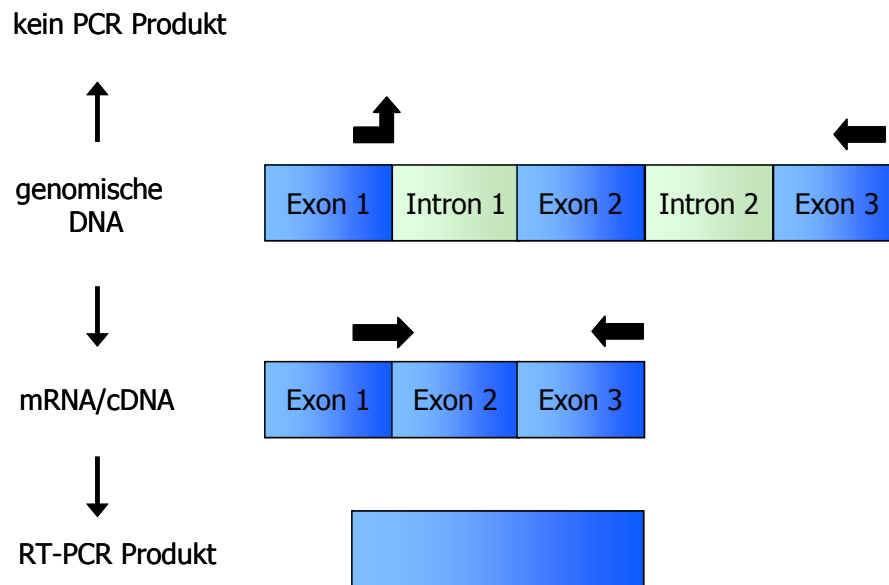
*Primer für die PCR sind Oligonukleotide mit einer Länge von 16-30 Basen, welche der DNA-Polymerase als Angriffspunkt dienen. Sie sind komplementär zu einem Abschnitt auf der Template-cDNA und linker und rechter Primer begrenzen den zu amplifizierenden Teilbereich eines Gens. Damit die PCR-Reaktion optimal ablaufen kann, sind bei dem Design von PCR-Primern einige Kriterien zu beachten. Die Primer sollten einen Gehalt von Guanin- und Cytosin-Basen (G/C-Gehalt) zwischen 40 bis*



*60 % besitzen, und ihre Schmelztemperatur sollte zwischen 50 und 65 °C liegen. Eine Wiederholung von mehr als drei gleichen Basen sollte vermieden werden um Fehlhybridisierungen zu verhindern. Zur Verstärkung der Primer-Bindung sollte sich am 3'-Ende ein G oder C befinden, jedoch nicht mehr als drei G und/oder C hintereinander, weil sonst die Bindung fehlhybridisierter Primer stabilisiert wird. Das Produkt der PCR sollte nicht länger als 100-150 bp lang sein, der linke und rechte Primer müssen also entsprechend positioniert sein. Des Weiteren ist darauf zu achten, dass die Primer-Paare keine komplementären Strukturen untereinander besitzen, vor allem nicht an ihrem 3'-Ende, denn sonst kommt es zur Ausbildung von Primer-Dimeren. Auch das Auftreten von internen Sekundärstrukturen (hairpins) ist nicht erwünscht, da somit die Hybridisierungsrate an das cDNA-Template verringert wird [81;85].*

### **Primer Design**

Das Primer Design wurden nach den oben genannten Kriterien mit der am Whitehead Institut entwickelten und frei erhältlichen Software Primer3 [86] durchgeführt. Die Software ermöglicht die Eingabe von Designkriterien und prüft u.a. auf Fehlhybridisierungen, Komplementärstrukturen und Selbst-Komplementarität. Um die Koamplifikation von genomischer DNA-Verunreinigung zu verhindern, wurden die Primer so konstruiert, dass je Primer-Paar ein Primer über eine Exon/Exon-Schnittstelle ragt (s. Abb. 9). Auf diese Weise kann auf den kritischen DNase-Verdau verzichtet werden. Die mRNA-Sequenz des zu amplifizierenden Genes wurde mit dem BLAST-Programm (s. 3.10.13) gegen das humane Genom abgeglichen und die aufgeführten Exon/Exon-Schnittstellen als Platzierungsmöglichkeit für einen geeigneten Primer verwendet.



**Abb. 9: Primer Design über eine Exon/Exon-Schnittstelle, um die Koamplifikation von genomischer DNA zu verhindern.**

Die mit dem Programm Primer3 designten Primer für die SSH-Kandidaten-Gene und die Housekeeping-Gene (s. Kapitel 3.1.4), wurden von der Firma Operon Biotechnologies, Köln, in der Qualitätsstufe „salzfrei“ synthetisiert.

### Primer-Optimierung

Zur Bestimmung der optimalen Primerkonzentration und zum Test auf eventuell auftretende Primer-Dimere wurden die Primer für die SSH-Kandidaten-Gene getestet. Die Primer wurden in einem Endkonzentrationsbereich zwischen 250 nM und 750 nM nach dem in Tab. 8 aufgeführten Schema untersucht.

**Tab. 8: Die zur Optimierung eingesetzten Primerkonzentrationen.**

	Endkonzentration Linker Primer [nM]	Endkonzentration Rechter Primer [nM]
<b>Ansatz 1</b>	250	750
<b>Ansatz 2</b>	750	250

Die PCR-Bedingungen entsprachen der in Kapitel 3.9.3 (Quantitative Real-Time PCR) beschriebenen PCR-Reaktion. Als Template diente eine aus vorherigen Versuchen gewonnene cDNA der Zelllinie A2780.

### 3.9.3 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Inzwischen ist die PCR-Methode von der einfachen DNA-Amplifikation zu einem quantitativ nutzbaren Analyseverfahren weiterentwickelt worden. Thermostabile Fluoreszenzfarbstoffe und entsprechende optische Messeinheiten (CCD-Kamera) ermöglichen die Verfolgung der PCR-Reaktion in „Echtzeit“ (Real Time) und lassen quantitative Rückschlüsse auf die eingesetzte Ausgangsmenge an mRNA zu. Sehr häufig erfolgt die Fluoreszenzmessung mit SYBR Green<sup>®</sup> I, einem Farbstoff, der sich in doppelsträngige DNA einlagert und dadurch eine starke Fluoreszenzverstärkung erfährt. Da SYBR Green<sup>®</sup> I nicht sequenzspezifisch ist, kann es für jedes beliebige Target-Gen eingesetzt werden und ist somit oft eine kostengünstige Möglichkeit. Ein Nachteil des SYBR Green<sup>®</sup> I besteht in der Tatsache, dass das Fluoreszenzsignal auch durch Artefakte wie z.B. Primer-Dimere hervorgerufen werden kann. Es muss also immer im Anschluss an die PCR-Reaktion eine Produktuntersuchung angeschlossen werden.

#### Durchführung der qRT-PCR-Analyse

Die qRT-PCR-Analysen wurden mit dem QuantiTect<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Für einen 12 µl-PCR-Ansatz wurden folgende Komponenten aus Tab. 9 auf Eis in die PCR-Reaktionsgefäße pipettiert.

**Tab. 9: Master-Mix für die qRT-PCR.**

Reagenzien	Menge [µl]	Endkonzentration
cDNA-Template	1,2	-
Primer-Master-Mix (Linker + Rechter Primer)	4,8	500 nM je Primer
2X QuantiTect <sup>™</sup> SYBR <sup>®</sup> Green Master Mix	6	1X
Gesamtvolumen	12	-

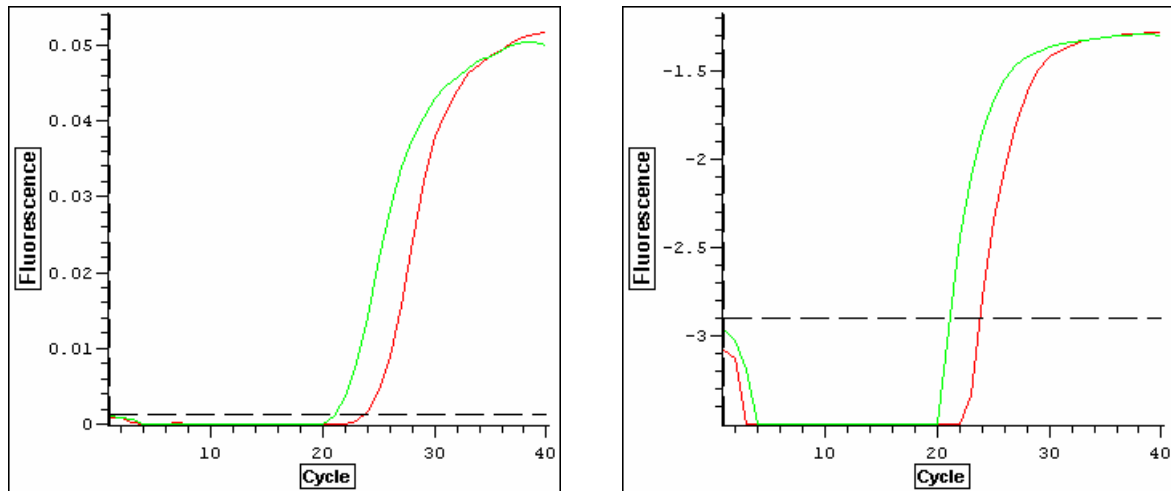
Die PCR-Reaktion fand im Opticon DNA Engine statt. Es wurde folgendes Programm aus Tab. 10 durchlaufen.

**Tab. 10: PCR Programm der qRT-PCR.**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl Zyklen
Aktivierung	95	15 min	-
Denaturierung	94	15 sec	
Annealing	50-65	30 sec	36-40
Elongation	72	30 sec	
finale Elongation	50	1 min	-

Die PCR-Reaktion wurde für insgesamt 36-40 Zyklen programmiert. Nach jedem Zyklus erfolgte eine Fluoreszenzmessung. Nach Abschluss des letzten PCR-Zyklus wurde zunächst für 1 min auf 50 °C erhitzt und anschließend eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden dafür von 65 °C auf 95 °C erhitzt und alle 0,4 °C die noch vorhandene Fluoreszenzintensität gemessen. Zwischen der Fluoreszenzmessung wurde die Temperatur jeweils für 10 sec gehalten.

Die Auswertung der mittels PCR generierten Fluoreszenzkurven erfolgte mit der OpticonMonitor™ Analysen-Software, Version 1.06. Die Werte für die Basislinienfluoreszenz wurden aus dem Durchschnitt der Fluoreszenz der Zyklen 3-7 bestimmt. Die Festlegung des „Threshold“, derjenigen Linie, anhand derer die CT-Werte bestimmt werden, erfolgte manuell und individuell für jedes PCR-Experiment. Der Threshold wurde in der logarithmierten Darstellung der PCR-Kurve festgelegt, um sicherzustellen, dass er sich in der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion befindet. In der logarithmischen Darstellung ist der exponentielle Teil der PCR-Kurve linear, und somit besser zu erkennen als in der normalen Ansicht, in der der Übergang zu einem anderen kinetischen Verlauf nicht so deutlich abgegrenzt ist. In Abb. 10 sind die normale und logarithmische Darstellung und der gewählte Threshold (gestrichelte Linie) zweier PCR-Kurven beispielhaft dargestellt.



**Abb. 10:** Beispielhafte Abbildungen zweier PCR-Kurven in normaler (links) und logarithmischer (rechts) Darstellung. Die logarithmische Darstellung erlaubt ein sicheres Platzieren des Threshold in die exponentielle, hier linearisiert wiedergegebene Phase der PCR-Reaktion.

### Bestimmung der PCR-Effizienz

Die Effizienz ( $E$ ) einer PCR-Reaktion sollte in der exponentiellen Phase idealerweise 100 % betragen. Dies bedeutet eine Verdopplung der cDNA-Menge in jedem Zyklus. In diesem Fall wäre  $E = 2$ . Für die relative quantitative Auswertung ist es von Nöten, die wahre Effizienz der Reaktion zu kennen. Die Effizienz einer PCR-Reaktion ist neben allgemeinen Parametern, wie der Konzentration von  $Mg^{2+}$ , pH-Wert, hemmenden Kontaminationen (Ethanol, Phenol), auch abhängig von der Struktur des zu amplifizierenden Genes. Eine Möglichkeit der Effizienzbestimmung besteht in der Erstellung einer Verdünnungsreihe aus dem Template. Die relative eingesetzte cDNA Menge wird dann logarithmisch gegen den CT-Wert aufgetragen. Aus der Steigung ( $s$ ) der erhaltenen Geraden kann dann anhand der Formel 4 die Effizienz ermittelt werden [87].

#### Formel 4

$$E = 10^{(-1/s)}$$

$E$  = Effizienz,  $s$  = Steigung

Für die Bestimmung der Effizienz der PCR-Analyse der SSH-Kandidaten-Gene wurde ein cDNA-Template der Zelllinie A2780cis mit Ampuwa-Wasser in Fünferschritten oder Zehnerschritten verdünnt. Vier Verdünnungen wurden jeweils zur Ermittlung

einer Regressionsgeraden mittels PCR-Reaktion untersucht. Die Bedingungen der PCR entsprachen jenen, die im Kapitel 3.9.3 (Quantitative Real-Time PCR) beschrieben sind.

### **Bestimmung der Housekeeping-Gene mittels geNorm**

*Zur relativen Quantifizierung der PCR-Reaktion wird die Expression eines Kandidatengens zunächst auf die Expression eines internen Kontroll-Gens normalisiert. Diese internen Kontroll-Gene werden auch als „Housekeeping-Gene“ (HKG) bezeichnet, da sie oft für Proteine kodieren, die eine essentielle und konstante Stoffwechselfunktion der Zelle steuern und sich in ihrer Expression nicht verändern. An ein optimales HKG wird die Anforderung gestellt, in den zu vergleichenden Geweben oder Proben konstant exprimiert zu sein. Auch dürfen die experimentellen Bedingungen (z.B. Behandlung mit Cisplatin) keinen Einfluss auf die Expression haben. Einige Studien zeigen, dass für jede experimentelle Bedingung und jeden Zelltyp die jeweiligen HKG neu bestimmt werden müssen [88-91]. In dem von Vandesompele et al. [88] entwickelten Programm geNorm zur Validierung von HKG werden die Expressionsverhältnisse von mehreren potentiellen Kontroll-Genen miteinander verglichen. Aus dem Satz dieser Gene werden dann die am stabilsten exprimierten Gene zur Errechnung eines Normlisierungsfaktors herangezogen. Des Weiteren wird mit geNorm ein Gen-Stabilitätswert „M“ ermittelt, der die durchschnittliche paarweise Abweichung eines Kontroll-Genes zu allen anderen Kontroll-Genen beinhaltet, errechnet als die Standardabweichung der logarithmierten Expressionsverhältnisse (detaillierte Beschreibung und Formel s. [88]). Gene mit dem kleinsten M-Wert weisen die stabilste Expression auf.*

Die in Visual Basic programmierte Applikation (VBA) geNorm (Version 3.4) wurde zur Ermittlung der drei stabilsten Kontroll-Gene aus einem Satz von neun Genen verwendet. Verglichen wurden jeweils die mit Cisplatin behandelten (+) und nicht-behandelten (-) Proben der 18 Tumorzelllinien. Die Daten müssen in Form von „Quantities“ (Q) eingegeben werden. Ein Beispiel für die Eingabe der Daten und die Ermittlung der HKGs ist anhand der Zelllinie A2780 in Tab. 11 - Tab. 13 aufgeführt. Es wurden zunächst aus den Mittelwerten der CT-Wert-Duplikate

Differenzen gebildet ( $\Delta CT$ ). Dabei wurde jeweils der größere von dem kleineren CT-Wert subtrahiert (Formel 5). Zur Ermittlung der Quantities wurden diese Differenzen dann zur Basis 2 exponiert (Formel 6). Für den kleineren CT-Wert ergibt sich daraus also ein Wert von 1 und für den größeren CT-Wert ein Wert zwischen 0 und 1.

**Formel 5** 
$$\Delta CT = CT_{min} - CT_{max}$$

**Formel 6** 
$$Q = 2^{\Delta CT}$$

Die Standardabweichung der Quantities (SD Q), die bei der Berechnung der relativen Expression benötigt wird, wird nach Formel 7 errechnet. Aus den eingegebenen Quantities errechnet geNorm im Folgenden den Gen-Stabilitätswert M. Der höchste M-Wert weist das am stärksten in seiner Expression abweichende Gen auf (im Beispiel TFRC mit  $M = 2,36$ ; grau hinterlegt). Dieses Gen wurde aus dem Datensatz gestrichen und mit den verbleibenden Daten erneut der M-Wert ermittelt (Tab. 12).

**Formel 7** 
$$SD Q = Q \times \ln 2 \times SD_{CT\ Probe}$$

**Tab. 11: Beispiel für die Eingabe der Daten in das geNorm Programm an der Zelllinie A2780 und der sukzessiven Eliminierung der Gene mit den höchsten M-Werten; hier im Folgenden das Gen TFRC.**

Gene	B2M	UBE2D2	ACTB	GUSB	HPRT1	TFRC	RPLP0	RPL13	YWHAZ
<b>CT-Werte</b>									
A2780-	16,27	19,38	16,40	21,26	21,44	27,44	16,46	15,37	18,83
A2780+	16,81	20,86	16,52	23,03	22,39	25,03	17,10	16,23	20,06
<b><math>\Delta CT (CT_{min} - CT_{max})</math></b>									
A2780-	0	0	0	0	0	-2,41	0	0	0
A2780+	-0,54	-1,48	-0,11	-1,77	-0,95	0	-0,64	-0,85	-1,22
<b>Q (<math>2^{\Delta CT}</math>)</b>									
A2780-	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,19	1,00	1,00	1,00
A2780+	0,69	0,36	0,92	0,29	0,52	1,00	0,64	0,55	0,43
<b>M</b>	<b>0,62</b>	<b>0,78</b>	<b>0,81</b>	<b>0,96</b>	<b>0,58</b>	<b>2,36</b>	<b>0,60</b>	<b>0,58</b>	<b>0,66</b>

Nach der neuen Berechnung wies das Gen GUSB den höchsten M-Wert auf und wurde gestrichen. Diese sukzessive Eliminierung wurde durchgeführt, bis der Probesatz auf drei HKG reduziert war.

**Tab. 12 Beispiel für die Ermittlung der drei am stabilsten exprimierten HKG aus einem Satz von neun Genen anhand der Zelllinie A2780. Angegeben sind die jeweiligen Q-Werte und der dazugehörige M-Wert. Gezeigt ist der Schritt nach der Streichung des ersten Genes aus dem Datensatz und der erneuten Berechnung des M-Wertes. Im Folgenden wurde dann hier das Gen GUSB gestrichen.**

Q	B2M	UBE2D2	ACTB	GUSB	HPRT1	RPLP0	RPL13	YWHAZ
A2780-	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
A2780+	0,69	0,36	0,92	0,29	0,52	0,64	0,55	0,43
<b>M</b>	<b>0,42</b>	<b>0,50</b>	<b>0,67</b>	<b>0,68</b>	<b>0,67</b>	<b>0,33</b>	<b>0,38</b>	<b>0,33</b>

Das Ergebnis für die Beispielizeillinie A2780 ist in Tab. 13 aufgeführt. Die so ermittelten HKG wurden dann für die Normalisierung der qRT-PCR herangezogen.

**Tab. 13: Beispiel für die Ermittlung der drei am stabilsten exprimierten HKG aus einem Satz von neun Genen anhand der Zelllinie A2780. Angegeben sind die jeweiligen Q-Werte und der dazugehörige M-Wert.**

Q	HPRT1	RPLP0	RPL13
A2780-	1,00	1,00	1,00
A2780+	0,52	0,64	0,55
<b>M</b>	<b>0,14</b>	<b>0,19</b>	<b>0,11</b>

### Auswertung der qRT-PCR mittels geNorm

Zur Auswertung der relativen Genexpression zweier Proben wurde nach Vandesompele et al. [88;92] die Berechnung mittels geNorm (Version 3.4) herangezogen. Die Berechnung für das Gen EMP1 (hier Gene of Interest; GOI) in der Zelllinie 2102 zwischen einer mit Cisplatin behandelten Probe (+) und einer nicht



behandelten Probe (-) ist in diesem Abschnitt beispielhaft aufgeführt. Es wurden zunächst aus den CT-Werten der drei HKG jeder Probe wie im vorherigen Abschnitt beschrieben die Quantities (Q) und die Standardabweichungen (SD Q) errechnet (s. Tab. 14).

**Tab. 14: CT-Werte und Quantities der HKG der Proben CAL27- und CAL27+.**

HKG	Probe	CT1	CT 2	MW CT	SD CT	Q	SD Q
<b>RPLP0</b>	2102-	15,69	15,91	15,80	0,11	1,00	0,08
	2102+	16,40	16,64	16,52	0,12	0,61	0,05
<b>UBE2D2</b>	2102-	18,65	18,27	18,46	0,19	1,00	0,13
	2102+	18,97	18,74	18,86	0,12	0,76	0,06
<b>RPL13</b>	2102-	15,98	16,21	16,09	0,12	1,00	0,08
	2102+	16,52	16,88	16,70	0,18	0,66	0,08

Aus den Quantities wurden dann die Normalisierungsfaktoren (NF) ermittelt. Sie ergeben sich aus dem geometrischen Mittel der Quantities der drei zur Normalisierung herangezogenen HKG (Formel 8). Die NF sind in Tab. 15 aufgeführt.

**Formel 8** 
$$NF = \sqrt[3]{Q_{HKG_1} \times Q_{HKG_2} \times Q_{HKG_3}}$$

Die Standardabweichung (SD) des NF errechnet sich nach der Formel 9.

**Formel 9** 
$$SD NF = NF \sqrt{\left(\frac{SD Q HKG_1}{3 \times Q HKG_1}\right)^2 + \left(\frac{SD Q HKG_2}{3 \times Q HKG_2}\right)^2 + \left(\frac{SD Q HKG_3}{3 \times Q HKG_3}\right)^2}$$

Für das GOI (hier EMP1) wurden ebenso wie für die HKG die Quantities ( $Q_{GOI}$ ) ermittelt (s. Tab. 15). Die anhand der drei HKG normalisierte „relative Expression“ ( $GOI_{rE}$ ) ergibt sich dann aus der Division der Quantity des GOI durch den NF (Formel 10). Die Standardabweichung des normalisierten GOI ( $SD GOI_{rE}$ ) errechnet sich nach der Formel 11.

**Tab. 15: Beispielrechnung für die Auswertung der relativen Genexpression mittels geNorm für die Zelllinie A2780cis und das Gen PI15.**

EMP1	CT1	CT2	MW CT	SD CT	Q <sub>GOI</sub>	SD Q <sub>GOI</sub>	NF	SD NF	GOI <sub>rE</sub>	SD GOI <sub>rE</sub>
CAL27-	27,78	28,15	27,96	0,19	0,07	0,01	1,00	0,06	0,07	0,01
CAL27+	24,20	24,05	24,13	0,08	1,00	0,05	0,67	0,04	1,49	0,12

**Formel 10**

$$GOI_{rE} = \frac{Q_{GOI}}{NF}$$

**Formel 11**

$$SD\ GOI_{rE} = GOI_{rE} \sqrt{\left(\frac{SD\ NF_n}{NF_n}\right)^2 + \left(\frac{SD\ GOI}{GOI}\right)^2}$$

Für eine anschaulichere Auswertung wurden die Werte der relativen Expression  $GOI_{rE}$  zusätzlich reskaliert ( $GOI_{rrE}$ ). Dafür wurde die Expression einer Probe auf 1 normalisiert und die der behandelten Probe darauf bezogen. In dem gezeigten Beispiel wurde der Expressionslevel für die Probe 2102- auf 1 normalisiert und der dazugehörige Expressionslevel für die behandelte Probe 2102+ beträgt 21,30. Die Standardabweichung des reskalierten  $GOI_{rrE}$  wurde entsprechend durch Division der  $SD\ GOI_{rE}$  durch den entsprechenden  $GOI_{rE}$ -Wert ermittelt. Der Expressionsfaktor EF ergibt sich dann aus dem Verhältnis der reskalierten Expressionslevel (s. Formel 12) und die  $SD\ EF$  nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz aus der Wurzel der Summe der Fehlerquadrate nach der Formel 13.

**Formel 12**

$$EF = \frac{GOI_{rrE+}}{GOI_{rrE-}}$$

**Formel 13**

$$SD\ EF = \sqrt{\left(\frac{SD\ GOI_{rrE-}}{GOI_{rrE-}}\right)^2 + \left(\frac{SD\ GOI_{rrE+}}{GOI_{rrE+}}\right)^2} \times EF$$

Das Gen EMP1 ist also in der mit Cisplatin behandelten Probe 2102+ um den Faktor 21,30 ( $\pm 3,45$ ) höher exprimiert, als in der unbehandelten Probe 2102-.

### 3.10 Suppressions-Subtraktions-Hybridisierung (SSH)

*Die SSH ist eine auf der PCR-Technik basierende Methode, die es ermöglicht, differentiell exprimierte Gene zweier Populationen zu ermitteln, ohne vorherige Sequenzinformationen zu haben. Sie wurde erstmals von Diatchenko et al. [93] beschrieben. Das Grundprinzip der SSH beruht darauf, dass gleich exprimierte Gene in beiden Populationen voneinander subtrahiert werden und in der nachfolgenden PCR nur differentiell exprimierte Gene exponentiell amplifiziert werden. Die Analyse kann in sechs Schritte eingeteilt werden.*

*Der **Schritt I** umfasst die Isolierung der mRNA, die Synthese der ds-cDNA und das anschließende Schneiden der cDNA mit Hilfe einer Restriktions-Endonuklease.*

*In **Schritt II** werden die zu untersuchenden Zelllinien in Driver und Tester (s. Abb. 11) eingeteilt. Die Zelllinie, in der differentiell exprimierte Gene ermittelt werden sollen, wird hier als Tester bezeichnet. Der Driver ist jene Zelllinie, die vom Tester subtrahiert wird, aus diesem Grund wird er im Überschuss zugegeben. Der Tester wird in zwei Teile geteilt und mit zwei verschiedenen Adaptoren, Adapter 1 und Adapter 2R, ligiert. Bei den Adaptoren handelt es sich um Oligonukleotide, die aus zwei „Sequenz-Einheiten“ bestehen (s. Abb. 12). Das äußere 5'-Ende beider Adapter beinhaltet die gleiche Basenabfolge. Diese entspricht auch der Sequenz des PCR-Primers 1, so dass dieser bei der ersten PCR an die Komplementär-Sequenzen beider Adapter hybridisieren kann. Der innere Bereich der beiden Adapter unterscheidet sich. Adapter 1 trägt eine Sequenz, die der des „Nested-PCR-Primers 1“ (NP1) entspricht und Adapter 2R ist analog zu der Sequenz des „Nested-PCR-Primers 2R“ (NP2R). Diese Konstruktion ermöglicht bei der später folgenden „Nested-PCR“ eine selektive Amplifizierung der Stränge des Typs e (s. Abb. 11, Schritt VI). Um die differentiell exprimierten Gene beider Populationen zu ermitteln, wird die SSH-Analyse in zwei „Richtungen“ ausgeführt, in der dann Tester und Driver vice versa eingesetzt werden. Aus Gründen der Verständlichkeit und Übersichtlichkeit wird jedoch nur eine der beiden Richtungen beschrieben und dargestellt.*

Es folgt in **Schritt III** eine erste Hybridisierung. Dabei „fängt“ der Driver, da er im Überschuss vorliegt, gleiche Sequenzen ab (c). Es entstehen aber auch Hybride, die nur aus Driver-DNA bestehen (d), bzw. es bleiben Einzelstränge des Drivers übrig (d). Ebenso kommt es vor, dass sich zwei Tester-Stränge wieder aneinander lagern (b). Dabei kann es sich sowohl um nicht-differentiell, als auch um differentiell exprimierte Sequenzen handeln. Aufgrund der geringen Konzentration an Tester-DNA und dem Ablauf der Reaktion nach dem Hybridisierungs-Geschwindigkeitsgesetz 2. Ordnung ist aber die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung dieser Art von Hybriden gering [94]. Die nun noch in Form von Einzelsträngen vorliegende Tester-DNA (a) ist jene, die differentiell exprimierte Genfragmente enthält und die im weiteren Verlauf angereichert wird. Während dieser ersten Hybridisierung wird die cDNA-Tester-Fraktion auch normalisiert, d.h. die Konzentration der differentiell exprimierten Gene, die zum Zeitpunkt der Analyse in höherer oder geringerer Kopienzahl vorlagen, wird angeglichen. Dies ergibt sich ebenfalls aus dem Hybridisierungs-Geschwindigkeitsgesetz 2. Ordnung, nachdem cDNAs, die in höherem Überschuss vorliegen auch schneller Hetero-Hybride (b) bilden als cDNAs, die in geringerem Überschuss vorliegen. Die Konzentrationen gleichen sich also an, so dass nach diesem Schritt ungefähr gleich viele Tester-Einzelstränge des Typs (a) vorliegen.

In **Schritt IV** schließt sich eine zweite Hybridisierung an, in der sich die Stränge des Typs (a) aus beiden Ansätzen zusammen lagern können. Sie bilden einen Doppelstrang mit zwei verschiedenen Adaptern (e).

Nach dem Auffüllen der Enden (**Schritt V**) und einer Denaturierung bieten nur diese Hybride mit zwei verschiedenen Adaptern (e) zwei Angriffspunkte für den PCR-Primer 1, sodass sie im folgenden Schritt (1. PCR) als einzige exponentiell amplifiziert werden können (**Schritt VI**).

Stränge des Typs (b), welche ebenfalls zwei Adapter an beiden Enden tragen, werden bei der 1. PCR supprimiert, weil die Einzelstränge nach dem Auffüllen an beiden Enden eine komplementäre Sequenz tragen und sich nach der Denaturierung schlaufenförmig an diesen Enden zusammenlagern. Diese Reaktion wird gegenüber dem Anlagern der Primer-Sequenz, bedingt durch die Hybridisierungskinetik, favorisiert (s. Abb. 13). Damit werden Stränge des Typs (b) bei der PCR nicht

*amplifiziert. Stränge des Typs (c) werden nur linear amplifiziert, da sie nach dem Auffüllen der Enden nur an einer Seite eine Primer-Bindestelle (Adapter-komplementär) besitzen. Die Stränge der Typen (a) und (d) werden gar nicht amplifiziert; ihnen fehlt gänzlich eine Primer-Bindestelle. Die nachfolgende „Nested-PCR“ (nicht abgebildet) dient der weiteren Anreicherung differentiell exprimierter Sequenzen des Typs (e). Es werden hier die Nested-PCR-Primer 1 und 2R (s. Abb. 12) eingesetzt, die dem inneren Bereich der jeweiligen Adapter analog sind. Nur die Stränge des Typs (e) besitzen die Bindungsstellen beider Primer und können exponentiell amplifiziert werden. Dieser Schritt verringert nochmals die Wahrscheinlichkeit, dass unerwünschte, nicht differentiell exprimierte Sequenzen ebenfalls amplifiziert werden. Aufgrund dieser quantitativ unterschiedlichen Amplifizierung werden die im Tester differentiell exprimierten Sequenzen selektiv angereichert.*

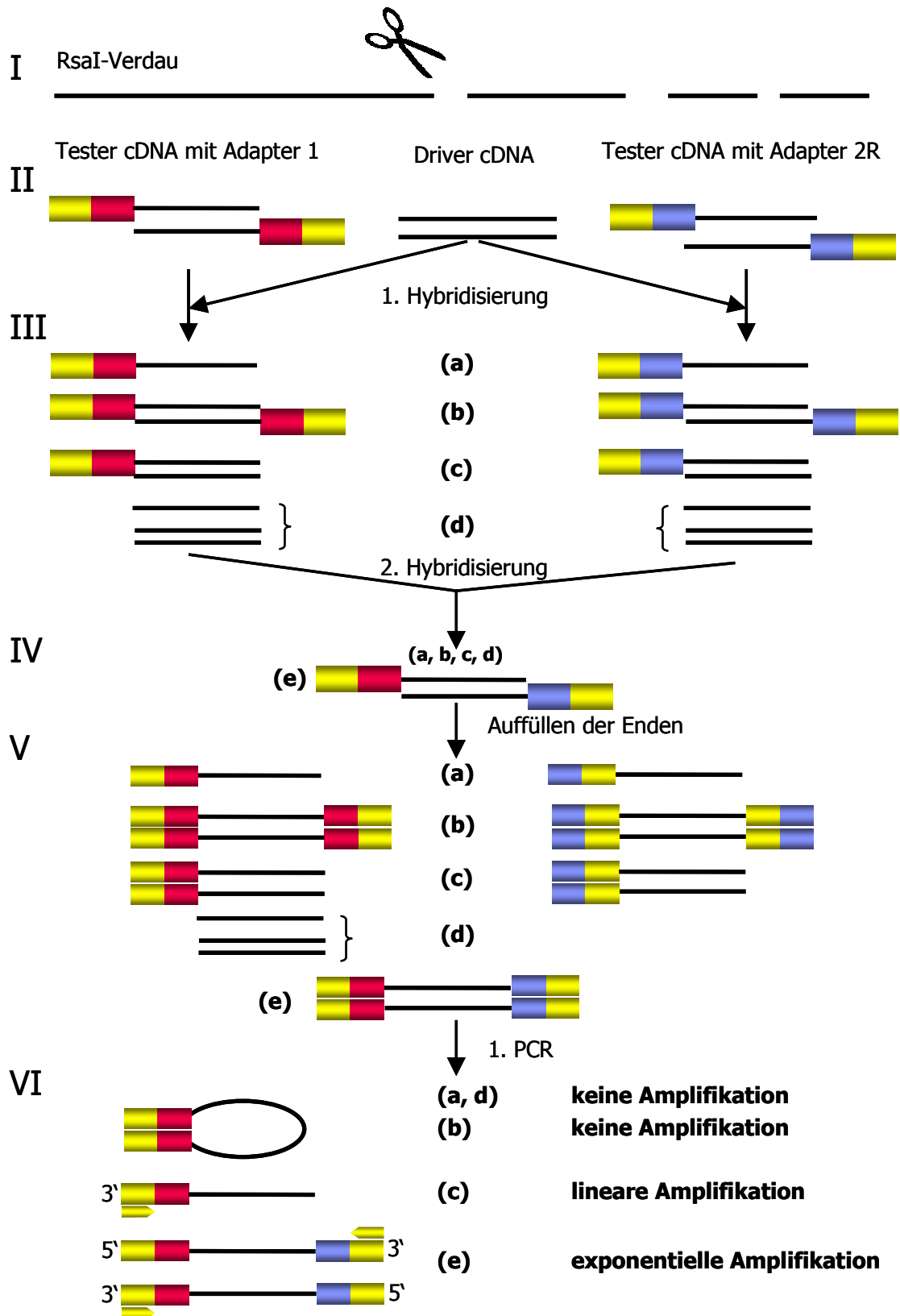


Abb. 11: Das Prinzip der SSH, nach dem Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit Handbuch [95].

**Adapter 1**

CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT //

**PCR Primer 1**

CTAATACGACTCACTATAGGGC

**Nested PCR Primer 1**

TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT

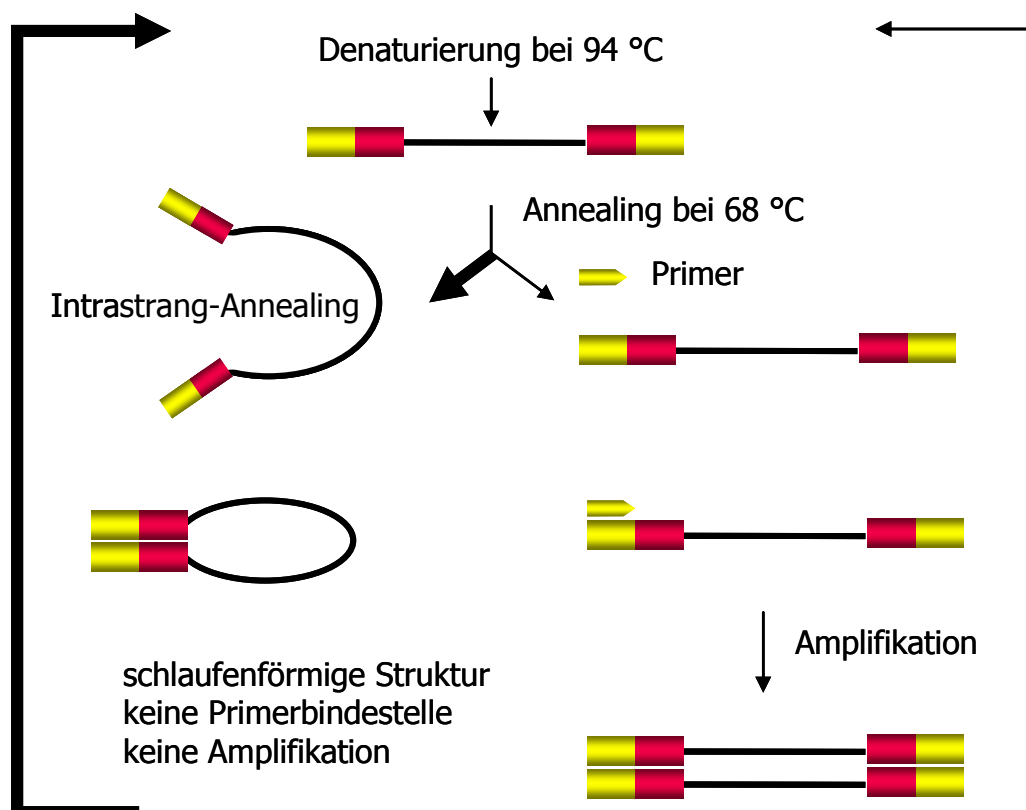
**Adapter 2R**

CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT //

**Nested PCR Primer 2**

AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT

**Abb. 12: Sequenzen der Adapter und Primer der SSH nach dem Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit Handbuch [95]. Die Sequenzen sind jeweils vom 5'- in Richtung 3'-Ende angegeben.**



**Abb. 13: Das Prinzip der PCR Suppression nach dem Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit Handbuch [95].**

Ein Problem bei der SSH-Methode ist jedoch die Existenz vieler „falsch-positiver“ Klone in der erstellten cDNA-Bibliothek [96;97]. Es können zwei hauptsächliche Erklärungen für die Entstehung falsch-positiver Sequenzen gefunden werden. **Typ-I-Fehler:** Nicht ligierte Adapter können „nichtspezifisch“ an cDNA-Sequenzen mit gleichen Sequenzabschnitten hybridisieren. Nach einer Elongation werden diese Sequenzen in den nachfolgenden PCRs amplifiziert. Außerdem können nichtspezifisch gebundene Primer solche falsch-positiven Sequenzen hervorbringen. Dieser Fehler des Typs I kann durch ein Differentielles Screening (s. Kapitel 3.10.12) aufgedeckt werden [96]. Der **Fehler des Typs II** entsteht, wenn durch Zufall nicht differentiell exprimierte Sequenzen der Hybridisierung mit dem Driver entgehen. Befindet sich in beiden Tester-Fractionen eine nicht hybridisierte komplementäre Sequenz, können diese in der zweiten Hybridisierung zusammen finden. Diese Moleküle zeichnen sich dann ebenfalls dadurch aus, dass sie zwei verschiedene Adapter an ihren Enden tragen. Diese Art von falsch-positiven Sequenzen kann durch die Anwendung der Mirror Orientation Selection (MOS; s. Kapitel 3.10.10) reduziert werden [97;98]. Die Wahrscheinlichkeit, dass solche Hybride entstehen, steigt mit der Reduktion der eingesetzten Driver-Konzentration. Ein höheres Tester/Driver-Verhältnis wiederum senkt die Detektionsgrenze für gering überexprimierte Gene.

Die SSH wurde mit Hilfe des CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit durchgeführt [95]. Das Verfahren ist in detaillierter Form auch bei Diatchenko et al. nachzulesen [93;99]. Das Protokoll von Clontech wurde leicht abgewandelt, um das Detektionslimit und die Anzahl der Hintergrundmoleküle zu erniedrigen [98]. Der Durchführung der einzelnen Schritte gehen zur besseren Verständlichkeit kurze Erläuterungen vorweg, welche in kursiver Schrift vom restlichen Text abgehoben sind.

### 3.10.1 Synthese des ersten cDNA Stranges

Die SSH wurde sowohl für die Cisplatin-sensitive Zelllinie A2780, als auch für die Cisplatin-resistente Zelllinie A2780cis durchgeführt, sodass die jeweils überexprimierten Gene beider Zelllinien ermittelt wurden. Beide Zelllinien dienten einmal als Kontrolle (Driver) und wurden von der jeweiligen „Tester-Zelllinie“



subtrahiert. Die Inkubations- und PCR-Reaktionen der SSH wurden alle in dem Thermocycler „Thermal Cycler 480“, durchgeführt.

Zur Vorbereitung der Synthese des ersten cDNA-Stranges wurden jeweils 2 µg mRNA der Zelllinien A2780 und A2780cis mit 1 µl cDNA-Synthese-Primer versetzt und mit sterilem H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 5 µl aufgefüllt. Die Proben wurden für 2 min bei 70 °C in einem Thermocycler inkubiert, anschließend 2 min auf Eis gekühlt und dann kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die folgenden Reagenzien aus Tab. 16 zu jedem Reaktionsansatz zugefügt.

**Tab. 16: Reaktionsmix für die Synthese des ersten cDNA-Stranges.**

Reagenzien	Menge [µl]
5X „First-Strand“-Puffer	2
dNTP Mix [10 mM]	1
steriles H <sub>2</sub> O	1
AMV Reverse Transkriptase [20 U/µl]	1

Die Proben wurden kurz geschüttelt und zentrifugiert, dann im Thermocycler bei 42 °C 1,5 h inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert, um das Kondensat wieder in die Probe zurückzuführen. Um die cDNA-Synthese zu stoppen, wurden die Proben auf Eis gelagert.

### 3.10.2 Synthese des zweiten cDNA Stranges

Die folgenden Schritte wurden jeweils mit dem ss-cDNA-Strang (ss, single-strand) aus beiden Zelllinien durchgeführt. Die folgenden Reagenzien aus Tab. 17 wurden in die Reaktionsgefäße der beiden Einzelstrangsynthesen gegeben.

**Tab. 17: Reaktionsansatz für die Synthese des zweiten cDNA-Stranges.**

Reagenzien	Menge [µl]
5X „First-Strand“-Puffer	16,0
dNTP Mix [10 mM]	1,6
steriles H <sub>2</sub> O	48,4
20X Second-Strand Enzyme Cocktail	4,0

Die Proben wurden kurz gemischt, zentrifugiert und für 2 h bei 16 °C im Thermocycler inkubiert. Es wurden 2 µl T4-DNA-Polymerase zugegeben. Danach wurde gut gemischt. Um die Synthese zu stoppen, wurden 4 µl 20X EDTA/Glycogen zugesetzt. Anschließend wurden 100 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol zugesetzt, dies führte zur Denaturierung und Fällung der Proteine. Nach dem Mischen wurden die Proben bei Raumtemperatur 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues 0,5-ml-PCR-Gefäß gegeben. Die Interphase und die untere Phase wurden verworfen. 100 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) wurden zu der wäßrigen Phase gegeben. Es wurde erneut 10 min inkubiert und nach der Zentrifugation die obere wässrige Phase abgenommen. Zum Ausfällen der cDNA wurden 40 µl 4 M Ammoniumacetat und 300 µl 95%iger Ethanol zugegeben. Nach dem Mischen wurde bei Raumtemperatur für 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 500 µl 80%igem Ethanol gewaschen. Die Proben wurden dann bei 14000 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut vorsichtig abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Das Präzipitat wurde in 50 µl sterilem Wasser aufgenommen. 6 µl wurden in ein neues PCR-Gefäß überführt, um später diese noch unverdaute cDNA mit der verdauten cDNA vergleichen zu können. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

### **3.10.3 RsaI-Verdau**

*Die folgenden Schritte wurden mit den cDNA-Doppelsträngen (ds cDNA, double-strand cDNA) aus beiden Zelllinien durchgeführt. Es wurden nach der Behandlung mit dem Restriktionsenzym RsaI mehrere kürzere cDNA-Doppelstrang-Fragmente mit glatten Enden erhalten. Diese trugen alle nach dem Schneiden die gleiche Basensequenz an ihrem Ende, sodass dort später die Adapter ligiert werden konnten.*

Die folgenden Reagenzien aus Tab. 18 wurden in das Reaktionsgefäß gegeben, durch Schütteln kurz gemischt, zentrifugiert und bei 37 °C 1,5 h im Thermocycler inkubiert.

**Tab. 18: Reaktionsansatz für den Verdau mit RsaI.**

Reagenzien	Menge [ $\mu\text{l}$ ]
ds-cDNA	43,5
10X „Rsa I Restriction“-Puffer	5,0
Rsa I [10 U/ $\mu\text{l}$ ]	1,5

Es wurden 0,5  $\mu\text{l}$  der Proben für die Kontrolle auf vollständigen Verdau entnommen. In die verbleibende Probe wurden 2,5  $\mu\text{l}$  20X EDTA/Glycogen gegeben, um die Reaktion zu stoppen. Es wurden 50  $\mu\text{l}$  Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol zur Denaturierung und Fällung der Proteine zugegeben. Nach dem Schütteln wurden die Proben bei Raumtemperatur 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues 0,5-ml-PCR-Gefäß gegeben. Die Interphase und die untere Phase wurden verworfen. 50  $\mu\text{l}$  Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) wurden zu der wässrigen Phase gegeben. Es wurde für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (14000 rpm) um die Phasen zu trennen. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues PCR-Gefäß überführt. Zum Ausfällen der cDNA wurden 25  $\mu\text{l}$  4 M Ammoniumacetat und 187,5  $\mu\text{l}$  95%iger Ethanol zugegeben. Nach dem Schütteln wurde bei Raumtemperatur für 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde mit 200  $\mu\text{l}$  80%igem Ethanol gewaschen und die Proben bei 14000 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder vorsichtig abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Das Präzipitat wurde in 5,5  $\mu\text{l}$  Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

#### **3.10.4 Kontrolle des RsaI-Verdaus**

Die Vollständigkeit des Verdaus durch die Endonuklease RsaI wurde auf einem Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) untersucht. Laut Protokoll erfolgt die Kontrolle auf einem Agarose-Gel. Da die Auftrennung der einzelnen cDNA Banden auf einem Polyacrylamid-Gel besser und die Silberfärbung sensitiver ist, wurde die Vollständigkeit des Verdaus auf einem Polyacrylamid-Gel untersucht. Die Durchführung der PAA-Gelelektrophorese ist in dem Kapitel 3.6.3 beschrieben.

### 3.10.5 Adapter-Ligation

Für jede Tester-cDNA mussten zwei Adapter-Ligationen durchgeführt werden. Jede cDNA Probe wurde in zwei separate Reaktionsgefäße aliquotiert: ein Aliquot wurde mit Adapter 1 ligiert (Tester 1-1, Tester 2-1), das zweite Aliquot wurde mit Adapter 2R ligiert (Tester 1-2, Tester 2-2). An die Driver-cDNA wurden keine Adapter ligiert.

Jeweils 1 µl der durch RsaI verdauten cDNA-Proben wurden mit 5 µl sterilem Wasser aufgenommen. Die Reagenzien gemäß Tab. 19 wurden zu einem Ligations-Master-Mix vereint.

**Tab. 19: Reagenzien für den Ligations-Master-Mix.**

Reagenzien	Volumen pro Ansatz [µl]
steriles H <sub>2</sub> O	3
5X Ligations-Puffer	2
T4-DNA-Ligase [400 U/µl]	1

Um genügend Master-Mix zu erhalten wurde der Ansatz für die Anzahl der Ligationen plus einer zusätzlichen Reaktion angesetzt (10 Ansätze). Für jede Tester-cDNA wurden die Reagenzien aus Tab. 20 in der angegebenen Reihenfolge in ein 0,5-ml-PCR-Gefäß gegeben. Die PCR-Gefäße wurden kurz zentrifugiert und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Abschließend wurde die Ligation durch die Zugabe von 1 µl EDTA/Glykogen gestoppt. Um die Ligase zu inaktivieren wurden die Proben für 5 min auf 72 °C erhitzt. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

**Tab. 20: Ansatz der Ligationsreaktion. \* Für Tester 2-1 und 2-2 wurde das gleiche Schema übernommen.**

Reagenzien	Tester 1-1* [µl]	Tester 1-2* [µl]
verdaute cDNA-Probe	2,5	2,5
Adapter 1 [10 µM]	2	-
Adapter 2R [10 µM]	-	2
Ligations-Master-Mix	5,5	5,5
Endvolumen	10	10

### 3.10.6 Kontrolle der Ligation

Das folgende PCR-Experiment wurde durchgeführt, um zu verifizieren, dass mindestens 25 % der cDNA Adapter an beiden Enden trägt. Eine 25%ige Ligation ist laut Protokoll ausreichend für die nachfolgenden Amplifikationsschritte. Die Amplifikation eines „Housekeeping-Genes“ (G3PDH), welches per Definition in beiden Zelllinien gleich stark exprimiert wird, diente hier als Vergleich.

1 µl von jeder ligierten cDNA wurde mit 200 µl H<sub>2</sub>O versetzt. Die Reagenzien aus Tab. 21 wurden in 2 mal 4 PCR-Gefäße gefüllt. Der Master-Mix für alle acht Proben plus einem zusätzlichen Ansatz wurde nach Tab. 22 vorbereitet. Nach dem Mischen wurde kurz zentrifugiert. 22 µl des Master-Mixes wurden in jeden Reaktionsansatz aliquotiert. Zum Schutz vor Kondensation wurden die Proben mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Die Proben wurden im Thermocycler für 5 min bei 75 °C inkubiert, um die Adapter zu strecken.

**Tab. 21: Ansatz der Ligationskontrolle. \* Der gleiche Ansatz wurde für Tester 2-1 und 2-2 verwendet (Proben 2-1 - 2-4).**

Reagenzien	1-1 [µl]	2-1 [µl]	3-1 [µl]	4-1 [µl]
Tester 1-1* (ligiert mit Adapter 1)	1	1	-	-
Tester 1-2* (ligiert mit Adapter 2R)	-	-	1	1
G3PDH 3' Primer [10 µM]	1	1	1	1
G3PDH 5' Primer [10 µM]	-	1	-	1
PCR Primer 1 [10 µM]	1	-	1	-
Gesamtvolumen [µl]	3	3	3	3

**Tab. 22: Vorbereitung des Ligations-Analysen Master-Mix.**

Reagenzien	Menge pro Reaktionsgefäß [µl]	Menge für 9 Proben [µl]
Steriles H <sub>2</sub> O	18,5	166,5
10X PCR Reaktionspuffer	2,5	22,5
dNTP Mix [10 µM]	0,5	4,5
50X Advantage cDNA Polymerase Mix	0,5	4,5
Gesamtvolumen [µl]	22,0	198,0

Danach wurden 30 PCR-Zyklen im Thermocycler nach folgendem Programm sofort gestartet: Denaturierung bei 94 °C für 30 sec, Annealing bei 65 °C für 30 sec und Elongation bei 68 °C für 2,5 min.

Laut Clontech erfolgt die Analyse der erfolgreichen Ligation auf einem Agarose-Gel. Die PCR-Produkte wurden anschließend abweichend vom Clontech Protokoll mittels des Fluoreszenzfarbstoffes PicoGreen anhand eines absoluten DNA-Standards quantifiziert (Durchführung s. Abschnitt 3.7.2). Es wurden dafür die ligierten PCR-DNA Proben 1:200 mit 1X TE-Puffer verdünnt und 100 µl dieser Verdünnung nach dem unter 3.7.2 beschriebenen Protokoll vermessen. Der um den Leerwert korrigierte Fluoreszenzwert der PCR-Proben 2-1 und 4-1, welche mit den G3PDH Primern amplifiziert wurden, wurde auf 100 % gesetzt und die Fluoreszenz der Adapterproben 1-1 und 3-1 darauf bezogen. Die Proben 1-2 bis 4-2 wurden auf gleiche Weise behandelt.

### **3.10.7 Erste Hybridisierung**

*Im folgenden Abschnitt wurde die Driver-cDNA jeweils im Überschuss zu den beiden cDNA-Tester Ansätzen gegeben. Das Verhältnis von Tester zu Driver wurde von 1:5 laut Clontech Protokoll auf 1:4 heruntersetzt. Dadurch wurde die Detektionsgrenze für gering überexprimierte Gene gesenkt, gleichzeitig aber auch die Wahrscheinlichkeit, falsch-positive Ergebnisse zu erhalten, erhöht. Um diese falsch-positiven Ergebnisse anschließend zu eliminieren wurde im Anschluss an die SSH eine „Mirror Orientation Selection“ (MOS) [97] durchgeführt (s. Kapitel 3.10.10). In der ersten Hybridisierung wurden die in Tester und Driver vorhandenen Sequenzen hybridisiert und somit subtrahiert. In einer Zelllinie differentiell exprimierte Sequenzen fanden kein Pendant und lagen nach der ersten Hybridisierung noch als Einzelstrang vor (s. Abb. 11, Schritt III). Sie wurden mit dieser Methode herausgefiltert und angereichert.*

Für die erste Hybridisierung wurden die Reagenzien aus Tab. 23 in die PCR-Gefäße pipettiert.

**Tab. 23: Ansatz der ersten Hybridisierung \* Der gleiche Ansatz wurde für Tester 2-1 und 2-2 benutzt.**

Reagenzien	Hybridisierung Probe 1 [ $\mu$ l]	Hybridisierung Probe 2 [ $\mu$ l]
Rsa I-verdaute Driver-cDNA	1,5	1,5
Adapter-1-ligierter Tester 1-1*	1,5	-
Adapter-2-ligierter Tester 1-2*	-	1,5
4X Hybridisierungspuffer	1,0	1,0
Gesamtvolumen	4,0	4,0

Die Proben wurden mit einem Tropfen Mineralöl bedeckt, um das Verdunsten der Proben zu verhindern. Anschließend wurde kurz zentrifugiert und die Proben wurden im Thermocycler zunächst für 1,5 min bei 98 °C inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation über 8 h bei 68 °C.

### 3.10.8 Zweite Hybridisierung

*Die zwei Proben der ersten Hybridisierung (Adapter 1 und 2) wurden gemischt und es wurde zur weiteren Anreicherung der differentiell exprimierten Sequenzen erneut Driver-cDNA im Überschuss zugesetzt. Nun entstanden neue Hybride, die aus differentiell exprimierten cDNAs bestehen, und an ihren Enden unterschiedliche Adapter besitzen (Abb. 11, Schritt IV). Die folgenden Schritte wurden für jede experimentelle Tester-cDNA durchgeführt.*

Die folgenden Reagenzien aus Tab. 24 für die Vorbereitung der zweiten Hybridisierung wurden in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben.

**Tab. 24: Ansatz für die Vorbereitung der zweiten Hybridisierung.**

Reagenzien	Menge [ $\mu$ l]
Driver-cDNA	1
4X Hybridisierungspuffer	1
steriles H <sub>2</sub> O	2
Gesamtvolumen	4

Es wurde 1 µl dieser Mischung in ein 0,5-ml-PCR-Gefäß gefüllt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, dann wurden die Proben für 1,5 min im Thermocycler bei 98 °C denaturiert. Anschließend wurden die Hybridisierungsproben (s Tab. 23) jeweils mit dem frisch denaturierten Driver gemischt. Die Reaktion wurde über Nacht bei 68 °C inkubiert. Dann wurden 200 µl Verdünnungspuffer zu den Proben gegeben, kurz gemischt und im Thermocycler bei 68 °C für 7 min erhitzt. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

### **3.10.9 PCR-Amplifikation**

*In diesem Abschnitt (Abb. 11, Schritt VI) wurden die differentiell exprimierten cDNAs selektiv amplifiziert, da nur diese ds-cDNAs zwei verschiedene Adapter an den Enden tragen. Die PCR-Reaktionen wurden auf acht Parallelansätze verteilt, um die Anzahl der durchzuführenden Zyklen auf 27 reduzieren zu können. Auf diesem Wege wurde eine qualitativ hochwertige DNA in ausreichender Menge erhalten. Nach der Vereinigung der Ansätze wurde das DNA-Produkt 1000fach verdünnt und mittels einer zweiten PCR nach den vorherigen Bedingungen erneut 12 Zyklen in drei Parallelansätzen amplifiziert.*

*Anschließend wurden Nested-Primer verwendet, um die differentiell exprimierten Sequenzen nochmals anzureichern und den Hintergrund zu reduzieren. Die Komplementär-Sequenz der Nested-Primer befinden sich am inneren Teil der beiden Adapter. Bei der ersten PCR eventuell noch amplifizierte Sequenzen des Typs (b) (s. Abb. 11, Schritt III) wurden bei der Nested-PCR z. B. nicht mehr exponentiell vervielfältigt, da sie nur eine Bindestelle für einen Nested-Primer besitzen. Vor der Amplifizierung mittels PCR mussten jedoch die überstehenden 3'-Enden durch kurze Inkubation bei 75 °C noch aufgefüllt werden. Sie beinhalten die Komplementär-Sequenz des PCR-Primers 1, der bei der ersten PCR zum Einsatz kam.*

#### **Erste PCR**

Von den zwei verdünnten cDNA-Proben (aus der zweiten Hybridisierung, S. 73) wurde abweichend von dem Clontech-Protokoll je achtmal 1 µl in ein PCR-Gefäß gefüllt. Für die PCR-Produkte wurde ein Master-Mix mit einem Ansatz im Überschuss nach Tab. 25 hergestellt.



**Tab. 25 : Vorbereitung des Master-Mixes für die erste PCR**

<b>Reagenzien</b>	<b>Menge pro Reaktion [<math>\mu</math>l]</b>	<b>Menge für 17 Reaktionen [l]</b>
Steriles Wasser	19,5	331,5
10X PCR Reaktionspuffer	2,5	42,5
dNTP Mix [10 mM]	0,5	8,5
PCR Primer 1 [10 $\mu$ M]	1,0	17
50X Advantage cDNA Polymerase Mix	0,5	8,5
Gesamtvolumen	24,0	408,0

Es wurden jeweils 24  $\mu$ l des Master-Mix in die vorbereiteten PCR-Gefäße gegeben und mit 50  $\mu$ l Mineralöl überschichtet. Das Reaktionsgemisch wurde im Thermocycler bei 75 °C 5 min inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Adapter aufgefüllt, so dass die Bindungsstellen für den PCR-Primer 1 entstanden. Anschließend wurden 27 PCR-Zyklen nach folgendem Schema sofort gestartet: Denaturierung bei 94 °C für 30 sec, Annealing bei 66 °C für 30 sec und Elongation bei 72 °C für 1,5 min. Anschließend wurden die zehn Parallelansätze vereint und die DNA 1000fach mit sterilem Wasser verdünnt. Von den verdünnten Proben wurden dann nochmals in drei Parallelansätzen je 1  $\mu$ l mit den gleichen Bedingungen wie zuvor für 12 Zyklen amplifiziert.

### **Nested-PCR**

Die vereinigten Proben aus der ersten PCR wurden 1:10 verdünnt und davon wurden 3 mal 1  $\mu$ l in ein Reaktionsgefäß gefüllt. Beide Richtungen ergaben dann insgesamt sechs Reaktionsgefäße. Der Master-Mix für die Nested-PCR wurde für 2 mal 3 Parallelansätze plus einem zusätzlichen Ansatz nach Tab. 26 hergestellt und jeweils 24  $\mu$ l des Master-Mix in die vorbereiteten Reaktionsgefäße gegeben und mit 50  $\mu$ l Mineralöl überschichtet.

**Tab. 26: Vorbereitung des Master-Mixes für die Nested-PCR.**

Reagenzien	Menge pro Reaktion [µl]	Menge für 7 Reaktionen [µl]
Steriles Wasser	18,5	129,5
10X PCR Reaktionspuffer	2,5	17,5
Nested PCR-Primer 1; NP1 [10 µM]	1,0	7,0
Nested PCR-Primer 2; NP2R [10 µM]	1,0	7,0
dNTP Mix [10 mM]	0,5	3,5
50X Advantage cDNA Polymerase Mix	0,5	3,5
Gesamtvolumen	24,0	168,0

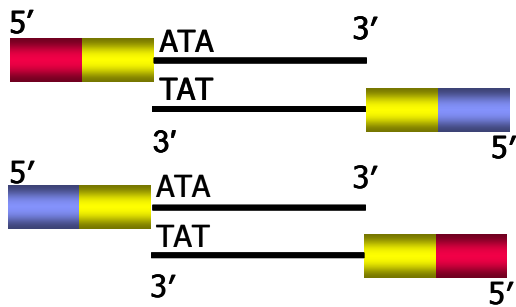
Es wurden dann 12 Zyklen der zweiten PCR nach folgendem Schema durchgeführt: Denaturierung bei 94 °C für 30 sec, Annealing bei 68 °C für 30 sec und Elongation bei 72 °C für 1,5 min. Eine zweite Nested-PCR wurde anschließend nach den gleichen Bedingungen in zehn Parallelansätzen durchgeführt. Die eingesetzte DNA aus der vorhergegangenen PCR wurde erneut vorher 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt.

### 3.10.10 Mirror Orientation Selection (MOS)

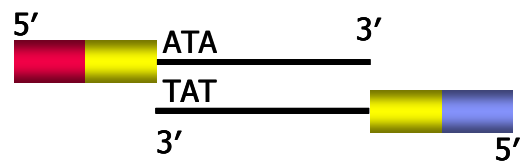
*Die Mirror Orientation Selection (MOS) dient dazu, den Hintergrund an falsch-positiven Sequenzen des Typs II zu reduzieren, die exponentiell amplifiziert werden, obwohl sie nicht differentiell exprimiert sind. Dabei macht man sich die unterschiedliche Orientierung der Sequenzen bezüglich der Adapter zunutze. Während der SSH wird die cDNA zunächst durch das Restriktionsenzym RsaI in einzelne Fragmente zerschnitten. Die cDNA-Probe, deren differentiell exprimierte Sequenzen detektiert werden sollen, wird in zwei Fraktionen eingeteilt. Die Fragmente werden dann am 5'-Ende mit Adaptern ligiert. Fraktion 1 mit Adapter 1 (= Tester 1) und Fraktion 2 mit Adapter 2 (= Tester 2). Die folgenden Schritte sind in Abb. 14 dargestellt.*

**(1) Nach 1. und 2. Hybridisierung**

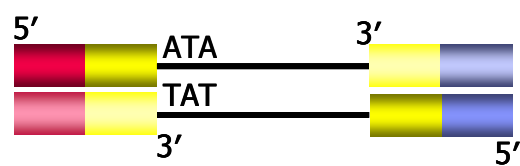
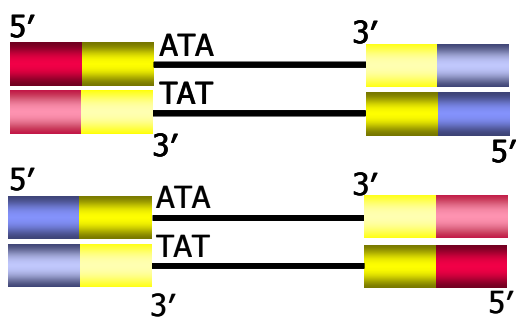
Differenziell exprimierte Sequenzen



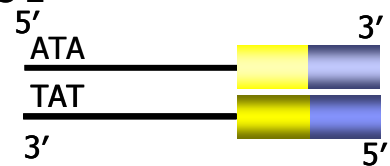
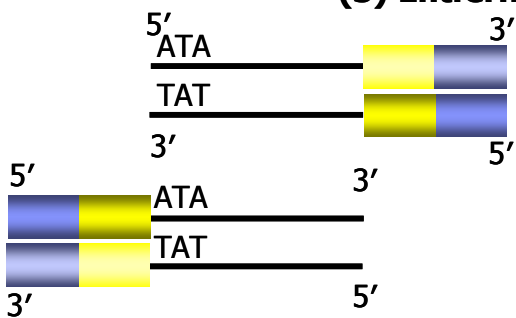
falsch-positive Sequenzen des Typ II



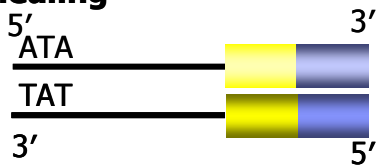
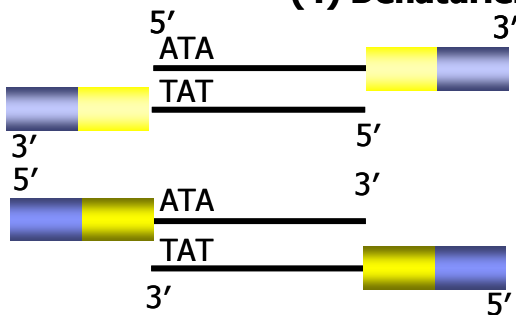
**(2) Auffüllen der Enden**



**(3) Entfernen des Adapters 1**



**(4) Denaturierung und Reannealing**



**(5) Auffüllen der Enden; PCR mit Primer 2**

exponentiell

linear

Abb. 14: Das Prinzip der Mirror Orientation Selection (MOS).

*Nach der ersten und zweiten Hybridisierung während der SSH liegen die differentiell exprimierten Sequenzen als Tester-Tester-Hybride mit zwei verschiedenen Adaptern vor (1). Dabei kommt ein Tester-Tester-Hybrid in zwei Orientierungen vor, bezogen auf den Sitz der Adapter. Handelt es sich um eine falsch-positive Sequenz, existiert diese jedoch höchstwahrscheinlich nur in einer Orientierung. Diese komplementären Sequenzen sind während der ersten Hybridisierung durch Zufall nicht vom Driver abgefangen worden und konnten dann während der zweiten Hybridisierung aneinander binden. Die Wahrscheinlichkeit ist sehr gering, dass beide Orientierungen einer Sequenz in den beiden Tester-Ansätzen während der ersten Hybridisierung nicht abgefangen werden. Nach dem Auffüllen der Enden (2) wird mit Hilfe der Restriktionsendonuklease SmaI der Adapter 1 abgetrennt (3). Anschließend werden die hybridisierten Stränge denaturiert und erneut einem Annealingschritt unterzogen (4). Nun können sich die wahrhaft exponentiell exprimierten Sequenzen erneut so zusammenlagern, dass sie den Adapter 2 an beiden Enden tragen. Da die falsch-positiven Sequenzen nur in einer „Adapter-Orientierung“ vorkommen ist dies hier nicht möglich. In der folgenden PCR mit dem Primer NP2Rs (5) können nur die differentiell exprimierten Sequenzen exponentiell amplifiziert und somit angereichert werden. Die falsch-positiven Sequenzen werden aufgrund der Tatsache, dass der Primer nur an einer Seite binden kann, nur linear amplifiziert.*

### Ethanol­fällung der DNA-Produkte

Sechs von zehn Ansätzen der zweiten Nested-PCR wurden vereinigt. Aus den 150  $\mu\text{l}$  wurden 140  $\mu\text{l}$  entnommen, mit 140  $\mu\text{l}$  Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol versetzt und für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Mikrozentrifugationsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 140  $\mu\text{l}$  Chloroform:Isoamylalkohol wurde erneut zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde anschließend mit 70  $\mu\text{l}$  Ammoniumacetat und 525  $\mu\text{l}$  95%igem Ethanol für 20 min bei 14000 rpm gefällt. Die Pellets wurde mit 200  $\mu\text{l}$  80%igem Ethanol gewaschen, in 7,5  $\mu\text{l}$  NTE-Puffer gelöst, und wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben, quantifiziert. 54 ng jeder cDNA-Probe wurde für den folgenden Restriktionsverdau mit NTE-Puffer zu 5  $\mu\text{l}$  ergänzt.

### Entfernen des Adapter 1

Es folgte ein Restriktionsverdau mit dem Enzym SmaI. Dafür wurde folgender Ansatz aus Tab. 27 zusammen pipettiert und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden anschließend 200 mM EDTA hinzugegeben und für 10 min auf 70 °C erhitzt.

**Tab. 27: Reaktionsansatz für den Verdau mit XmaI.**

Reagenzien	Konzentration/Menge
cDNA-Probe	5 $\mu\text{l}$ (= 54 ng)
10X Puffer Tango <sup>TM</sup>	1 $\mu\text{l}$
SmaI [10 U/ $\mu\text{l}$ ]	5 U
Ampuwa-H <sub>2</sub> O	3,5 $\mu\text{l}$
Gesamtvolumen	10 $\mu\text{l}$

### MOS-Hybridisierung

Zunächst wurde der Ansatz denaturiert und anschließend rehybridisiert. Dafür wurden die Reagenzien aus Tab. 28 zu einem Ansatz vereint, für 1,5 min auf 98 °C erhitzt und dann für 3 h bei 68 °C inkubiert.

**Tab. 28: MOS-Hybridisierungsansatz.**

Reagenzien	Konzentration/Menge
SmaI verdaute cDNA-Probe	1,8 µl (7 ng)
Hybridisierungspuffer 4X	1 µl
Ampuwa-H <sub>2</sub> O	1,2 µl
Gesamtvolumen	4 µl

**MOS-PCR**

Nach der Hybridisierung wurden die Proben mit 200 µl MOS-Verdünnungspuffer gemischt und bei 70 °C für 7 min inkubiert. Es folgte dann die MOS spezifische PCR mit dem etwas kürzeren NP2Rs-Primer (MOS-Primer) zur exponentiellen Amplifizierung der differentiell exprimierten Sequenzen. Der PCR-Ansatz wurde gemäß Tab. 29 in vier Parallelansätzen je Richtung pipettiert.

**Tab. 29: MOS PCR-Ansatz mit NP2Rs-Primern**

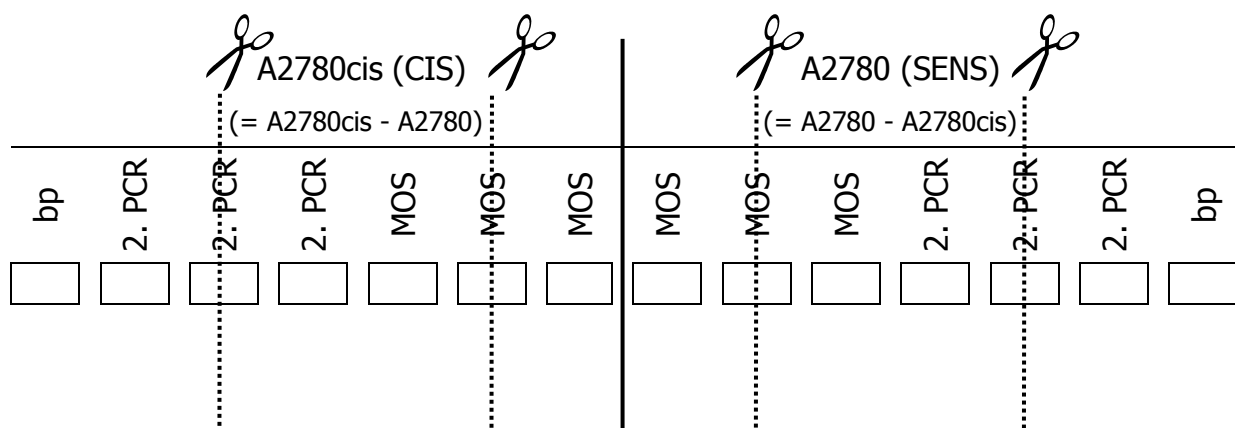
Reagenzien	Konzentration/Menge
Verdünnte cDNA	1 µl
dNTPs	200 µM
10X PCR Reaktions-Puffer	2,0 µl
NP2Rs-Primer	0,6 µM
50X Andvantage cDNA Polymerase Mix	0,4 µl
Ampuwa-H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Der PCR-Ansatz wurde für 2 min auf 72 °C erhitzt, um die 3'-Enden der DNA-Hybride aufzufüllen. Dann folgte sofort das Amplifizierungsprogramm: 1 min bei 94 °C zur Initialisierung, dann 30 Zyklen mit 20 sec Denaturierung bei 95 °C, 20 sec Annealing bei 57 °C und 2 min Elongation bei 72 °C. Abschließend wurde für 5 min auf 72 °C erhitzt.

**Polyacrylamid-Gel zur Auftrennung der DNA-Fragmente**

Um die cDNA-Banden der einzelnen Sequenzen für die spätere Klonierung und Sequenzierung zu trennen, wurden die PCR-Produkte der MOS-PCR und der SSH-PCR

beider Richtungen gemäß Abb. 15 auf ein Polyacrylamid-LongRun-Gel (PAA-Gel) aufgetragen. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel in fünf Teile geschnitten. Es wurde jeweils die mittlere Bande der PCR-Produkte geschnitten, so dass das mittlere Teilstück des Gels einen kompletten Streifen der PCR beider Richtungen aufwies. Die beiden äußeren Stücke, auf denen die Leiter aufgetragen wurde, und der mittlere Teil, wurden anschließend mit der Silberfärbung angefärbt (s. Kapitel 3.6.4). Die beiden inneren Stücke blieben nativ. Die Durchführung der PAA-Elektrophorese ist im Kapitel 3.6.3 beschrieben.



**Abb. 15: Probenauftragsschema des PAA-LongRun-Geles und Einteilung der einzelnen Teile. Die beiden äußeren und der mittlere Teil wurden mit der Silberfärbung angefärbt, die inneren Teile blieben nativ. Aus ihnen wurden später die PAA-Banden ausgeschnitten.**

Nach dem Zusammenkleben der „versilberten“ und der nativen Teile des Gels wurden in der Richtung A2780cis zehn und in der Richtung A2780 sieben Banden auf der Höhe der versilberten Banden aus dem nativen Teil mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Größe der Banden wurde auf dem Silbergel anhand der Basenpaarleiter abgelesen. Die PAA-Stücke wurden jeweils in ein 0,5-ml-Mikrozentrifugationsröhrchen mit 35 µl H<sub>2</sub>O gefüllt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die PCR-Produkte aus dem Gel gelöst.

### PCR mit den getrennten MOS-Produkten

Die PCR wurde mit den gleichen Bedingungen wie bei der MOS-PCR durchgeführt (s. MOS-PCR, S. 80). Als Template diente jeweils 1 µl des Überstandes der PAA-Stücke.

### 3.10.11 Isolierung der PCR-Produkte

Zur Vereinzelung der in den ausgeschnittenen PAA-Banden enthaltenen DNA-Fragmente wurde eine Klonierung in chemisch kompetente *E. coli* durchgeführt. Dafür wurde die TOPO TA Technik der Firma Invitrogen genutzt. Dieser Schritt war notwendig, um die nach dem Ausschneiden der Banden noch zusammen vorliegenden DNA-Sequenzen zu trennen und diese so für die nachfolgende Sequenzierung zugänglich zu machen.

### TOP10F' One-Shot Chemical Transformation

Für den Einbau der PCR-Produkte (die aus dem PAA-Gel ausgeschnittenen Banden; Richtung A2780cis: 10; Richtung A2780: 7) in den Vektor wurden die Reagenzien aus Tab. 30 zusammenpipettiert. Der Ansatz wurde für 15 min bei RT inkubiert.

**Tab. 30: Reaktionsansatz für die Ligation des PCR-Produktes in den pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO-Vektor.**

Reagenzien	Volumen [µl]
PCR-Produkt (aus MOS; PCR mit MOS PAA-Gelstücken)	4
Salz-Lösung (aus TOPO TA Cloning Kit)	1
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup> -Vektor	1

2 µl aus dem Ansatz wurden zu den auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli* gegeben und durch vorsichtiges Rühren mit der Pipettenspitze gemischt. Es folgte eine Inkubation für 15 min auf Eis, dann der Hitzeschock für 30 sec in 42 °C warmem Wasserbad. Zum Stoppen der Reaktion wurde der Ansatz danach sofort auf Eis gelagert. Nach der Zugabe von 250 µl raumtemperaturwarmem SOC-Medium und vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C und 200 rpm horizontal geschüttelt. Der komplette Ansatz wurde anschließend auf eine vorgewärmte LB-Agarplatte\* ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

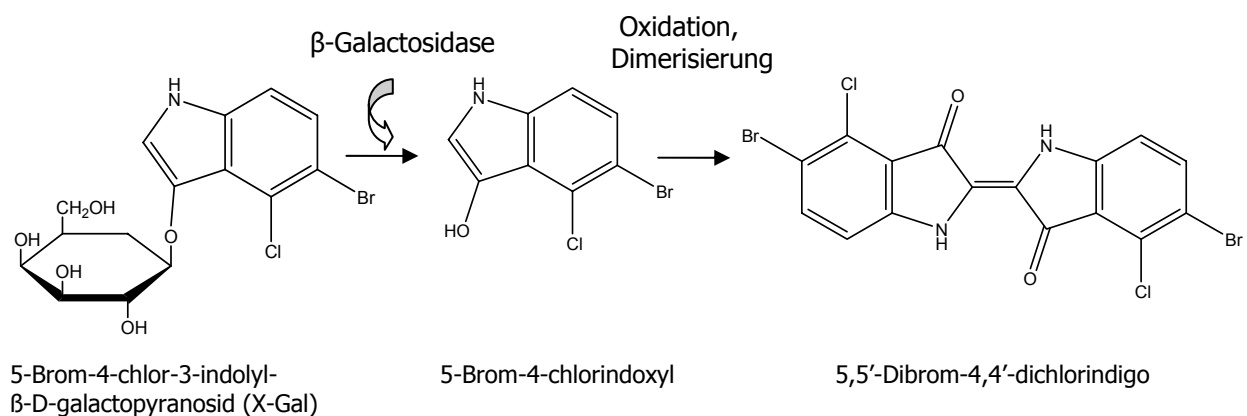
\* Das Ampicillin, X-Gal und IPTG enthaltende Medium imMedia<sup>™</sup> Amp Blue (Endkonzentration je 100 µg/ml) wurde nach Anweisung der Firma Invitrogen



aufgewärmt und in Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren des Agars konnten die Schalen verwendet werden.

### Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion dient der Auswahl solcher Klone, die ein DNA-Fragment aufgenommen haben. Der TOPO-Vektor verfügt in der Insertionsstelle für die Fragmente über das *lac*-Operon. Wird ein Fragment in den Vektor eingebaut, verliert er die Fähigkeit das entsprechende Strukturgen  $\beta$ -Galactosidase zu transkribieren. Die  $\beta$ -Galactosidase wiederum ist ein Enzym, welches sein Substrat Lactose in Galactose und Glucose zu spalten vermag. Zur Detektion der  $\beta$ -Galactosidase-Synthese werden dem Nährmedium IPTG (Isopropylthio- $\beta$ -D-galactose) und X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactose) zugesetzt. IPTG ist ein Lactose-Analogon, welches aber durch  $\beta$ -Galactosidase nicht umgesetzt wird. Es dient hier als Induktor der Galactosidase-Synthese. X-Gal wird durch  $\beta$ -Galactosidase hydrolysiert und durch Oxidation mit Luftsauerstoff zu einem blauen Indigo-Farbstoff umgesetzt (s. Abb. 16). Somit färben sich Kolonien, deren Plasmide kein PCR-Fragment aufgenommen haben, blau. Diejenigen Bakterienkolonien, die ein Plasmid mit PCR-Fragment aufgenommen haben, erscheinen weiß. Der Zusatz von Ampicillin im LB-Agar Nährboden gewährleistet, dass nur Bakterien wachsen können, die bei der Transformation ein Plasmid, und damit ein Ampicillin-Resistenzgen, aufgenommen haben.



**Abb. 16: Bildung des blauen Indigo-Farbstoffes aus X-Gal.**

Nachdem über Nacht Klone auf dem Agarboden gewachsen waren, erfolgte das Picken der Klone. In jedes benötigte Loch einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 200 µl LB-Medium pipettiert. Je klonierter SSH-Bande wurden 48 möglichst weiße Klone gepickt und in je ein Loch der Mikrotiterplatte gegeben. Diese wurde 4 h bei RT unter horizontalem Schütteln (150 rpm) inkubiert. Zur Vorbereitung auf die nachfolgende PCR wurden jeweils 5 µl der Bakteriensuspension mit 15 µl Wasser gemischt und durch 10minütiges Aufkochen lysiert. Für eine Langzeitlagerung der Klone wurden 20 µl DMSO in jedes Loch gegeben und die Platte mit Parafilm verschlossen. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### PCR aus E. coli-Lysaten

*Die Bakterienlysate wurden in einer PCR-Reaktion amplifiziert, um die enthaltenen DNA-Inserts zu isolieren und anzureichern. Die PCR-Produkte wurden dann im Anschluß auf Agarose-Gelen kontrolliert und für das „Differentielle Screening“ auf Nylonmembranen ausgewählt.*

Von den oben beschriebenen Bakteriensuspensionen wurden je 2,5 µl in der PCR-Reaktion eingesetzt. Es wurde folgender PCR-Ansatz aus Tab. 31 je Probe pipettiert. Zur Aktivierung der HotStarTaq-Polymerase wurde der Ansatz zunächst für 15 min auf 95 °C erhitzt, dann folgten 30 PCR-Zyklen mit 30 sec Denaturierung bei 94 °C, 30 sec Annealing bei 57 °C und 1 min Elongation bei 72 °C.

**Tab. 31: Ansatz für die PCR mit E. coli-Lysaten.**

Reagenzien	Menge [µl]	Finale Konzentration
HotStarTaq PCR-Puffer 10X	2,2	1X
HotStarTaq DNA-Polymerase [0,5 U/µl]	4	2 U
dNTP [je 10 mM]	0,5	222 µM je dNTP
NP2Rs Primer [12,5 µM]	0,8	446 nM
DNA-Template (E. coli-Lysat)	2,5	-
Ampuwa-H <sub>2</sub> O	12,5	-
Gesamtvolumen	22,5	

## Screening der PCR-Produkte

Zur Kontrolle der klonierten DNA-Fragmente wurde ein Agarose-Gel mit den erhaltenen PCR-Produkten angefertigt. Die Anfertigung des Geles ist im Kapitel 3.6.1 beschrieben. Da in der vorangegangenen PCR-Reaktion NP2Rs-Primer verwendet wurden, konnten nur MOS-positive Fragmente amplifiziert werden und auf dem Agarose-Gel ein Bandensignal zeigen.

### 3.10.12 Differentielles Screening mittels Dot Blot

Das Differentielle Screening dient der Identifizierung falsch-positiver Sequenzen des Typs I. Sie sind während der SSH durch unspezifische Primer- oder Adapterbindung entstanden. Die Klone der SSH-Bibliothek werden dafür auf zwei identische Nylonmembranen fixiert und mit markierten subtrahierten und unsubtrahierten cDNA-Sonden beider Zelllinien hybridisiert. Eine Chemilumineszenz-erzeugende Reaktion der markierten Sonde mit einem Substrat erlaubt dann eine Detektion. Es wurde das DIG High Prime DNA Labeling and Detection System von Roche verwendet [100]. Die zur Hybridisierung mit einer fixierten DNA vorgesehene Sonde wird mit Hilfe einer Klenow-Polymerase mit alkalilabilem Digoxigenin-11-dUTP markiert. Der alkalilabile Digoxigenin-11-dUTP Baustein besteht aus dem Cardenolid Digoxigenin (DIG) und aus dem durch einen länger-kettigen „Spacer“ verbundenen Desoxyribonukleotid dUTP (s. Abb. 17).

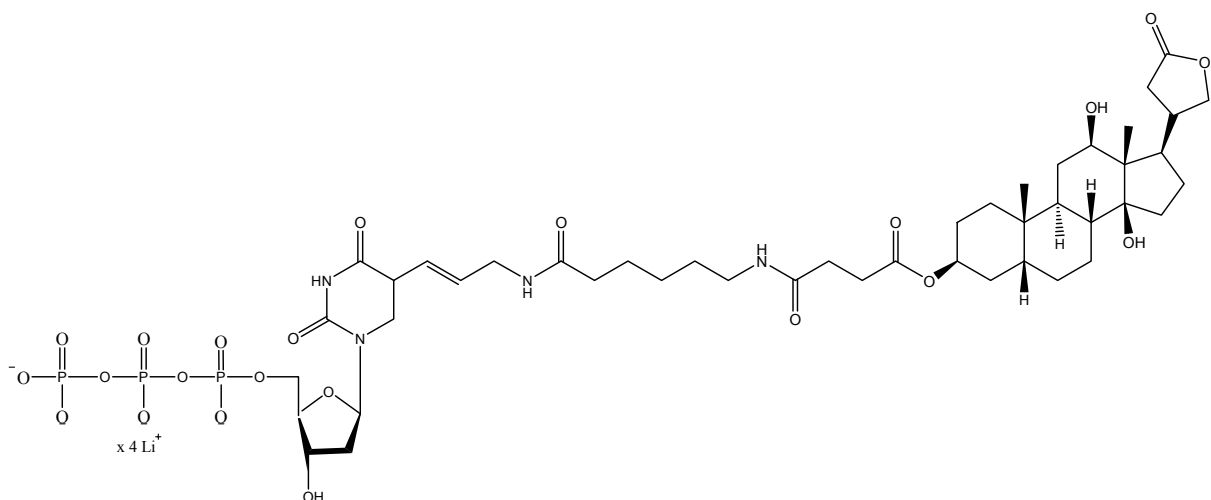
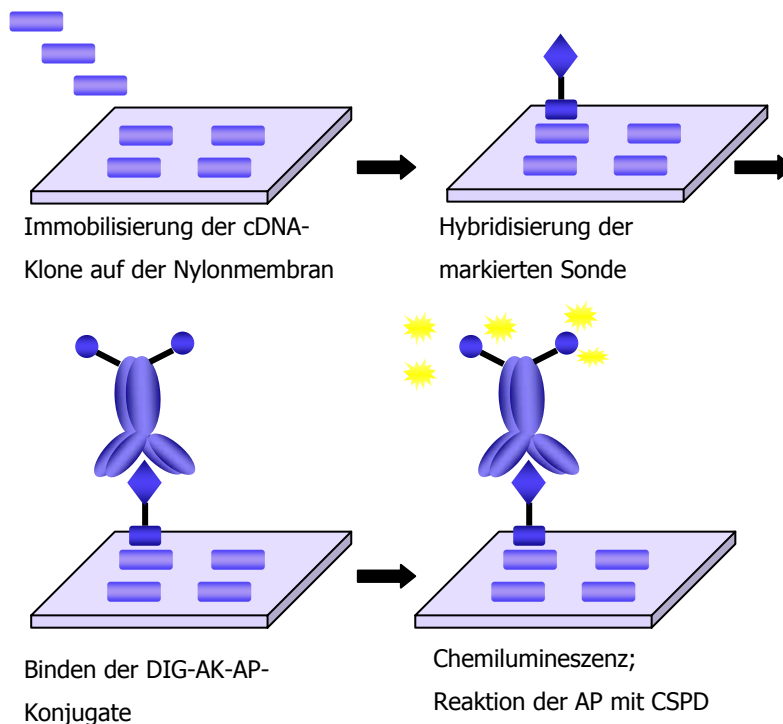


Abb. 17: DIG-dUTP.

Die Klenow-Polymerase verlängert die 3'-OH-Enden von Random-Hexameren, welche ihr als Primer dienen. Neben den „normalen“ Desoxyribonukleotiden wird bei der Elongation im Durchschnitt alle 20-25 Basen ein DIG-11-dUTP in den neuen Strang eingebaut. Ein zu geringer Abstand der DIG-Moleküle würde im Folgenden die Anlagerung des relativ voluminösen DIG-Antikörpers sterisch hindern.

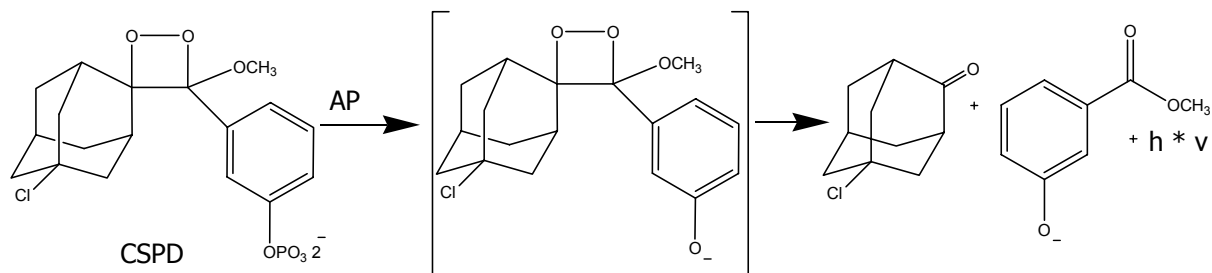
Die DIG-markierten und hybridisierten Sonden reagieren in einer immunologischen Reaktion zunächst mit einem DIG-Antikörper (DIG-AK). Der DIG-AK ist mit einer alkalischen Phosphatase (AP) konjugiert. Dieses Enzym setzt ein Chemilumineszenz-Substrat um, welches Licht produziert, das durch Belichtung eines Röntgenfilmes nachgewiesen werden kann. Das Prinzip der immunologischen Detektion ist in Abb. 18 dargestellt.



**Abb. 18: Das Prinzip der immunologischen Detektion des DIG-Systems.**

Der Chemilumineszenznachweis (s. Abb. 19) entsteht durch eine enzymatische Spaltung des Chemilumineszenz-Substrates CSPD (Dinatrium-3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxethan-3,2'-(5'-chlor)-tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]-decan-4-yl)-phenylphosphat) mittels einer alkalischen Phosphatase. Diese dephosphoryliert ihr Substrat CSPD. Das

*instabile Zwischenprodukt zerfällt und es wird Licht der Wellenlänge 477 nm emittiert, welches dann auf einem Röntgenfilm zur Belichtung führt.*



**Abb. 19:** Die Chemilumineszenz-Reaktion von CSPD mit der alkalischen Phosphatase.

### DIG-DNA Markierung

In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden je herzustellender Sonde 100 ng Template-DNA mit Ampuwa Wasser auf ein Volumen von 16 µl gebracht. Es folgte die Denaturierung der DNA durch Erhitzen auf 95 °C für 10 min und anschließend ein sofortiges Kühlen auf Eis. Das DIG-High Prime (enthält Klenow-Polymerase, dNTPs, DIG-dUTP, Random Primer und Puffer) wurde gründlich gemischt und 4 µl davon zu der denaturierten DNA hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C. Durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) und Erhitzen auf 65 °C für 10 min wurde die Reaktion gestoppt. Tab. 32 zeigt die für die Herstellung der Sonden verwendeten Proben.

**Tab. 32:** Die für die Herstellung der Sonden eingesetzten Proben und deren Eigenschaften.

Sonde	Herkunft	Eigenschaft
cis unsubtrahiert	cDNA aus der Zelllinie A2780cis	Ausgangs-cDNA für die SSH; alle Gene der Zelllinie A2780cis vorhanden; teilweise gering exprimiert
sens unsubtrahiert	cDNA aus der Zelllinie A2780	Ausgangs-cDNA für die SSH; alle Gene der Zelllinie A2780 vorhanden; teilweise gering exprimiert
cis subtrahiert	DNA aus der MOS-PCR (S. 80); A2780cis-A2780	DNA differentiell exprimierter Gene der Zelllinie A2780cis; angereichert durch PCR
sens subtrahiert	DNA aus der MOS-PCR (S. 80); A2780-A2780cis	DNA differentiell exprimierter Gene der Zelllinie A2780; angereichert durch PCR

### **Bestimmung der Effizienz der Markierungsreaktion**

*Zur Untersuchung der Markierungseffizienz wird eine direkte Methode gewählt, bei der die markierte Probe mit einer markierten Kontroll-DNA bekannter Konzentration verglichen wird. Dazu werden Proben und Kontrolle in bestimmten Konzentrationen auf eine Nylonmembran aufgetragen und durch eine immunologische Reaktion mit Anti-DIG-AP-Konjugat und CSPD als Substrat detektiert.*

Eine Verdünnungsreihe der DIG-markierten Kontroll-DNA und der DIG-markierten Proben wurde mit DNA-Verdünnungspuffer mit den folgenden Konzentrationen hergestellt: 10 pg/μl; 3 pg/μl; 1 pg/μl; 0,3 pg/μl; 0,1 pg/μl. Die Ausgangsmenge der DIG-markierten Probe wurde anhand der Angaben des Herstellers abgeschätzt. Bei einer in die Markierungsreaktion eingesetzten Menge von 100 ng und einer Inkubationszeit von 20 h kann von einer entstandenen DNA-Menge von 1500 ng ausgegangen werden.

Je 1 μl der Verdünnungen der markierten Probe und der Kontroll-DNA wurden auf eine Nylonmembran aufgebracht. Zur Fixierung der DNA wurde die Membran 2 h bei 80°C erhitzt. Anschließend folgte die Hybridisierung der DIG-markierten Sonden, ein stringentes Waschen, die immunologische Detektion und die Entwicklung auf einem Röntgenfilm (s. u.).

### **DNA Transfer und Fixierung**

Es wurden je 10 μl der PCR-Produkte (aus PCR von E. coli-Lysaten; S. 84; 1 μl = 2 ng; UV-Messung) zunächst unter Zusatz von 1,0 μl 3,4 N NaOH für 10 min bei 95 °C denaturiert. Nach sofortigem Abkühlen auf Eis wurden je 5 μl der DNA auf zwei positiv geladene Nylonmembranen (PALL Biodyne Plus) in 1 μl Schritten aufgebracht. Dann wurden die Membranen mit TE-Puffer pH 7,5 neutralisiert und anschließend mit Millipore-Wasser gewaschen. Durch Inkubation in einem Ofen bei 80 °C für 2 h wurde die DNA fixiert. Die Membranen wurden in Duplikaten erstellt, um sie anschließend parallel mit den Sonden der beiden Zelllinien A2780 und A2780cis inkubieren und vergleichen zu können.

## Hybridisierung

Die Hybridisierung der DIG-markierten Sonden mit der auf der Membran fixierten DNA erfolgte über Nacht bei 42 °C (Sonden aus unsubtrahierter cDNA) bzw. 55 °C (Sonden aus subtrahierter cDNA). Da die subtrahierten Sonden cDNA-Fragmente enthalten, die mittels PCR während der SSH angereichert wurde, wurde hier eine höhere, und somit spezifischere Hybridisierungstemperatur gewählt. Zur Vorbereitung wurde die DIG-Easy-Hyb Lösung zunächst auf die Hybridisierungstemperatur vorgewärmt. Es folgte eine Prähybridisierung der Membran mit DIG-Easy-Hyb für 30 min. Die DIG-markierten Sonden (25 ng/ml DIG Easy-Hyb) wurden durch Erwärmen auf 95 °C für 5 min denaturiert. Bevor die DIG-markierten Sonden zur vorgewärmten DIG-Easy-Hyb Lösung gegeben wurden, folgte ein schnelles Abkühlen auf Eis. Bereits verwendete und in DIG-Easy-Hyb gelöste Sonden wurden bei 68 °C für 5 min denaturiert.

## Stringentes Waschen

*Das stringente Waschen dient der vollständigen Entfernung der nicht- und unspezifisch gebundenen markierten Sonde. Der erste Waschschrift mit einem Waschpuffer mit hoher Salzkonzentration bei niedriger Temperatur ist weniger stringent und entfernt unspezifisch gebundene Sonde. Der zweite Waschschrift mit einem Puffer geringerer Salzkonzentration und bei höherer Temperatur ist stärker stringent. Damit sollen unspezifisch hybridisierte Sonden geringer Homologie entfernt werden.* Es wurden die Waschbedingungen aus Tab. 33 eingehalten.

**Tab. 33: Waschbedingungen für das stringente Waschen.**

<b>Waschbedingungen subtrahierte Proben</b>	
Waschen mit 2X SSC, 0,1% SDS	2 x 5 min bei RT
Waschen mit 0,5X SSC, 0,1% SDS (vorgewärmt auf 68 °C)	2 x 15 min, 68 °C unter ständigem Schütteln
<b>Waschbedingungen unsubtrahierte Proben</b>	
Waschen mit 2X SSC, 0,1% SDS	2 x 5 min bei RT
Waschen mit 1X SSC, 0,1% SDS (vorgewärmt auf 65 °C)	2 x 15 min, 65 °C unter ständigem Schütteln

### Immunologische Detektion

Die folgenden Inkubationsschritte (s. Tab. 34) wurden in einem verschließbaren 15-ml-PP-Röhrchen mit Aluminiumstangen-Einsatz zur Reduktion des Volumens und bei RT nacheinander durchgeführt.

**Tab. 34: Inkubationsbedingungen der Nylonmembran.**

Schritt	Zeit [min]
Inkubation in Maleinsäure-Puffer	2
Inkubation mit Blockierungs-Lösung	30
Inkubation mit Antikörper-Lösung	30
Waschen mit Wasch-Puffer	2 x 15
Äquilibrieren in Detektions-Puffer	2-5

Die Membran wurde dann in eine Entwicklungskassette eingelegt, sodass die mit der DNA beladene Seite nach oben zeigte. Anschließend wurde die Membran mit der CSPD-Lösung benetzt und sofort mit einer Frischhaltefolie bedeckt. Es wurde darauf geachtet, dass die Lösung gleichmäßig und ohne Luftblasen auf der Membran verteilt ist. Anschließend wurde die Membran für 5 min bei RT inkubiert, die überschüssige Flüssigkeit am Rande der Folie entfernt und die geschlossene Kassette bei 37 °C für 10 min inkubiert. Anschließend wurde in einer Dunkelkammer ein Röntgenfilm in die Entwicklungskassette, die die Membran enthielt, eingelegt und für 10-30 min bei RT belichtet. Dann wurde zunächst das Negativ 3 min in der Entwicklungslösung inkubiert. Nach 1minütigem Waschen in Millipore-Wasser folgte eine Inkubation in einer Fixierlösung für 1 min. Die Belichtung des Films bei den subtrahierten Proben (s. Tab. 32) erfolgte für 10 min, und bei den unsubtrahierten Proben (s. Tab. 32) für 30 min.

### Strippen der Membran

*Die Membran kann für weitere Hybridisierungsreaktionen verwendet werden, da die hybridisierte DNA von der Membran „gewaschen“ werden kann. Die Alkalilabilität des DIG-11-dUTP Bausteins ist für diese Anwendung von Vorteil. Die Behandlung der*



*Membran mit NaOH führt zu einer Denaturierung und somit Ablösung der gebundenen Sonde.*

Die mit DIGmarkierten Sonden hybridisierten Membranen wurden mit Aqua bidest. gründlich gewaschen und anschließend zum Lösen der markierten Sonden 2 mal 15 min mit Waschlösung (0,2 M NaOH, 0,1% SDS) bei 37 °C und 100 rpm gewaschen. Es folgte noch ein Waschschriff mit 2X SSC für 5 min bei 100 rpm und RT. Dann konnten die Membranen in 2X Maleinsäurepuffer gelagert werden.

### Auswahl der Klone

In Tab. 35 sind die möglichen Ergebnisse und Interpretationen der Dot Blot Untersuchungen nach dem PCR-Select Differential Screening Kit User Manual der Firma Clontech aufgelistet. Entsprechend dieser Tabelle wurden Klone, die ein differentielles Signal zeigten, ausgewählt.

**Tab. 35: Interpretation der Ergebnisse des Differentiellen Screenings mittels Dot Blot. Die Tabelle ist leicht modifiziert dem PCR-Select Differential Screening Kit User Manual von Clontech entnommen [96]. + = Signal vorhanden; ++ = starkes Signal vorhanden; - = kein Signal vorhanden.**

Art der Sonde				Interpretation
cis subtr.	sens subtr.	cis unsubtr.	sens unsubtr.	
+	-	+	-	Wahrscheinlich differentiell exprimierte Gene.
+	-	-	-	Wahrscheinlich differentiell, aber gering exprimierte Gene; sind in subtr. Probe angereichert, können aber auch Typ I-Fehler darstellen.
++	+	+	+/-	Unterschiedlich starke Signale in subtrahierten Proben (cis – sens) > 4fach: wahrscheinlich differentiell exprimierte Gene < 3fach: Unterschied wahrscheinlich aufgrund zufälliger Schwankungen in der Effizienz der beiden Subtraktionen.
+	-	+	+	Keine differentielle Expression; falsch positive Sequenzen des Typs I und II (Unterdrückung durch MOS).
+	+	+	+	Keine differentielle Expression
-	-	-	-	Keine differentielle Expression; Einzelne Kopien nicht-differentiell exprimierter Sequenzen, die zufällig in subtr. Probe gelangt sind. Konzentration ist für eine Hybridisierung zu gering.

### 3.10.13 Sequenzierung und BLAST Datenbanksuche

*Für die Sequenzierung der DNA-Fragmente der ausgewählten Klone mussten diese erneut aus den E. coli-Lysaten mittels PCR amplifiziert werden, um einen Angriffspunkt für die M13 Sequenzierungsprimer zu schaffen. Dies geschah durch den Einsatz von M13-Primern, die einen Angriffspunkt vor und hinter den DNA-Fragmenten auf dem pCR 2.1-TOPO Vektor finden. Die PCR-Produkte tragen dementsprechend dem M13-Primer komplementäre Sequenzen an beiden Enden.*

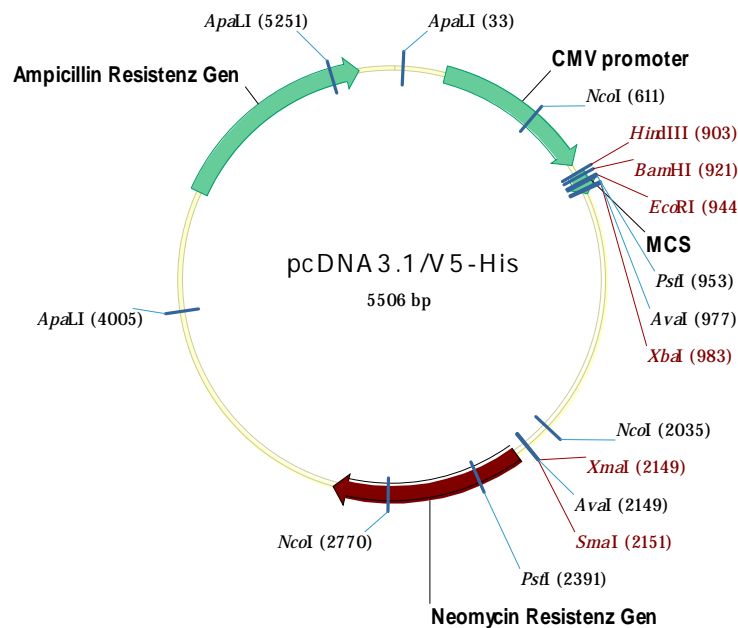
Die PCR-Bedingungen waren die gleichen wie bei der PCR aus E. coli-Lysaten nach der Transformation (S. 84). Der Ansatz wurde jedoch auf 10 µl reduziert und als Primer dienten der rechte und der linke M13-Primer (je 500 nM Endkonzentration). Anschließend wurden die PCR-Produkte wie in Kapitel 3.8 beschrieben, gefällt und in je 10 µl Ampuwa aufgenommen. Die Sequenzierung erfolgte bei der Firma MWG-Biotech unter der Verwendung von M13-Primern.

Die DNA-Sequenzen wurden dann mit dem BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Algorithmus [101] in der Sequenz-Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) auf Homologien untersucht. Verwendet wurde dafür das „Nucleotide-Nucleotide BLAST“ Programm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

## 3.11 Klonierung von EMP1

Das Gen EMP1 sollte im Folgenden funktionell untersucht werden. Der von der Firma Biocat bezogene cDNA-Klon MHS1010-925006 enthielt den offenen Leserahmen (Open Reading Frame, ORF) des Gens EMP1 in dem Vektor pCMV-SPORT6 als DH10B E. coli-Kultur. Um den Effekt einer EMP1-Überexpression in den Zelllinien A2780 und A2780cis untersuchen zu können, musste das Gen zunächst in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert werden. Für diese Zwecke wurde der pcDNA3.1/V5-His Vektor (s. Abb. 20) der Firma Invitrogen gewählt. Er enthält sowohl ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion in Bakterien als auch ein Neomycin-Resistenzgen zur Selektion in Säugetierzellen. Des Weiteren besitzt er einen CMV-Promotor, der das effiziente Ablesen des danach eingebauten Inserts (hier EMP1) in den humanen Zelllinien ermöglicht. An die Insertstelle schließt sich ein sechsfacher His-Tag an. Da

zu dem Zeitpunkt des Versuchsstartes noch kein kommerziell erhältlicher EMP1-Antikörper vorhanden war, wurde dieser His-markierenden Vektor gewählt. Da jedoch später ein EMP1-Antikörper zur Verfügung stand, wurden im Folgenden ORFs von EMP1 eingebaut, die ein Stopp-Codon trugen, sodass dieser His-Tag nicht abgelesen wurde.



**Abb. 20: Vektorkarte von pcDNA3.1/V5-His.**

Um beim Einklonieren des ORFs von EMP1 den Triplet-Code einhalten zu können wurde die Variante B des Vektors gewählt.

### 3.11.1 Amplifikation des ORFs von EMP1 mittels PCR

Aus den Lysaten von *E. coli*-Bakterien, die mit dem von der Firma Biocat bezogenen Vektor pCMV-SPORT6-EMP1 transfiziert worden sind, wurde der offene Leserahmen von EMP1 mit Überhängen für den sich anschließenden Restriktionsverdau mittels PCR amplifiziert. Die Lysate wurden aus Schüttelkulturen von *E. coli*-Bakterien gewonnen. Die Bakterien wurden in 500 µl LB-Medium mit einem Zusatz von Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) bei 37 °C und unter Schütteln bei 200 rpm für 3 h aus einigen µl einer Glycerol-Stammkultur herangezogen. 5 µl dieser Kultur wurden mit 15 µl Wasser für 10 min bei 100 °C aufgekocht. Für die PCR wurde folgender Ansatz

aus Tab. 36 pipettiert. Es wurden jeweils zwei 50- $\mu$ l-Ansätze pro Probe angefertigt und nach der PCR-Reaktion vereinigt.

**Tab. 36: Ansatz für die PCR-Reaktion zur Amplifikation des ORFs von EMP1 aus E. coli-Lysaten.**

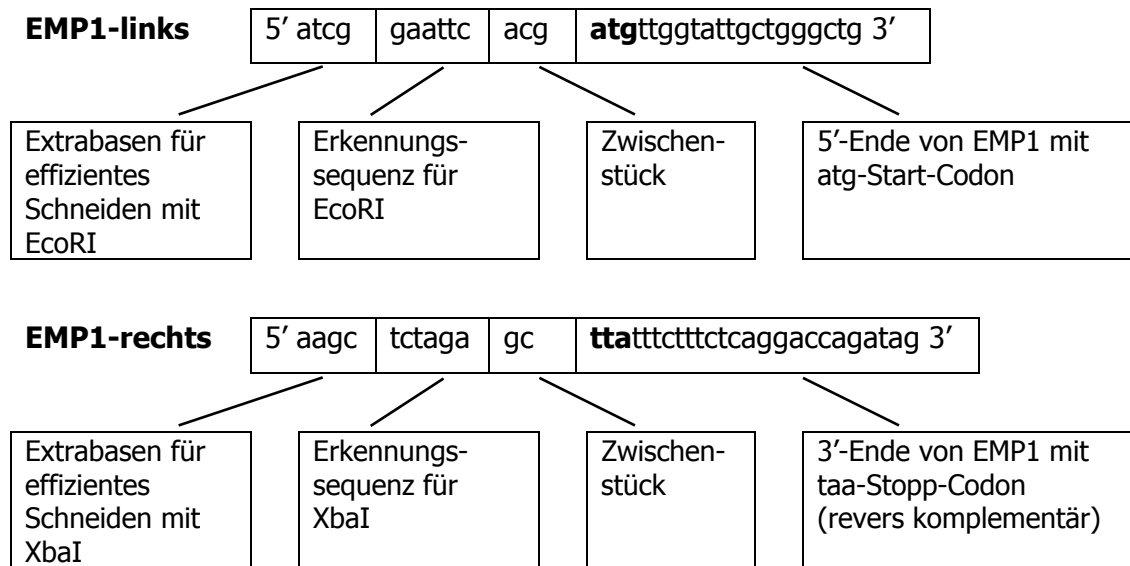
Komponente	Volumen [ $\mu$ l]	Endkonzentration
5X Phusion-HF-Puffer	10	1 X
dNTPs [1 mM]	10	200 $\mu$ M
Primer-EMP1-links [12,5 $\mu$ M]	2	0,5 $\mu$ M
Primer-EMP1-rechts [12,5 $\mu$ M]	2	0,5 $\mu$ M
DNA Template (E. coli-Lysat)	10	
DMSO	1,65	3 %
Phusion-DNA-Polymerase [1:10 verdünnt mit Ampuwa]	5	0,02 U/ $\mu$ l
Ampuwa	ad 50	

Die PCR-Reaktion wurde mit folgenden Konditionen (s. Tab. 37) durchgeführt.

**Tab. 37: PCR Bedingungen für die Amplifikation des ORFs von EMP1 aus E. coli Lysaten.**

Zyklus-Schritt	Temp. [ $^{\circ}$ C]	Zeit	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	98	30 sec	-
Denaturierung	98	10 sec	
Annealing	65	15 sec	30
Elongation	72	15 sec	
Finale Elongation	72	10 min	-

Die für die Amplifikation des EMP1-Fragmentes verwendeten Primer sind wie in Abb. 21 dargestellt aufgebaut. Vor der jeweiligen Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym wurden am 5'-Ende einige zusätzliche Basen eingeführt, die zu einem effizienteren Arbeiten der Enzyme führen. An die Erkennungssequenz fügt sich in Richtung 3'-Ende dann ein kurzes Zwischenstück von 2-3 Basenpaaren an. Anschließend folgt für den linken Primer die atg-Start-Sequenz des EMP1-Genes und für die rechten Primer entsprechend die Sequenz des Genes am 3'-Ende in revers komplementärer Darstellung.



**Abb. 21: Aufbau der Primer für die Amplifikation des ORFs von EMP1 mittels PCR.**

### 3.11.2 DNA-Extraktion der PCR-Fragmente

Die DNA wurde mit dem „DNA Extraction Kit“ der Firma Fermentas, St. Leon-Rot Life Sciences nach dem vorgegebenen Protokoll isoliert. Es handelt sich dabei um eine modifizierte Methode nach Vogelstein und Gillespie [102], die auf der Bindung von DNA an Glasoberflächen in der Gegenwart von chaotropen Salzen beruht. Es wurden jeweils 80 µl des PCR-Produktes mit 6 µl suspendiertem Silicapulver aufgereinigt. Nach dem Auswaschen von Verunreinigungen und Salzen wurde die gebundene DNA mit 3 mal 10 µl TE-Puffer, pH 7,5 eluiert.

Die Konzentration der isolierten und gereinigten DNA wurde dann mittels UV-Spektrometrie bei einer Wellenlänge von 260 nm, wie unter 3.7.1 beschrieben, ermittelt.

### 3.11.3 Restriktionsverdau

Um die EMP-Amplifikate und den pcDNA3.1/V5-His Vektor miteinander ligieren zu können, mussten die DNA-Fragmente und der Vektor zunächst mittels Endonukleasen geschnitten werden. Dafür wurden die beiden Restriktionsenzyme EcoRI und XbaI verwendet. Die Schnittstellen für die beiden Enzyme wurden zuvor mittels PCR angefügt (s. 3.11.1). Es wurde der Ansatz aus Tab. 38 für den

Restriktionsverdau des EMP1-PCR-Amplifikates und des pcDNA3.1/V5-His Vektors mit EcoRI pipettiert.

**Tab. 38: Ansatz für den Restriktionsverdau.**

Komponente	Volumen
DNA	Vektor: 10 µg PCR-Produkt: 25 µl (aus 30 µl aufgereinigter DNA)
EcoRI [12 U/µl]	2 µl
Puffer Tango™	10 µl
Ampuwa-Wasser	ad 50 µl

Nach einer Inkubation von 2 h bei 37 °C wurde der Restriktionsverdau mit XbaI angeschlossen. Dazu wurden 2,5 µl Enzym (XbaI; 10 U/µl) und 47,5 µl H<sub>2</sub>O zu einem Endvolumen von 100 µl zu jedem Ansatz hinzupipettiert. Es folgte eine erneute Inkubation bei 37 °C für 2 h. Zur Inaktivierung der Enzyme wurden die Proben anschließend auf 65 °C für 10 min erhitzt.

### 3.11.4 Dephosphorylierung des Vektors

Der linearisierte Vektor wurde mit einer Phosphatase am 5'-Ende dephosphoryliert, um in der sich anschließenden Ligationsreaktion die Religation des Vektors zu unterdrücken. Dafür wurden 4 µl (4 U) der CIAP-Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) und 11 µl 10X CIAP-Phosphatase Reaktionspuffer zu dem Restriktionsverdau-Ansatz des Vektors pcDNA3.1/V5-His gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz anschließend für 10 min auf 85 °C erhitzt.

### 3.11.5 Kristallviolett-Gel zur Isolierung der geschnittenen DNA

Nach dem Restriktionsverdau wurden die DNA-Fragmente auf einem mit Kristallviolett gefärbten Agarose-Gel getrennt. Für die Vektor-DNA wurde ein 0,8%iges Gel und für das PCR-Fragment ein 1%iges Gel verwendet. Das Gel wurde bei 45 V für 25 min entwickelt. Durch den Kristallviolett-Zusatz konnten die DNA-Banden sichtbar gemacht und ohne den Einsatz von DNA-schädigendem UV-Licht aus

dem Gel ausgeschnitten werden. Anschließend wurde die DNA mit dem „DNA Extraktion Kit“ der Firma Fermentas aufgereinigt (s. 3.11.2). Die isolierte und aufgereinigte DNA wurde jeweils in 40 µl Ampuwa-Wasser aufgenommen.

### 3.11.6 Ligation der DNA-Fragmente

Die Ligation des EMP1-DNA-Fragmentes mit dem Vektor erfolgte mittels T4-DNA-Ligase. Das molare Verhältnis von Vektor zu Fragment betrug 1:3 und wurde nach folgender Formel 14 berechnet.

**Formel 14**

$$m_{\text{Fragment}} [\text{ng}] = \frac{m_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Fragment}} [\text{bp}] \times 3}{\text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]}$$

Für die Ligationsreaktion wurde folgender Ansatz aus Tab. 39 pipettiert.

**Tab. 39: Ligationsansatz für die Ligation des pcDNA3.1/V5-His-Vektors mit dem EMP1-DNA-Fragment.**

Komponente	Menge
DNA-Fragment	3fache molare Masse des Vektors
Vektor-DNA (pcDNA3.1/V5-His)	100 ng
Ligationspuffer 10X	2 µl
T4-DNA-Ligase [1 U/µl]	2 µl
Ampuwa-Wasser	ad 20 µl

Der Ansatz wurden für 1 h bei 22 °C inkubiert und durch anschließendes Erhitzen auf 65 °C für 10 min wurde die Reaktion gestoppt.

Anschließend erfolgte die Transformation mit TOP10F' E. coli-Bakterien aus dem TOPO TA Cloning® Kit der Firma Invitrogen (s. S. 82). Es wurde 2,0 µl des Ligationsansatzes für die Transformation verwendet.

### **3.11.7 E. coli-Schüttelkultur**

Es wurden fünf über Nacht auf den Agarplatten gewachsene Kolonien der transformierten E. coli-Bakterien mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 500 µl SOC-Medium (+ 100 µg/ml Ampicillin, Endkonzentration) bei 37 °C und 200 rpm für 2-3 h bis zur Trübung herangezogen. Dann folgte eine weitere Inkubation für 3-4 h in 10 ml LB-Medium (+100 µg/ml Ampicillin, Endkonzentration) bis zur erneuten Trübung. Zur Langzeitlagerung wurden anschließend jeweils 900 µl Bakterien-Suspension mit 300 µl 60%iger Glycerol-Lösung versetzt und bei -80 °C eingefroren.

### **3.11.8 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli**

Die Isolierung der Plasmid DNA erfolgte mit dem „High Purity Plasmid Miniprep System“ von Marligen Biosciences. Ein Aliquot des TE-Puffers (pH 8,0) wurde vor dem Beginn der Arbeiten auf 65 °C erwärmt. 10 ml der E. coli-Kultur wurden zum Ernten der Zellen bei 4000 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde dann in 250 µl Zell-Suspensionspuffer resuspendiert, bis es homogen suspendiert war. Zum Lysieren der Zellen wurde 250 µl Zell-Lysierpuffer hinzugegeben und vorsichtig durch fünfmaliges Kippen des Röhrchens gemischt. Der Ansatz wurde dann für 5 min bei RT inkubiert. Zum Neutralisieren wurden 350 µl Neutralisationspuffer hinzugegeben und durch sofortiges Kippen des Röhrchens gemischt. Danach wurde für 10 min bei 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Zentrifugationssäule geladen und diese in ein 2-ml-Waschröhrchen gestellt. Zur Elution der Flüssigkeit wurde für 1 min bei 12000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend verworfen. Dann wurden 700 µl Waschpuffer auf die Säule geladen und diese erneut für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde ebenfalls verworfen und zum vollständigen Entfernen des Waschpuffers wurde erneut für 1 min zentrifugiert. Zur Elution der Plasmid-DNA wurde die Säule dann in ein 1,5-ml-Mikrozentrifugations-Röhrchen gestellt und mit 75 µl vorgewärmtem TE-Puffer (pH 8,0) beladen. Nach einer Inkubation bei RT für 1 min wurde die DNA durch Zentrifugation bei 12000 g für 2 min eluiert.

Zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung des EMP1-ORFs in den pcDNA3.1/V5-His Vektor wurden 2 µg Plasmid-DNA (UV-Quantifizierung) zur Sequenzierung an die



Firma MWG Biotech (Ebersberg) gegeben. Die Vorbereitung der Probe zur Sequenzierung erfolgte analog der Beschreibung im Kapitel 3.8. Zur Sequenzierung wurde der T7 Primer verwendet.

## 3.12 Überexpression von EMP1 in Ovarialkarzinom-Zelllinien

*Es sollte die Überexpression des EMP1 Genes in den Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780cis durch Transfektion des EMP1-tragenden Expressionsvektors pcDNA3.1/V5-His-EMP1 induziert werden, um den Einfluss von EMP1 auf die Resistenz gegenüber Cisplatin durch funktionelle Tests zu untersuchen.*

### 3.12.1 Transfektion von A2780 und A2780cis

#### Transfektionsoptimierung

Um die optimalen Transfektionsbedingungen für die Zelllinien A2780 und A2780cis zu ermitteln, wurden mehrere Transfektionsvorversuche mit dem Plasmid pcDNA<sup>TM</sup>1.2/V5-GW/lacZ durchgeführt. Es wurde die Transfektion mit Calciumphosphat und mit Effectene<sup>TM</sup> (Qiagen) getestet. Für beide Methoden wurden drei verschiedene Plasmid-DNA-Konzentrationen untersucht. Zusätzlich wurden bei der Calciumphosphat-Methode noch die Vorbehandlung der Zellen mit Chloroquin [103] und eine Glycerol-Schock-Behandlung getestet, die beide die Transfektionseffizienz steigern sollen.

#### Transfektionsvorversuche mit Calciumphosphat

Die Transfektionsvorversuche wurden in 24-Well-Platten durchgeführt. Am Vortag des Versuches wurden 60000 Zellen/Well ausgesät. 1,5 h vor der Transfektion wurde dann am Versuchstag zunächst das Nährmedium gewechselt (300 µl je Well). Das neue Nährmedium enthielt kein FKS. Ein Ansatz je DNA-Konzentration wurde zusätzlich mit 1,5 µl Chloroquin-Lösung (Endkonzentration 40 µg/ml) inkubiert. Dann wurde ein DNA-Präzipitationsansatz pro DNA-Konzentration (0,2; 0,5 und 1,0 µg/cm<sup>2</sup>) nach Tab. 40 hergestellt. Dieser Ansatz aus Tab. 40 wurde tropfenweise und unter Schütteln zu 44 µl 2X BBS-Puffer gegeben und dann 15 min bei RT inkubiert.

**Tab. 40: Präzipitationsansatz für den Transfektionsvorversuch mittels Calciumphosphat.**

Komponente	1X Ansatz
DNA (pcDNA <sup>TM</sup> 1.2/V5-GW/ <i>lacZ</i> )	0,2; 0,5 und 1,0 µg/cm <sup>2</sup>
CaCl <sub>2</sub> [2,5 M]	4,4 µl
0,1X TE-Puffer, pH 7,5	ad 44 µl

Die Mischung aus 44 µl Präzipitationsansatz und 44 µl 2X BBS wurde anschließend tropfenweise und unter leichtem Schütteln der Platte auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C und 3 % CO<sub>2</sub> für 18 h. Nach dieser Zeit wurde das DNA-haltige Nährmedium entfernt, mit 1X PBS-Puffer gewaschen und 300 µl FKS-haltiges Nährmedium (5 %ig) zugegeben. Bei einem Ansatz je DNA-Konzentration wurde zusätzlich noch eine Glycerol-Behandlung nach 2 h durchgeführt. Dafür wurden vor der Zugabe des neuen Nährmediums 100 µl 15 %iges Glycerol für 2 min auf die Zellen gegeben und anschließend mit 1X PBS-Puffer gewaschen.

### Transfektionsvorversuche mit Effectene<sup>TM</sup>

*Bei dem Transfektionsreagenz Effectene<sup>TM</sup> handelt es sich um nicht-liposomale Lipide, welche sich zu einer Mizellstruktur mit einer positiven äußeren Ladung zusammenlagern. Die durch die Phosphatgruppen negativ geladenen Nukleinsäuren werden zunächst durch einen positiv geladenen „Enhancer“ stark kondensiert und anschließend in die Mizellen aufgenommen. Die nach außen positiv geladenen Transfektionskomplexe binden an die negativ geladene Oberfläche der Zellmembran und werden mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen.*

Ebenso wie bei den Versuchen mit Calciumphosphat wurden am Tag vor dem Versuch 60000 Zellen/Well in eine 24-Well-Platte ausgesät. Es wurde bei diesem Versuch zusätzlich noch der Einfluss von FKS im Nährmedium untersucht. Der Ansatz wurde also in zweifacher Ausführung angefertigt, wobei einer mit FKS und der andere ohne FKS im Nährmedium durchgeführt wurde. Ebenso wurde das Verhältnis von DNA zu Effectene<sup>TM</sup> variiert (1:10 und 1:25). Das Pipettierschema ist in Tab. 41 abgebildet.

**Tab. 41: Pipettierschema für den Transfektionsvorversuch mit Effectene™. Die Ansätze wurden in doppelter Ausführung angefertigt und im Folgenden mit und ohne FKS-Zusatz im Nährmedium behandelt.**

Komponente	Ansätze 1-6					
	1	2	3	4	5	6
DNA [ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ]	0,1	0,1	<b>0,2</b>	0,2	0,3	0,3
Enhancer [ $\mu\text{l}$ ]	0,8	0,8	<b>1,6</b>	1,6	2,4	2,4
Effectene™ [ $\mu\text{l}$ ]	1,0	2,5	<b>2</b>	5	3	7,5
Puffer EC [ $\mu\text{l}$ ]	57,2	55,7	<b>54,4</b>	51,4	51,6	47,1

Zunächst wurde die DNA mit dem Puffer EC verdünnt und dann der Enhancer in einem Verhältnis von 1:8 (DNA:Enhancer) dazugegeben. Dann wurde kurz geschüttelt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Transfektionsreagenz Effectene™ zugefügt, der Ansatz durch fünfmaliges Hoch- und Runterpipettieren gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurde das Nährmedium der Zellen abgenommen, die Zellen mit 1X-PBS Puffer gewaschen und 350  $\mu\text{l}$  frisches Nährmedium zugegeben. Dem Transfektionsansatz wurden ebenso 350  $\mu\text{l}$  Nährmedium zugesetzt und durch zweimaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Dann wurde der Ansatz sofort tropfenweise auf die Zellen gegeben. Es wurde ebenso für 18 h mit der DNA inkubiert und dann das Nährmedium gewechselt.

### **Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels X-Gal Anfärbung**

Der Vektor pcDNA™1.2/V5-GW/lacZ beinhaltet ein lacZ-Gen. Dieses kodiert für das Enzym  $\beta$ -Galactosidase. Die Aktivität der synthetisierten  $\beta$ -Galactosidase wurde 48 h nach der Transfektion mittels Blaufärbung der Zellen durch X-Gal kontrolliert. Dabei wird dem Medium der Indikator X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) zugesetzt. Das Substrat X-Gal wird von der prokaryontischen  $\beta$ -Galactosidase an der glycosidischen Bindung hydrolysiert. Der Indolyl-Rest wird im Folgenden durch das Redoxsystem  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/ \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  zum Indoxyl oxidiert und dimerisiert dann zu dem blauen Indigo-Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo (s. Abb. 16). Es handelt sich dabei um das gleiche Prinzip wie bei der Blau-Weiß-Selektion von Bakterienkolonien (s. S. 83).

44 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 1X PBS-Puffer gewaschen und mit 300 µl 1X Fixierungspuffer für 10 min bei RT inkubiert. Die Färbelösung wurde nach Tab. 42 für eine 24-Well-Platte gemischt.

**Tab. 42: Ansatz der X-Gal-Färbelösung.**

Komponente	Volumen [µl]
MgCl <sub>2</sub> [200 mM]	64
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> [400 mM]	64
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> [400 mM]	64
X-Gal Lösung [20 mg/ml]	200
1X PBS-Puffer	6008
Gesamtvolumen	6400

Nach der Fixierung der Zellen wurden sie zweimal mit 1X PBS-Puffer gewaschen und mit 220 µl je Well Färbelösung für 0,5 bis 2 h bis zur Blaufärbung bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung der Färbung erfolgte unter einem Lichtmikroskop. Es wurde der Anteil der gefärbten Zellen und somit die optimale Transfektionsmethode und -bedingung ermittelt. Es zeigte sich, dass der Ansatz mit 0,2 µg DNA/cm<sup>2</sup> und einem Verhältnis von DNA zu Effectene™ von 1:10 das beste Ergebnis lieferte.

### **Transfektion von A2780 und A2780cis mit Effectene™**

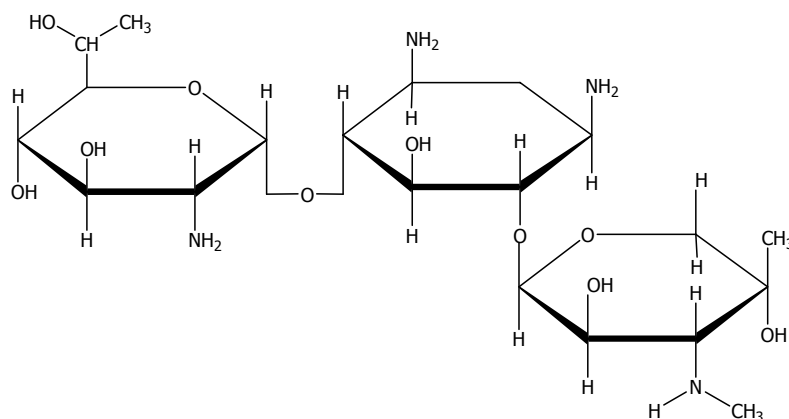
24 h vor der Transfektion wurden je 500000 Zellen pro Well der Zelllinie A2780 und 600000 Zellen pro Well der Zelllinie A2780cis in eine 6-Well-Platte ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden jeweils 2 µg Plasmid-DNA (pcDNA3.1/V5-His-EMP1) nach den Angaben des Protokolls behandelt (s. Transfektionsoptimierung, Ansatz Nr. 3, Tab. 41) und die Transfektionskomplexe anschließend auf die Zellen in einem Well einer 6-Well Platte gegeben. Das Verhältnis von DNA zu Effectene™ betrug 1:10. Nach 18 h wurde das Nährmedium abgenommen, zweimal mit 1X PBS-Puffer gewaschen und neues Nährmedium zugegeben.

### 3.12.2 Selektion von transfizierten Zellen durch Geneticin

*Geneticin (G418) (Abb. 22) ist ein Aminoglykosid, welches durch Interaktion mit der 80S-Untereinheit der Ribosomen die Protein-Biosynthese stört. Es wirkt gegenüber pro- und eukaryontischen Zellen toxisch. Transfizierte Zellen tragen auf dem Plasmid pcDNA3.1/V5-His zusätzlich ein Geneticin-Resistenzgen. Durch die Inkubation mit Geneticin sterben Zellen ab, die kein Plasmid aufgenommen haben.*

#### Bestimmung der Geneticin-Konzentration

Da die Sensitivität gegenüber Geneticin von Zelltyp zu Zelltyp variiert, wurde zunächst die Geneticin-Konzentration bestimmt, die bei den nicht-transfizierten Zellen zu einem Absterben führt. Dafür wurden 250000 Zellen je Well der Zelllinien A2780 und A2780cis in eine 6-Well-Platte ausgesät. Nach dem Anheften der Zellen an dem Plattenboden wurde dem Nährmedium Geneticin in fünf Konzentrationen zugesetzt (125, 250, 500, 750 und 1000 µg/ml). Ein Well wurde zur Kontrolle nicht mit Geneticin behandelt. Alle 2-3 Tage wurde das Nährmedium gewechselt und neues Geneticin zugesetzt. Über einen Zeitraum von 10-15 Tagen wurde das Zellwachstum mikroskopisch beobachtet, und die niedrigste Geneticin-Konzentration bestimmt, die in dieser Zeit zu einem kompletten Absterben der Zellen führte.



**Abb. 22: Strukturformel von Geneticin.**

### Generierung stabil transfizierter Einzelklone

Ab dem Zeitpunkt von 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen unter einem Selektionsdruck von 300 µg/ml Geneticin gehalten. Nach 72 h wurden die Zellen durch sehr dünnes Aussähen in 10 cm Zellkulturschalen vereinzelt. Nachdem Kolonien aus einer Zelle bis zu einer mit dem bloßen Auge sichtbaren Größe herangewachsen waren, wurden je Zelllinie 10-20 Kolonien durch Trypsinierung geerntet und separat herangezogen. Die Geneticin-Konzentration wurde dann auf 150 µg/ml reduziert.

### 3.12.3 Test der Einzelklone auf Überexpression von EMP1

#### PCR aus Zell-Lysaten

Zum Test auf EMP1-Expression der Klone wurde aus den Zell-Lysaten eine PCR-Reaktion durchgeführt. Die in einer 24-Well-Platte zu 80 % konfluenten Klone wurden mit 100 µl Trypsin geerntet. 80 µl davon wurden zusammen mit 80 µl 1X PBS-Puffer zentrifugiert, das Pellet anschließend in 50 µl 1X TE-Puffer pH 7,5 aufgenommen und 3-5 min zur Lyse der Zellen aufgekocht. Anschließend wurde folgender PCR-Ansatz aus Tab. 43 pipettiert.

**Tab. 43: PCR-Ansatz für die Untersuchung von Zell-Lysaten.**

Reagenz	Menge [µl]
Template (Zell-Lysat)	2,0
Primer EMP1-293-L-Span [12,5 µM]	0,4
EMP1-293-R [12,5 µM]	0,4
2X QuantiTect™ SYBR® Green Master Mix	5,0
Ampuwa Wasser	2,2
Gesamtvolumen	10

Die PCR-Reaktionsbedingungen sind in Tab. 44 aufgeführt.

**Tab. 44: PCR-Reaktionsbedingungen für die Analyse von Zell-Lysaten.**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl Zyklen
Aktivierung	95	15 min	-
Denaturierung	94	20 sec	
Annealing	59	30 sec	40
Elongation	72	30 sec	
Finale Elongation	50	1 min	-

### Test auf Expressionsebene (qRT-PCR)

Für eine Analyse der EMP1-Expression auf mRNA-Ebene wurden Zellen der Klone, sowie Zellen der Wildtypzelllinien A2780 und A2780cis in einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz wurden die Zellen mit eiskaltem 1X PBS-Puffer gewaschen und sofort die totalRNA mit dem „RNeasy Mini Kit“ der Firma Qiagen über Säulen nach den Anleitungen des Herstellers isoliert. Es wurde ein DNase-Verdau auf der Säule durchgeführt. Dafür wurden 27 U DNaseI (Roche) in 80 µl 1X DNaseI-Puffer für 15 min inkubiert. Die anschließende UV-Quantifizierung, RT-Reaktion und qRT-PCR erfolgten wie bereits vorhergehend beschrieben (s. Kapitel 3.7.1, 3.9.1 und 3.9.3).

## 3.13 Proteinbiochemische Methoden

### 3.13.1 Immunoblot

Die Zellen wurden in T 75 Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 80 % herangezogen. Zur Generierung der Zelllysate wurden die Zellen zunächst zweimal mit eiskaltem 1X PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie in Zell-Lyse-Puffer in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (4000 g, 5 min) wurde der Überstand in neue 1,5 ml Mikro-zentrifugationsröhrchen überführt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde anschließend mit dem Bradford-Test [104] bestimmt, die Proteinproben aliquotiert und bei - 80 °C eingefroren.

Die Taschen eines 12%igen SDS-PAGE-Gels wurden mit jeweils 20 µg Gesamtprotein bzw. 1 µg EMP1-Protein-Standard beladen. Nach der SDS-PAGE wurde das Immunoblotting auf eine PVDF-Membran nach der Semi-Dry-Methode durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen der entsprechenden Primär- und Sekundärantikörper sind in Tab. 45 aufgelistet. Die Entwicklung erfolgte mit dem ECL-System (Enhanced Chemiluminescence) der Firma Amersham Biosciences in der LAS-3000 Intelligent Dark Box mit CCD Kamera.

**Tab. 45: Eingesetzte Konzentrationen der verwendeten primären und sekundären Antikörper.**

<b>Protein-Name</b>	<b>Primärantikörper (Verdünnung/Konzentration)</b>	<b>Sekundärantikörper (HRP-konjugiert)</b>
EMP1	EMP1-Polyklonaler-Antikörper (1:2500)	Rabbit Anti-Mouse IgG (1:4000)
p53	Goat Anti-human p53 IgG (0,5 µg/ml)	Donkey Anti-Goat IgG (1:2000)
p21	Goat Anti-human p21 IgG (0,5 µg/ml)	Donkey Anti-Goat IgG (1:2000)
IGF-1R	Goat Anti-human IGF-1R IgG	Donkey Anti-Goat IgG (1:2000)
βActin	Sheep Anti-human βActin IgG (1,0 µg/ml)	Donkey anti-sheep IgG (1:2000)

### 3.13.2 Immunozytochemie (ICC)

Zur immunozytochemischen Untersuchung der Zelllinien A2780, A2780cis, A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1 wurden diese in 6-Well Platten ausgesät und am Tag der Untersuchung mit 4 % Paraformaldehyd in 1X PBS-Puffer für 20 min bei RT fixiert. Anschließend folgte durch Zugabe von 4 % BSA in 1X PBS-Puffer das Blockieren unspezifischer AK-Bindestellen. Nach 2maligem Waschen mit 1X PBS-Puffer wurden die Zellen mit dem primären polyklonalen EMP1-AK (Verdünnung 1:500 in PBS mit 1 % BSA) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach 2maligem Waschen mit 1X PBS-Puffer folgte dann die Inkubation mit dem sekundären Alexa Fluor<sub>488</sub> Goat Anti-Mouse-AK (Verdünnung 1:2000 in 1X PBS-Puffer mit 1 % BSA) für 1 h im Dunkeln. Zur Färbung der DNA im Zellkern wurde für die letzte Minute 300 ng/ml DAPI zugefügt. Nach



Zmaligem Waschen mit 1X PBS wurde die Fluoreszenz bei 360 nm und 488 nm betrachtet. Des Weiteren wurden die Zellen unter dem normalen Lichtmikroskop angeschaut.

### 3.14 Statistik

Zur Beurteilung, ob sich zwei zu vergleichende Proben-Werte signifikant unterscheiden, wurde in dieser Arbeit nach bestandem F-Test der zweiseitige, ungepaarte t-Test angewandt. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $< 5\%$  ( $p < 0,05$ ) wurde das Ergebnis als signifikant erachtet und als solches gekennzeichnet. Die angegebenen Zeichen haben folgende Bedeutung: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

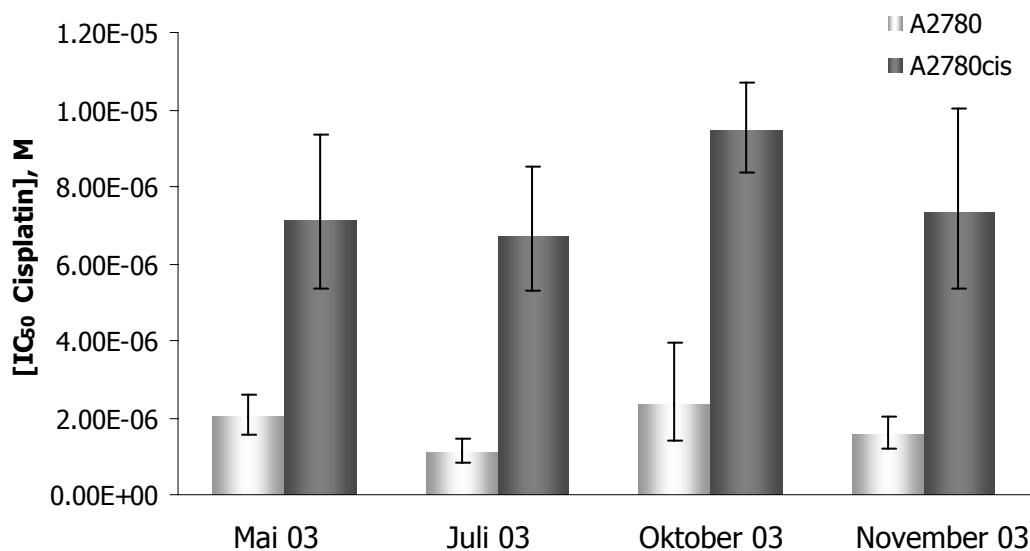
Zur Beurteilung, ob sich mehrere Proben-Werte signifikant unterscheiden, wurde der multiple Vergleichstest nach Tukey verwendet. Die Kennzeichnung der Irrtumswahrscheinlichkeit entspricht der oben aufgeführten.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Charakterisierung der Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780cis

#### 4.1.1 Wachstumsverhalten der Zelllinien gegenüber Cisplatin

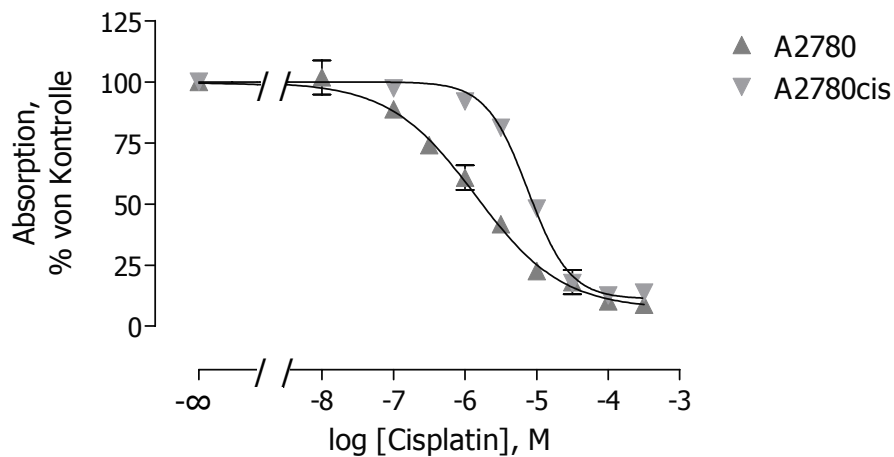
Das Wachstumsverhalten der Zelllinien A2780 und A2780cis gegenüber Cisplatin wurde mittels MTT-Test und BrdU-Test ermittelt. In Abb. 23 sind die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte gegenüber Cisplatin mit den jeweiligen 95 % Konfidenzintervallen (KI) von vier MTT-Experimenten je Zelllinie dargestellt. Die Experimente wurden in einem Zeitraum von einem halben Jahr vor der SSH-Analyse durchgeführt (Mai bis November 2003). Die Zelllinie A2780cis konnte durch regelmäßige Cisplatin-Inkubation während der Zellkultur auf einem signifikant höheren  $IC_{50}$ -Wert gegenüber Cisplatin gehalten werden als die unbehandelte parentale Zelllinie A2780.



**Abb. 23: Verlauf der  $IC_{50}$ -Werte gegenüber Cisplatin, ermittelt durch den MTT-Test in einem Zeitraum von 6 Monaten vor der SSH-Analyse. Die Fehlerbalken zeigen das 95 % Konfidenzintervall an. Die Experimente wurden mit 3-6 Replikaten durchgeführt.**

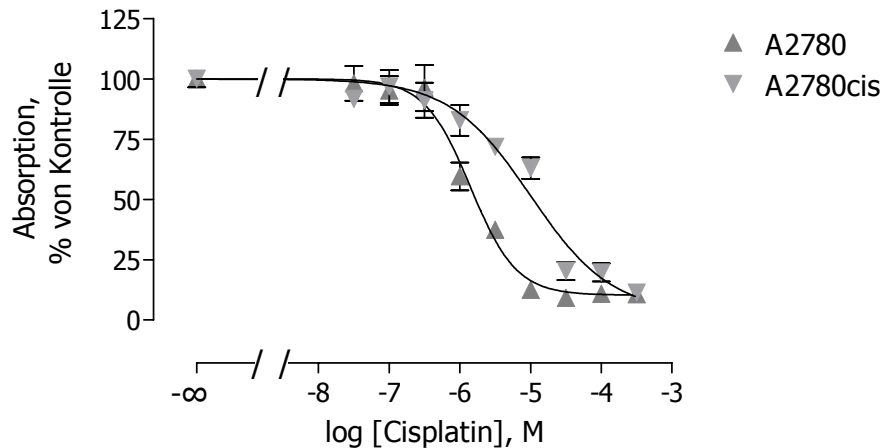
Die jeweiligen vier  $IC_{50}$ -Werte einer Zelllinie unterschieden sich nicht signifikant und sind über den untersuchten Zeitraum von einem halben Jahr konstant geblieben. Die

auf 100% der jeweiligen Kontrolle normalisierten gemittelten Daten der vier in Abb. 23 gezeigten MTT-Experimente sind in Abb. 24 in einer sigmoidalen Konzentrations-Wirkungskurve aufgeführt. Die Untersuchungen stellen den Resistenzgrad der in der SSH-Analyse untersuchten Proben gegenüber Cisplatin dar. Diese Daten zeigen nochmals die signifikant höhere Resistenz der Zelllinie A2780cis gegenüber Cisplatin.



**Abb. 24: Mittels MTT-Test ermittelte und auf 100 % der unbehandelten Kontrolle normalisierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinien A2780 und A2780cis. Gezeigt sind die Mittelwerte aus vier Experimenten mit jeweils Triplikaten ( $\pm$  SE).**

Abb. 25 zeigt die auf 100 % der jeweiligen Kontrolle normalisierten Daten von repräsentativen BrdU-Experimenten in einer sigmoidalen Konzentrations-Wirkungskurve. Gezeigt sind die gemittelten Daten von 2-4 Experimenten, die jeweils mit Triplikaten durchgeführt wurden. Die Daten zeigen ebenso wie bei dem MTT-Test eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve der Zelllinie A2780cis.



**Abb. 25:** Mittels BrdU-Test ermittelte und auf 100 % der unbehandelten Kontrolle normierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinien A2780 und A2780cis. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 2-4 Experimenten mit jeweils Triplikaten ( $\pm$  SE).

In Tab. 46 sind die aus den gezeigten Konzentrations-Wirkungskurven ermittelten Parameter ( $IC_{50}$ , 95% KI  $IC_{50}$ , RF) der MTT- und BrdU-Tests aufgeführt.

**Tab. 46:**  $IC_{50}$ , 95 % KI und RF der Zelllinien A2780 und A2780cis ermittelt mit dem MTT- bzw. BrdU-Test. Ermittelt wurden die Werte aus den in Abb. 24 und Abb. 25 gezeigten Konzentrations-Wirkungskurven. Der Resistenzfaktor (RF) wurde nach der in Kapitel 3.7.3 angegebenen Formel 3 errechnet.

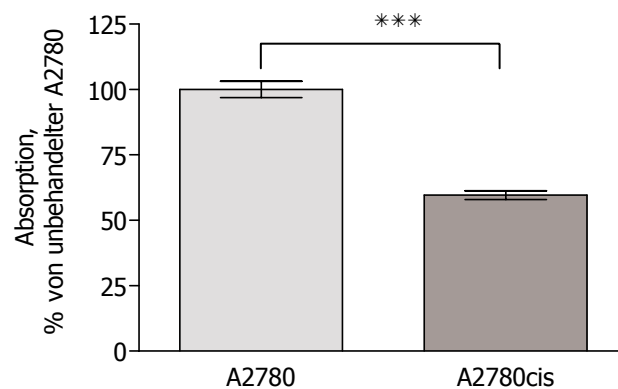
Test-System	Zelllinie	n	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	95% KI $IC_{50}$ [ $\mu$ M]	RF
MTT	A2780	4	1,40	0,99-1,99	
	A2780cis	4	7,57	6,57-8,72	5,4***
BrdU	A2780	4	1,41	1,03-1,93	
	A2780cis	2	10,0	5,24-19,11	7,1**

Der  $IC_{50}$ -Wert gibt die Cisplatin-Konzentration an, bei der nur noch 50 % vitale Zellen vorhanden sind. Im MTT-Test zeigt die parentale Zelllinie A2780 einen  $IC_{50}$ -Wert von 1,40  $\mu$ M und die Zelllinie A2780cis weist einen  $IC_{50}$ -Wert von 7,57  $\mu$ M auf. Daraus ergibt sich für die resistente Zelllinie A2780cis ein Resistenzfaktor von 5,4. Im BrdU-Test ergibt sich für die parentale Zelllinie A2780 auch ein  $IC_{50}$ -Wert gegenüber

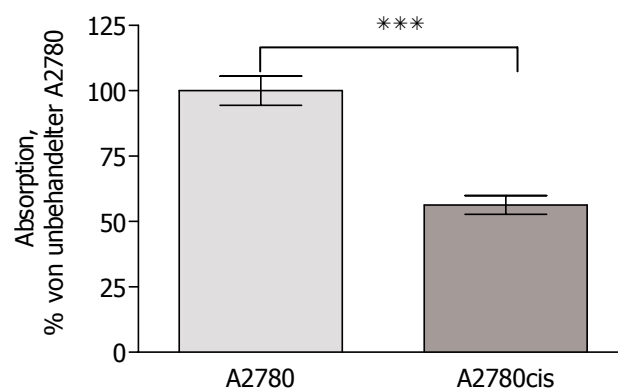
Cisplatin von 1,41  $\mu\text{M}$ , die Zelllinie A2780cis weist einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 10,00  $\mu\text{M}$  auf. Daraus ergibt sich für die Zelllinie A2780cis ein Resistenzfaktor von 7,1. Der Unterschied der ermittelten Resistenzfaktoren von MTT-Test und BrdU-Test lässt sich durch die Messung verschiedener Parameter bei den beiden Testsystemen erklären (Dehydrogenase-Aktivität bzw. Proliferation). Beide Tests zeigen aber eine signifikante Resistenz der Zelllinie A2780cis gegenüber Cisplatin.

#### 4.1.2 Wachstumsverhalten der Zelllinien

Beim Vergleich der unbehandelten Kontrollen (nicht normierte Absorptionswerte) der Zelllinien A2780 und A2780cis aus dem MTT-Test aus Abb. 24 und dem BrdU-Test aus Abb. 25 zeigte sich eine erhöhte Proliferation der Zelllinie A2780 gegenüber der Zelllinie A2780cis in dem untersuchten Zeitraum von 72 h. Abb. 26 und Abb. 27 zeigen prozentualisierte Absorptionswerte der unbehandelten Kontrolle der beiden MTT- und BrdU-Tests, wobei die Absorption der Zelllinie A2780 auf 100 % gesetzt und die Absorption der Zelllinie A2780cis darauf bezogen wurde. Die Absorption der resistenten Zelllinie A2780cis beträgt in beiden Fällen 60 % der sensitiveren Zelllinie A2780. Daraus lässt sich ein geringeres Wachstum der Zelllinie A2780cis innerhalb des Testzeitraumes von 72 h ableiten.



**Abb. 26: Prozentualisierte Absorptionswerte der MTT-Tests nach 72 h von unbehandelten A2780 und A2780cis. Die Absorption von A2780-Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind MW  $\pm$  SE aus n = 2 mit 6 Replikaten.**



**Abb. 27: Prozentualisierte Absorptionswerte der BrdU-Tests nach 72 h von unbehandelten A2780 und A2780cis. Die Absorption von A2780-Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind MW  $\pm$  SE aus n = 3 mit 3 Replikaten.**

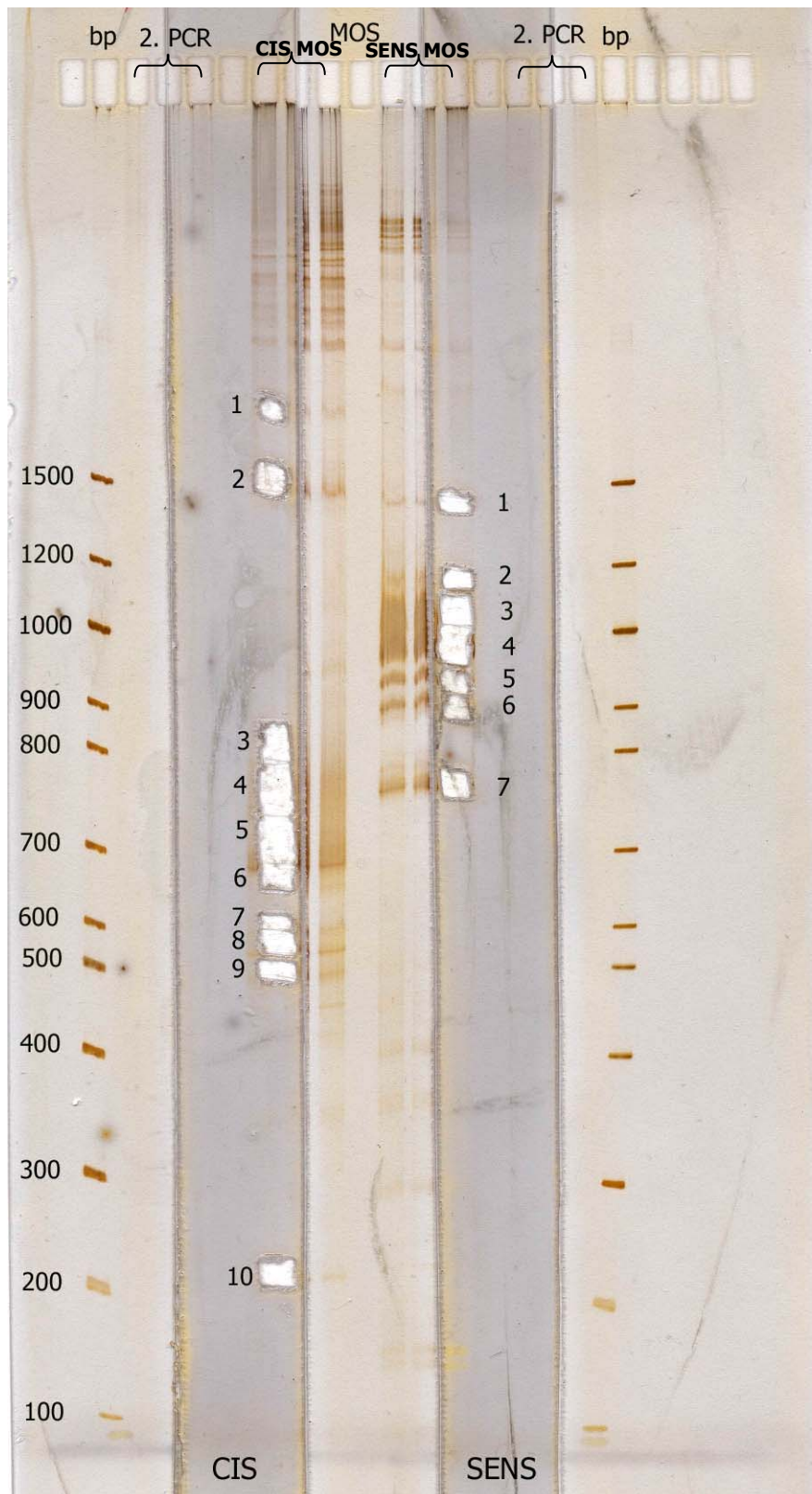
## 4.2 Differentielle Genexpression der Zelllinien A2780 und A2780cis

### 4.2.1 SSH und MOS

Um auf molekularer Ebene nach Unterschieden in der Cisplatin-resistenten und -sensitiven Ovarialkarzinom-Zelllinie zu suchen, wurde deren differentielle Genexpression mit Hilfe der Suppressions-Subtraktions-Hybridisierung (SSH) untersucht. Die Zelllinien A2780 und A2780cis wurden vor der SSH-Analyse mit 10  $\mu$ M Cisplatin für 24 h inkubiert und nach einer Auswaschphase von 0,5 h wurde dann die in die SSH eingehende mRNA isoliert. Die Mirror-Orientation-Selektion (MOS) diente zur weiteren Suppression falsch-positiver Sequenzen (Fehler des Typs II, s. Kapitel 3.10.10).

### DNA Polyacrylamid Long Run-Gel

Die PCR-Produkte nach der 2. SSH-PCR und nach MOS wurden auf ein Polyacrylamid Long Run-Gel aufgetragen und der Größe nach aufgetrennt. Auf dem DNA Polyacrylamid Long Run-Gel (s. Abb. 28) sind in dem mit den MOS-Produkten beladenen und mittels Silberfärbung angefärbten Teil für beide Richtungen der SSH (CIS und SENS) Banden zwischen 200 bp und > 1500 bp zu erkennen. In der Richtung CIS wurden 10 native, nicht mit Silber gefärbte Banden in dem Größenbereich 200 bis >1500 bp auf Höhe der sichtbaren Silberbanden ausgeschnitten, in der Richtung SENS wurden insgesamt sieben native Banden zwischen 750 und 1500 bp ausgeschnitten. Bei den Banden deutlich größer 1500 bp kann von einem ungenügenden RsaI-Verdau ausgegangen werden. Die zum Vergleich aufgetragenen Produkte der 2. PCR sind vermutlich nicht zu erkennen, da sie nach diesem Schritt noch nicht genügend angereichert vorlagen.

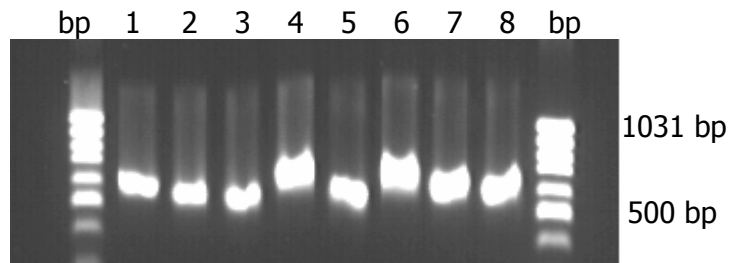


**Abb. 28: Polyacrylamid Long Run-Gel der SSH und MOS Fragmente. Die Produkte wurden jeweils 2 mal aufgetragen und nur einer der Teile mittels Silberfärbung entwickelt. Aus den nativen Teilen (CIS und SENS) wurden dann nach Vorlage der Silber-angefärbten Bereiche die einzelnen DNA-Banden der MOS-PCR-Produkte ausgeschnitten.**



### Screening der TOPO TA Klonierungsprodukte auf Agarose-Gelen

Zur Vereinzelung der in den PAA-Banden erhaltenen DNA-Fragmente wurden diese in *E. coli* Bakterien kloniert. Die klonierten DNA-Fragmente wurden anschließend mittels PCR amplifiziert und mittels Gelelektrophorese analysiert. Es konnten auf diese Weise diejenigen Klone identifiziert werden, die den Vektor mit einem MOS-Fragment aufgenommen hatten. Die MOS-Fragmente tragen an beiden Enden NP2RS-Primerbindestellen, sodass es bei dieser PCR zu einer exponentiellen Amplifizierung MOS-positiver Fragmente kam. Abb. 29 zeigt ein repräsentatives DNA-Agarose-Gel der PCR-Produkte von Klonen aus der Bande 6 der Richtung CIS. Die Bande 6 aus dem PAA-Gel lag auf der Höhe von 650 bp. Die sichtbaren Banden auf dem Agarose-Gel stellen MOS-spezifische Sequenzen zwischen 600 und 700 bp dar. In dem hier gezeigten Beispiel wurden die PCR-Produkte aller acht Banden für das nachfolgende Differential Screening ausgewählt. Insgesamt zeigten 219 Klone eine MOS-positive Bande auf dem Agarose-Gel und wurden anschließend auf eine Nylon-Membran überführt und einem Differentiellen Screening unterzogen (s. Kapitel 3.10.12).



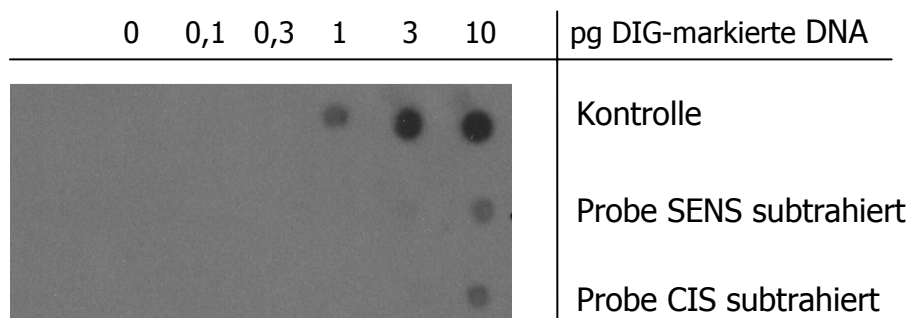
**Abb. 29: Agarose-Gel der PCR-Produkte nach MOS und *E. coli*-Klonierung. Gezeigt ist ein repräsentatives Gel mit PCR-Produkten von Klonen aus der Bande 6 der Richtung CIS.**

#### 4.2.2 Differentielles Screening mittels Dot Blot

Das Differentielle Screening diente der Eliminierung der falsch-positiven Fragmente des Typs I. Dafür wurden die MOS-positiven PCR-Produkte parallel auf Nylonmembranen geblottet und mit markierter subtrahierter cDNA (hervorgegangen aus der MOS-PCR) hybridisiert (s. Kapitel 3.10.12).

### Kontrolle der Markierungsreaktion

Die Markierungsreaktion diente zur Erstellung der mit DIG-dUTP markierten Sonden, die zur Hybridisierung an die auf eine Membran aufgebrachte DNA vorgesehen sind. Zur Untersuchung der Markierungseffizienz wurden die markierten cDNA-Proben mit einer markierten Kontroll-DNA verglichen. Abb. 30 zeigt die Kontrolle der Markierungsreaktionen der subtrahierten cDNA-Proben CIS und SENS. Es ist zu erkennen, dass beide subtrahierten Sonden (hervorgegangen aus DNA aus der MOS-PCR) ungefähr gleich effizient markiert wurden. Die Intensität der Färbung entspricht ungefähr der Kontrolle mit 1 pg DIG-markierter DNA. Beide Sonden können also in der gleichen Konzentration eingesetzt werden.



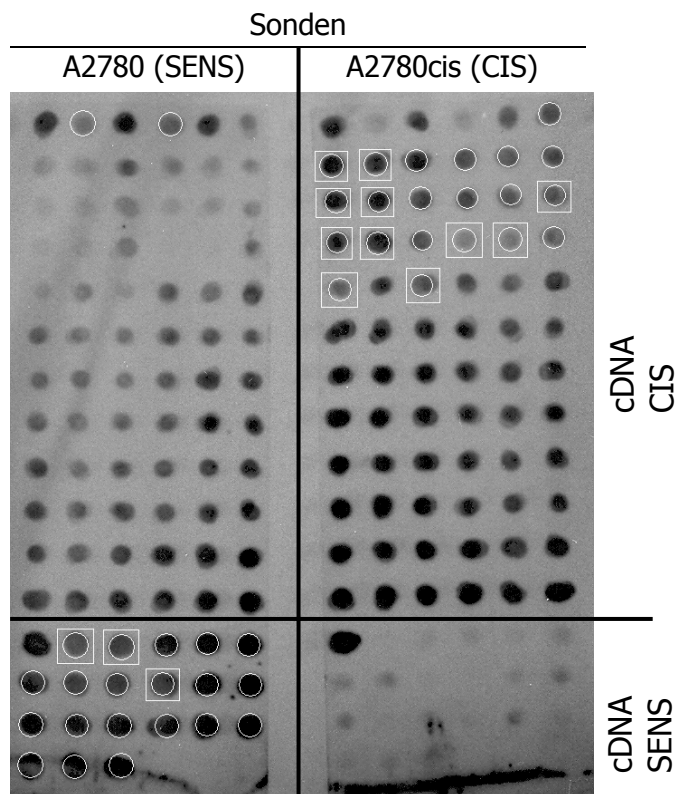
**Abb. 30: Kontrolle der Markierungsreaktion der subtrahierten cDNA Proben CIS und SENS.**

Die nicht-subtrahierten Proben (cDNA aus den beiden Zelllinien A2780cis und A2780) erzeugten nur eine sehr schwache Anfärbung des Röntgenfilms, die unterhalb der noch sichtbaren Kontrolle mit 1 pg DIG-markierter DNA lag (nicht gezeigt). Ebenso waren die Dot Blots mit den nicht-subtrahierten Sonden nicht auszuwerten, da die Konzentration der DNA-Fragmente zu gering war.

### Screening der aus der SSH hervorgegangenen Klone mittels Dot Blot

Die auf den Agarose-Gelen gescreenten MOS-positiven PCR-Produkte wurden auf Nylon-Membranen überführt, um anschließend mit den DIG-Sonden hybridisiert zu werden. Abb. 31 zeigt zwei Dot Blots, die mit subtrahierten Sonden hybridisiert wurden. Die Dot Blots sollen unterschiedliche Signale zwischen den beiden Sonden

CIS (A2780cis) und SENS (A2780) aufzeigen. Die differentiellen Signale lassen sich unterscheiden in Ja/Nein-Signale und in solche, die einen Intensitätsunterschied in der Stärke der Signale aufweisen. Proben mit einem absoluten Ja/Nein-Signal könnten auch falsch-positive Sequenzen des Typs II sein. Da jedoch ein MOS-Schritt durchgeführt wurde und damit die Anreicherung solcher Sequenzen stark limitiert wurde, ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß, dass es sich bei klaren Ja/Nein-Signalen um differentiell exprimierte Sequenzen handelt.



**Abb. 31: Exemplarische Dot Blots des differentiellen Screenings. Die linke Membran wurde mit der Sonde der subtrahierten sensitiven Probe A2780 (SENS) hybridisiert und die rechte Membran mit der Sonde der subtrahierten resistenten Probe A2780cis (CIS). Die mit einem Kreis markierten Dots zeigen ein differentielles Signal zwischen den zwei Proben. Die zusätzlich mit einem Quadrat markierten Dots wurden nachfolgend sequenziert.**

Ist das Signal der Dots gleich stark, kann davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um eine differentielle Expression handelt. Unterscheiden sich die Signale in ihrer Intensität > 4fach (da Tester:Driver 1:4), kann von einer differentuellen Expression ausgegangen werden. Von den 59 Klonen mit einem differentuellen Signal

wurde eine Auswahl von 23 Klonen sequenziert. Aus Kostengründen wurden nicht alle Klone sequenziert. Um möglichst viele unterschiedliche Gen-Sequenzen ausfindig zu machen, wurden Klone ausgewählt, die aus verschiedenen PAA-Banden abstammen.

### 4.2.3 Homologiesuche mit BLAST

#### Kandidaten-Gene in A2780 und A2780cis nach SSH-Analyse und Sequenzierung

Die Suche nach Homologien der Sequenzen der einzelnen Klone mit bereits annotierten Genen bei NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) mit der „Nucleotide-Nucleotide BLAST“ Suchmaske ergab die Zugehörigkeit zu den Genen, die in Tab. 47 aufgelistet sind. Aus den 23 sequenzierten Klonen wurden insgesamt 4 verschiedene Kandidaten-Gene ermittelt. In der Zelllinie A2780cis wurden das Epitheliale Membranprotein 1 (EMP1) und das DEAD box Polypeptid 21 (DDX21) gefunden. In der Zelllinie A2780 fand sich der H-Faktor 1 (HF1) und der Protease Inhibitor PI15.

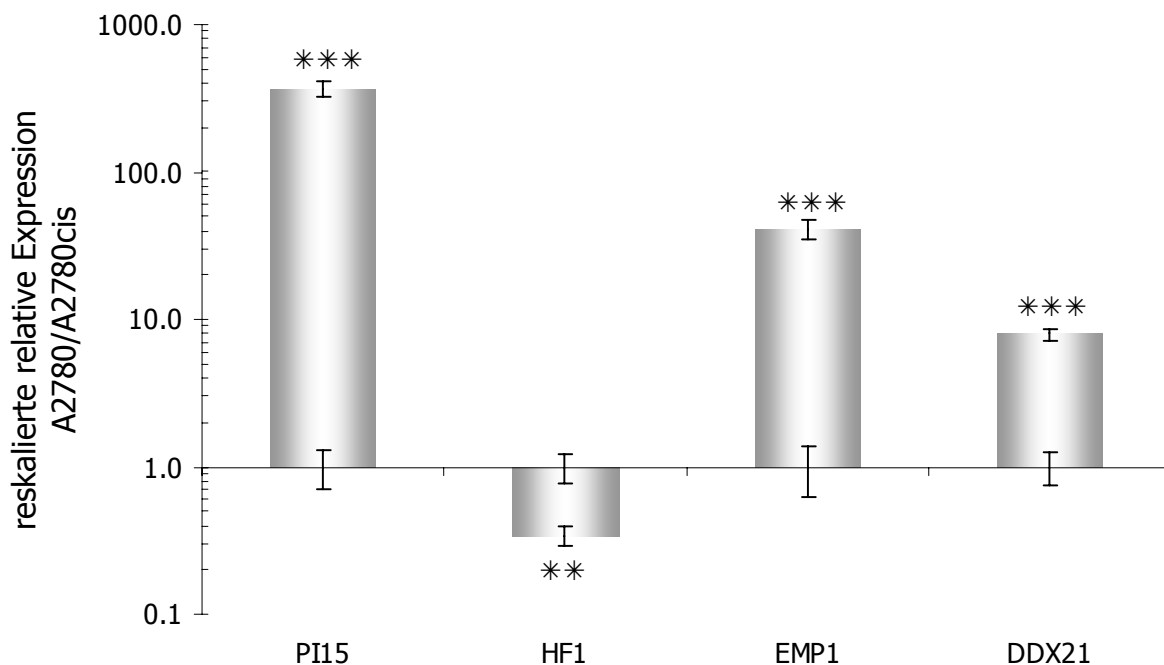
**Tab. 47: Ergebnisse der BLAST Suche der Sequenzen der einzelnen Klone.**

Gen	Symbol	Accession Nr.	Funktion
<b>Epitheliales Membran Protein 1</b>	<b>EMP1</b>	<b>NM_001423</b>	Zell-Zell Interaktionen; Proliferation; Tumorgenese [105-107]
H-Faktor 1	HF1	NM_000186	Regulator des alternativen Komplement Systems [108;109]
Protease Inhibitor 15	PI15	NM_015886	Trypsin Inhibitor [110]
DEAD box Polypeptid 21 (RHII/Gu $\alpha$ )	DDX21	NM_004728	RNA Helikase, Interaktion mit c-Jun [111-113]

#### 4.2.4 qRT-PCR der SSH Kandidaten-Gene

Die vier ermittelten SSH Kandidaten-Gene wurden im Folgenden mittels qRT-PCR analysiert. Damit sollte eine differentielle Expression bestätigt und diese auch quantitativ erfasst werden. Zuvor wurden die für jedes Gen optimalen Primerkonzentrationen ermittelt. Keiner der untersuchten Primer zeigte Dimerisierungstendenzen und alle Primer hybridisierten sequenzspezifisch. Dies wird durch die Schmelzpunktanalyse im Anhang gezeigt. Ebenso wurde die PCR-Effizienz der SSH Kandidaten-Gene ermittelt (Daten s. Anhang Tab. 59). Es zeigte sich, dass das 95 % Konfidenzintervall der Effizienz aller untersuchten Gene nicht signifikant verschieden von zwei ist. Damit kann für die quantitative Auswertung eine Verdopplung der DNA-Menge pro Zyklus, also 100 % Effizienz, angenommen werden.

In Abb. 32 sind die Ergebnisse der qRT-PCR Analyse der Kandidaten-Gene dargestellt.



**Abb. 32: Ergebnisse der qRT-PCR mit den SSH Kandidaten-Genen. Gezeigt ist die relative differentielle Expression bezogen auf die Zelllinie A2780cis, deren Expression auf 1 gesetzt wurde ( $\pm$  SE der beiden Expressionen) in einer logarithmischen Skala. Werte größer 1 bedeuten eine Überexpression in der sensitiven Zelllinie A2780 und kleiner 1 eine Überexpression in der resistenten Zelllinie A2780cis.**

Vor der RNA Isolierung wurden die Zellen analog zur SSH-Analyse mit 10  $\mu$ M Cisplatin für 24 h inkubiert, gefolgt von einer halbstündigen Auswaschphase, um die Ergebnisse mit der SSH-Analyse vergleichen zu können. Bestimmt wurde die Expression der Kandidaten-Gene in sensitiven A2780-Zellen mit derjenigen der resistenten A2780cis-Zellen. Dabei wurde die Expression in der resistenten Zelllinie auf 1 festgesetzt und die Expression in der sensitiven Zelllinie darauf bezogen (= re-skalierte relative Expression). Die Expression des Housekeeping-Gens RPL13 diente der Normalisierung der Daten. Eine Überexpression in A2780 (PI15, EMP1, DDX21) ist durch einen Faktor  $> 1$  dargestellt.

PI15 ist in der sensitiveren Zelllinie A2780 mit einem Faktor von 370 massiv überexprimiert (übereinstimmend mit der SSH-Richtung). EMP1 ist ebenfalls stark überexprimiert mit einem Faktor von 41 (nicht übereinstimmend mit der SSH-Richtung). DDX21 zeigt eine 8fach höhere Expression in A2780 (übereinstimmend mit der SSH-Richtung). Eine Überexpression in A2780cis mit einem Faktor von 3 kann für HF1 beobachtet werden (nicht übereinstimmend mit der SSH-Richtung).

#### 4.2.5 Zusammenfassung der einzelnen Schritte der differentiellen Genexpressionsanalyse der Zelllinien A2780 und A2780cis

Tab. 48 zeigt eine Zusammenfassung der verschiedenen Schritte der Genexpressionsanalyse der Zelllinien A2780 und A2780cis. Aufgelistet sind die Anzahl der erhaltenen „Zwischenprodukte“ und die Anzahl der schließlich als differentiell ermittelten Kandidaten-Gene in den beiden Zelllinien.

**Tab. 48: Zusammenfassung der einzelnen Schritte der differentiellen Genexpressionsanalyse und Anzahl der jeweiligen Zwischenprodukte.**

<b>Analysenschritt</b>	<b>Zwischenprodukte in A2780</b>	<b>Zwischenprodukte in A2780cis</b>
cDNA Fragmente des PAA-Gels nach SSH/MOS	7	10
Klone nach Klonierung in E.coli	448	640
Auf Nylonmembran überführte Proben	35	184
Differentiell exprimierte Proben nach dem Differentiellen Screening	32	27
Sequenzierte Proben	7	16
Differentiell exprimierte Kandidaten- Gene nach qRT-PCR	3	1

Aus den sieben (A2780) bzw. zehn (A2780cis) cDNA Fragmenten des PAA-Gels wurden insgesamt 1088 Klone nach der Klonierung in E. Coli isoliert. Das Screening dieser Klone mittels PCR und Gelelektrophorese führte dann zu einer Reduzierung auf 219 MOS-positive Klone, welche mit dem Differentiellen Screening untersucht wurden. Das Differentielle Screening offenbarte in der Zelllinie A2780 32 und in der Zelllinie A2780cis 27 differentiell exprimierte Proben. Von diesen Proben wurden insgesamt 23 stichprobenartig für die Sequenzierung ausgewählt. Es wurde darauf geachtet aus jeder der ursprünglichen PAA-Gel-Banden Proben zu berücksichtigen. Mit der anschließenden qRT-PCR konnte eine differentielle Expression für drei Gene in der Zelllinie A2780 (EMP1, PI15, DDX21) und für ein Gen (HF1) in der Zelllinie A2780cis bestätigt werden.

#### 4.2.6 Expression der SSH Kandidaten-Gene mittels Microarray

Die Microarray Untersuchungen der Zelllinien A2780 und A2780cis zeigen eine differentielle Expression der SSH-Kandidaten-Gene ähnlich wie in der qRT-PCR-Analyse. In Tab. 49 sind die differentielle Expression als Fold change-Wert sowie der p-Wert angegeben. Ein negativer Fold change bedeutet eine Überexpression in A2780 und ein positiver Fold change eine Überexpression in A2780cis. Vor der RNA-Isolierung wurden die Zellen allerdings nicht wie bei der SSH-Analyse mit Cisplatin behandelt. Aus diesem Grund lassen sich diese Expressionsdaten nicht direkt mit den oben gezeigten Daten der qRT-PCR der SSH Kandidaten-Gene vergleichen.

**Tab. 49: Microarray Daten der SSH Kandidaten-Gene. Der Fold change wurde ermittelt durch den Vergleich der Zelllinien A2780 und A2780cis. Ein negativer Fold change bedeutete eine Überexpression in der sensitiven Zelllinie A2780 und ein positiver fold change eine Überexpression in A2780cis.**

Gen	Accession Nr.	Fold change	p-Wert
<b>EMP1</b>	<b>NM_001423</b>	<b>-6,0</b>	<b><math>8,19 \times 10^{-20}</math></b>
HF1	NM_000186	3,5	$1,36 \times 10^{-10}$
PI15	NM_015886	-7,3	$2,48 \times 10^{-10}$
DDX21	NM_004728	nicht reguliert	-

**EMP1** und PI15 sind im Microarray ebenfalls in der sensitiven Zelllinie A2780 überexprimiert. Das Gen HF1 ist um den Faktor 3,5 höher in der resistenten Zelllinie A2780cis exprimiert, bei der qRT-PCR Untersuchung wurde ein Faktor von 3 ermittelt. Für das Gen DDX21 weicht das Ergebnis von der qRT-PCR ab, es wird im Microarray als nicht reguliert ermittelt.



### 4.3 Untersuchung der Expression der SSH Kandidaten-Gene in 18 humanen Zelllinien

Um einen weiteren Einblick in die differentielle Expression und die Rolle der mittels SSH-Analyse ermittelten Kandidaten-Gene in der Cisplatin-Resistenz zu erhalten, sollte deren Expression mittels qRT-PCR in weiteren 16 Zelllinien untersucht werden (s Kapitel 3.9.3). Es wurde die unterschiedliche Expression Cisplatin-behandelter und nicht-behandelter Proben verglichen (s. Tab. 2).

#### 4.3.1 Charakterisierung der 18 Zelllinien mittels MTT-Test

Da die untersuchten Zelllinien sehr heterogen waren, wurden die Konzentrationen für die Inkubation mit Cisplatin an den jeweiligen Resistenzgraden der Zelllinien ausgerichtet. Dafür wurde zunächst mittels MTT-Test die Cisplatin-Sensitivität der Zelllinien ermittelt. Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Eva Gosepath durchgeführt. Die für die Untersuchungen der Genexpression verwendeten Cisplatinkonzentrationen (s. Tab. 2) entsprechen der ein- bis zweifachen  $IC_{50}$  der jeweiligen Zelllinie.

#### **Ermittlung der optimalen Zellzahl für den MTT-Test im 96-Well Format**

Die optimale Anfangszellzahl (80-90 % Konfluenz nach 72 h) für den MTT-Test über eine Dauer von 72 h in einer 96-Well Platte wurde für die 18 Zelllinien vor der Durchführung der MTT-Tests ermittelt. Die optimalen Anfangszellzahlen, die in den nachfolgenden MTT-Tests verwendet wurden, sind in Tab. 50 aufgelistet.

**Tab. 50: Optimale Zellzahl (80-90 % Konfluenz nach 72 h) für den MTT-Test über 72 h in einer 96-Well Platte für die 18 untersuchten Zelllinien.**

Zelllinie	Zellzahl/Well	Zelllinie	Zellzahl/Well
T24	1000	HT29	6000
1321N1	3000	CaCo2	6000
KYSE 510	4000	2102KLE	7000
CAL27	4000	2102	7000
CAL27res	4000	A2780	8000
HEK293	6000	U937	8000
DU145	6000	1539	8000
HepG2	6000	A2780cis	8000
MCF7	6000	K562	10000

### Wachstumsverhalten der Zelllinien gegenüber Cisplatin

In Tab. 51 sind die Ergebnisse der MTT-Tests der 18 Zelllinien aufgeführt. Neben der  $IC_{50}$  und dem 95 % Konfidenzintervall (KI) der  $IC_{50}$  sind die Anzahl der durchgeführten Experimente (n) angegeben.

**Tab. 51: Übersicht über die  $IC_{50}$ -Werte der 18 untersuchten Zelllinien, geordnet nach aufsteigendem  $IC_{50}$ -Wert (MW aus  $n \geq 3$  mit je 3 Replikaten).**

Zelllinie	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	95 % KI $IC_{50}$ [ $\mu$ M]	n	Zelllinie	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	95 % KI $IC_{50}$ [ $\mu$ M]	n
1321N1	1,10	0,77-1,51	3	2102	4,85	4,06-5,78	3
KYSE510	1,40	1,23-1,60	3	T24	6,80	5,12-9,00	5
HEK293	1,80	1,13-2,89	3	MCF7	8,56	6,23-11,8	4
CAL27	2,15	1,90-2,45	3	1539	10,5	6,99-15,7	3
A2780	2,20	1,67-2,90	5	A2780cis	11,0	6,34-19,1	3
DU145	2,27	1,83-2,82	3	K562	11,9	9,30-15,2	4
HepG2	2,78	2,18-3,54	4	HT29	12,9	10,4-16,1	4
U937	2,79	2,18-3,57	4	CaCo2	16,2	12,6-20,9	3
2102KLE	2,99	2,24-3,99	5	CAL27res	19,9	14,0-28,4	3

Die einzelnen Konzentrations-Wirkungskurven sind im Anhang in Kapitel 10.3.1 dargestellt.

Die Resistenzfaktoren gegenüber Cisplatin der beiden in der Untersuchung einbezogenen Zelllinienpärchen A2780/A2780cis und CAL27/CAL27res wurden wie unter Kapitel 3.3.3 beschrieben berechnet. Der Resistenzgrad der Ovarialkarzinom-Subzelllinie A2780cis beträgt 5,0\*\*\* und liegt somit im gleichen Bereich wie in den vorangegangenen Untersuchungen (s. Tab. 46). Die Kopf- und Halskarzinom-Subzelllinie CAL27res zeigt gegenüber ihrer parentalen Zelllinie CAL27 eine um den Faktor 9,3\*\* erniedrigte Sensitivität gegenüber Cisplatin auf.

### qRT-PCR zur Ermittlung der Housekeeping-Gene (HKG)

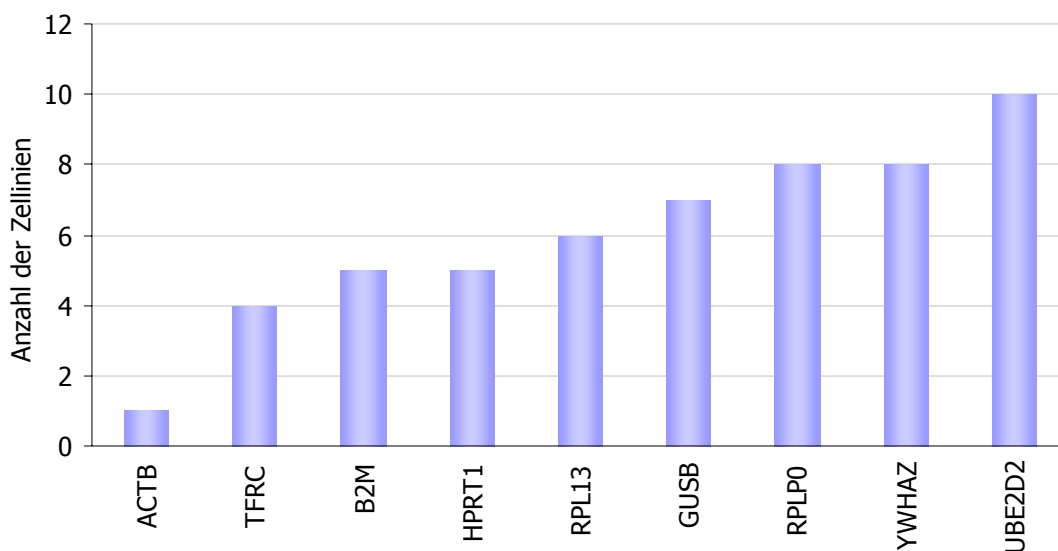
Die qRT-PCR Analyse und anschließende Auswertung mit dem Programm geNorm ergab für die 18 untersuchten Zelllinien die in Tab. 52 aufgelisteten HKG.

**Tab. 52: Übersicht über die drei mit geNorm ermittelten HKG für die 18 Zelllinienpärchen. Die Bezeichnung HKG 1-3 erfolgt nach aufsteigendem M-Wert. \* = Die HKG besitzen jeweils den gleichen M-Wert wie das als HKG1 bezeichnete Gen.**

Zelllinie	HKG1	HKG2	HKG3
<b>1321N1</b>	RPLP0	YWHAZ	HPRT1
<b>1539</b>	RPLP0	GUSB*	TFRC
<b>2102</b>	RPL13	UBE2D2	RPLP0
<b>2102KLE</b>	GUSB	UBE2D2	RPL13
<b>A2780</b>	RPL13	HPRT1	RPLP0
<b>A2780cis</b>	RPL13	GUSB	B2M
<b>Caco2</b>	YWHAZ	RPL13*	UBE2D2
<b>Cal27</b>	GUSB	RPLP0	YWHAZ
<b>Cal27res</b>	GUSB	RPL13*	YWHAZ*
<b>DU145</b>	B2M	GUSB*	UBE2D2
<b>Hek293</b>	HPRT1	UBE2D2	RPLP0
<b>HepG2</b>	TFRC	UBE2D2	YWHAZ
<b>HT29</b>	UBE2D2	HPRT1	TFRC
<b>K562</b>	YWHAZ	ACTB	RPLP0
<b>Kyse510</b>	YWHAZ	TFRC	UBE2D2
<b>MCF7</b>	B2M	RPLP0*	UBE2D2
<b>T24</b>	B2M	HPRT1	UBE2D2
<b>U937</b>	GUSB	B2M	YWHAZ

Die dazugehörigen Quantities und M-Werte sind im Anhang in Tab. 61 angegeben. Es wurden jeweils die mit Cisplatin behandelten (1 bis 2,5fache  $IC_{50}$  für 24 h; 48 h Auswaschphase) und nicht behandelten Proben einer Zelllinie miteinander verglichen. Die M-Werte aller ermittelten HKG liegen unter dem von Vandesompele et al. [88] vorgegebenen Wert von 1,5. Sie können somit alle als geeignet für die Normalisierung der PCR-Daten betrachtet werden.

In Abb. 33 ist die Häufigkeitsverteilung der untersuchten HKG in den 18 Zelllinien aufgelistet. Auffällig ist, dass das Gen ACTB, welches in der Literatur sehr häufig als HKG erwähnt wird, in unseren Untersuchungen nur bei einem Zelllinienpärchen zur Normalisierung geeignet ist. Dies deckt sich mit Untersuchungen, die im Rahmen von Housekeeping-Gen Validierungen durchgeführt wurden [114;115]. Das Gen UBE2D2 ist in 10 der 18 Zelllinienpärchen stabil exprimiert und kommt damit am häufigsten zur Normalisierung zum Einsatz.



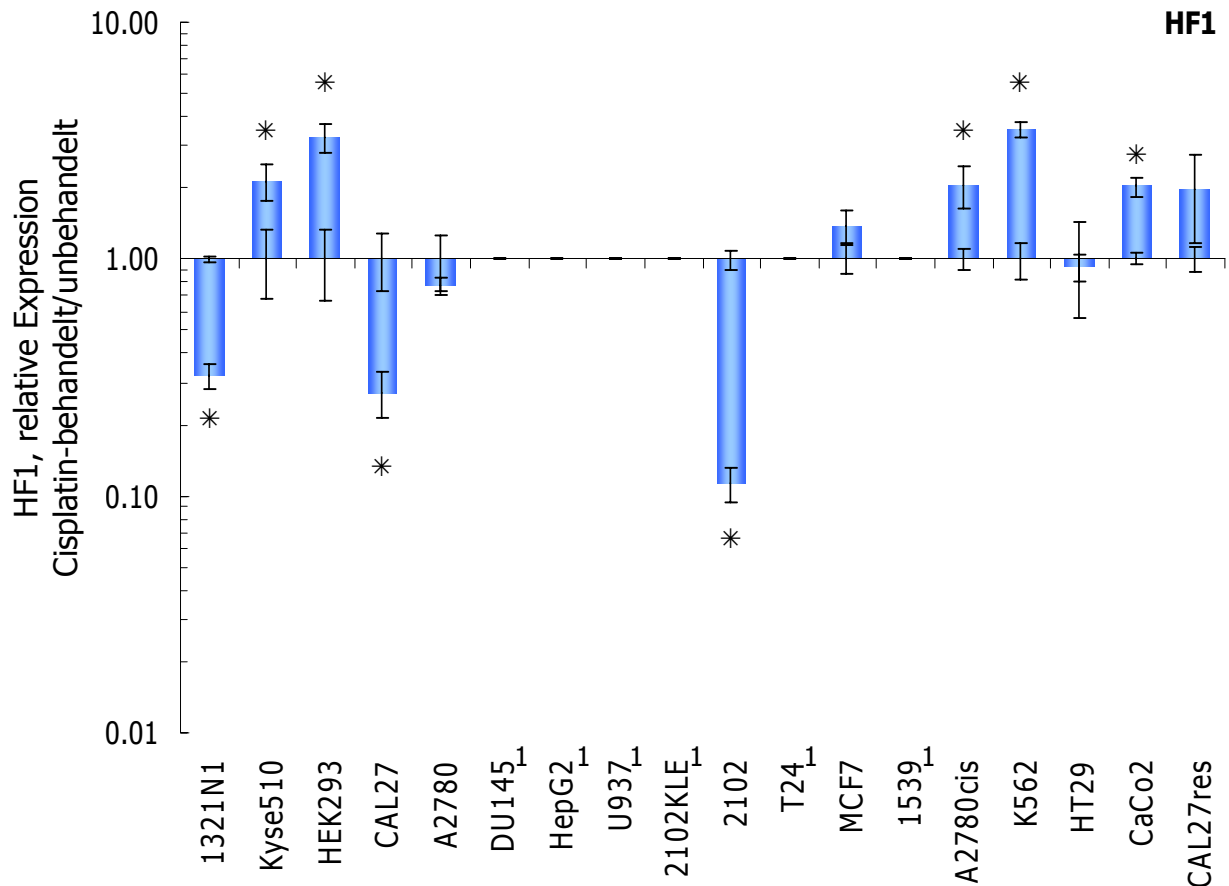
**Abb. 33: Häufigkeitsverteilung der HKG in den 18 Zelllinienpärchen.**

### 4.3.2 qRT-PCR der SSH Kandidaten-Gene

Die qRT-PCR-Analyse der SSH Kandidaten-Gene erfolgte jeweils in den Cisplatin behandelten (+) und nicht behandelten (-) Proben der 18 Zelllinien nach den in Kapitel 3.2.3, Tab.2 aufgeführten Bedingungen. Für die Normalisierung wurden die mittels geNorm ermittelten drei HKG einer jeden Zelllinie mit untersucht.

Die mittels qRT-PCR erhaltenen CT-Werte der vier untersuchten SSH Kandidaten-Gene wurden anhand der in Kapitel 3.9.3 (Auswertung der qRT-PCR mittels geNorm) beschriebenen Methode mit Hilfe des Programms geNorm quantitativ ausgewertet. Die Daten der Auswertung und die CT-Werte sind im Anhang in Tab. 62 aufgeführt. In den Abb. 34 - Abb. 37 sind die relativen Expressionsniveaus der vier Gene in den 18 Zelllinien in einem Balkendiagramm in logarithmischem Maßstab dargestellt. Verglichen wurde jeweils die Expression der Gene in den mit Cisplatin behandelten Proben mit der Expression in den unbehandelten Proben. Die Expression der unbehandelten Probe wurde auf 1 gesetzt und die der behandelten Probe darauf bezogen. Expressionslevel größer 1 stellen eine Überexpression des Gens in der mit Cisplatin behandelten Probe dar, solche kleiner 1 stellen eine Überexpression in der unbehandelten Probe dar.

Das für das Gen **HF1** ermittelte Genexpressionsmuster in den 18 Zelllinien vor und nach Cisplatin-Behandlung ist in Abb. 34 gezeigt. HF1 ist in der unbehandelten Probe in 3 Zelllinien signifikant höher exprimiert (1321N1 3fach; CAL27 4fach und 2102 9fach). In der behandelten Probe zeigt sich eine mäßige Überexpression um den Faktor 2-3 in den Zelllinien Kyse510, HEK293, A2780cis K652 und CaCo2. In insgesamt 6 Zelllinien konnte keine Expression nach den 36 PCR-Zyklen festgestellt werden. In diesen Zelllinien scheint HF1 nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß exprimiert zu sein. Eine Korrelation zwischen der Expression von HF1 nach Cisplatin-Behandlung und der Chemosensitivität der Zelllinien gegenüber Cisplatin ist nicht zu beobachten.

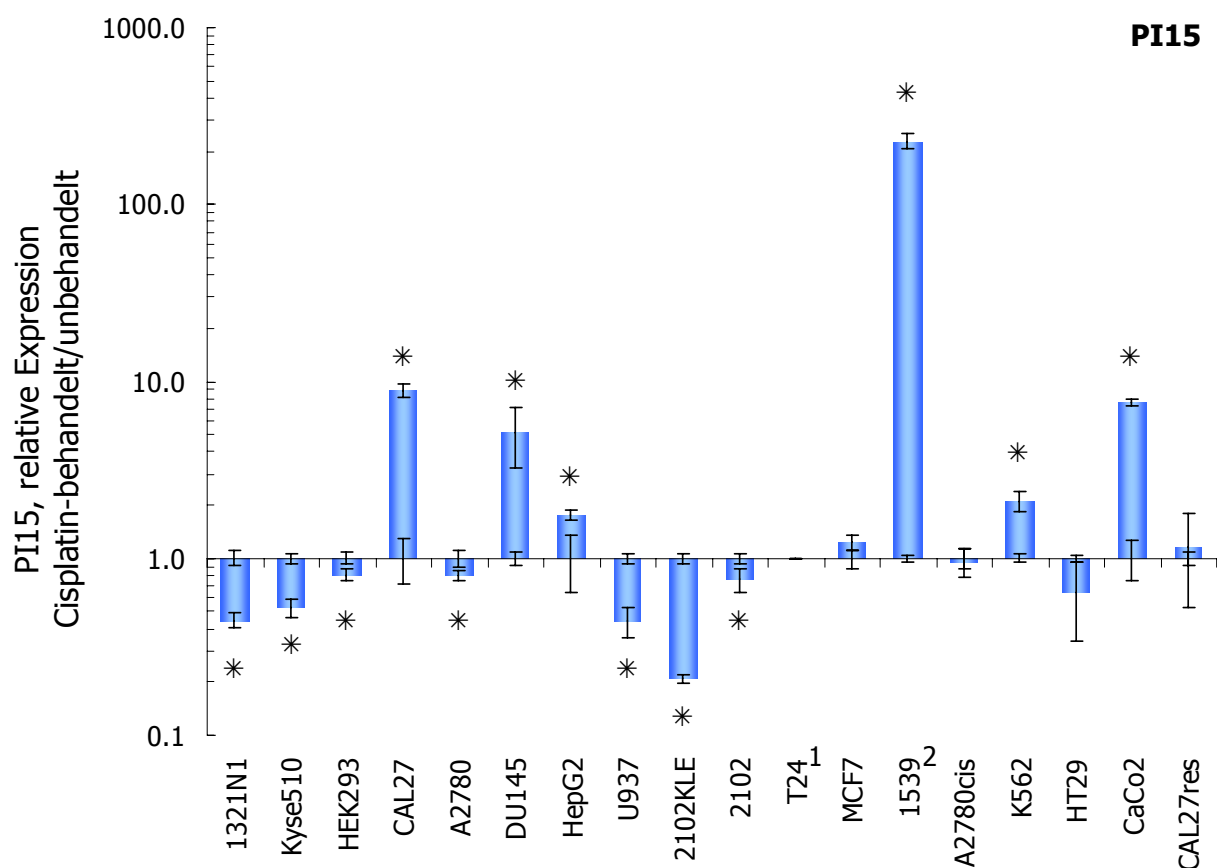


**Abb. 34: Relative Expression ( $\pm$  SD) der qRT-PCR-Analyse des Gens HF1 in 18 Zelllinien nach Cisplatin-Behandlung (1-2fach IC<sub>50</sub> 24 h; 48 h Auswaschphase). Die Expression der unbehandelten Probe wurde auf 1 gesetzt und die Expression der mit Cisplatin behandelten Probe darauf bezogen. Ein Expressionslevel größer 1 stellt eine Überexpression in der behandelten Probe dar, ein Expressionslevel kleiner 1 eine Überexpression in der unbehandelten Probe. Die Expressionslevel wurden mittels geNorm ermittelt und jeweils durch den Normalisierungsfaktor von drei HKG korrigiert. Die CT-Werte wurden in Duplikaten erstellt. <sup>1</sup>= In beiden Proben konnte nach 36 PCR-Zyklen keine Expression detektiert werden.**

Das Gen H-Faktor1 (**HF1**) kodiert für ein Plasmaprotein, welches an der Regulierung des alternativen Komplement-Systems beteiligt ist. Das Komplement-System stellt einen wichtigen Teil des Immunsystems dar, der Membranzerstörungsprozesse und damit die Lyse von Zellen steuert. Studien der letzten Jahre belegen die Beteiligung von einem HF1-Mangel an chronischem Nierenleiden wie z. B. dem hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) [116-118]. Pio et al. [108;109] identifizierten HF1 als ein Adrenomedullin(AM)-bindendes Protein. In ihren Untersuchungen zeigte sich, dass

HF1 eine erhöhte AM-induzierte Proliferation bei der humanen Brustkarzinom-Zelllinie T-47D bewirkt. Des Weiteren scheint Adrenomedullin einen Einfluss auf die Angiogenese zu haben. Eine Reihe von *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen haben diesen Effekt belegt und lassen eine Beteiligung in der Karzinogenese und Tumorprogression vermuten [119-121]. In den qRT-PCR-Analysen dieser Arbeit zeigte sich sowohl nach Inkubation der Zellen mit Cisplatin als auch im nicht-behandelten Zustand eine Überexpression von HF1 in der Zelllinie A2780cis um den Faktor 2,5 bis 5 (s. Abb. 32 u. Abb. 34). Die Microarray-Untersuchung des Basalzustandes ohne Cisplatin-Inkubation weist ein ähnliches Bild auf (Faktor 3,5, s. Tab. 49).

In Abb. 35 ist das Genexpressionsprofil des Gens **PI15** in den 18 Zelllinien vor und nach Cisplatin-Behandlung zu sehen. PI15 wird nach Cisplatin-Behandlung sowohl hoch-, als auch runterreguliert. Die größeren Expressionsfaktoren zeigen sich jedoch nach Cisplatin-Behandlung (CAL27 8fach, DU145 5fach, 1539 227fach und CaCo2 8fach). Eine nennenswerte Herunterregulierung nach Cisplatin-Behandlung findet sich nur in der Hodenkarzinom-Zelllinie 2102KLE (Faktor 5), der Zelllinie 1321N1 (Faktor 2,2) und der Zelllinie U937 (Faktor 2,3). Nicht exprimiert wird PI15 nur in der Blasenkarzinom-Zelllinie T24.



**Abb. 35: Relative Expression ( $\pm$  SD) der qRT-PCR-Analyse des Gens PI15 in 18 Tumorzelllinien nach Cisplatin-Behandlung. <sup>2</sup> = In der unbehandelten Probe konnte nach 36 PCR-Zyklen keine Expression detektiert werden, zur Auswertung wurde der CT-Wert auf 36 festgelegt. Für eine detaillierte Beschreibung des Diagramms s. Abb. 34.**

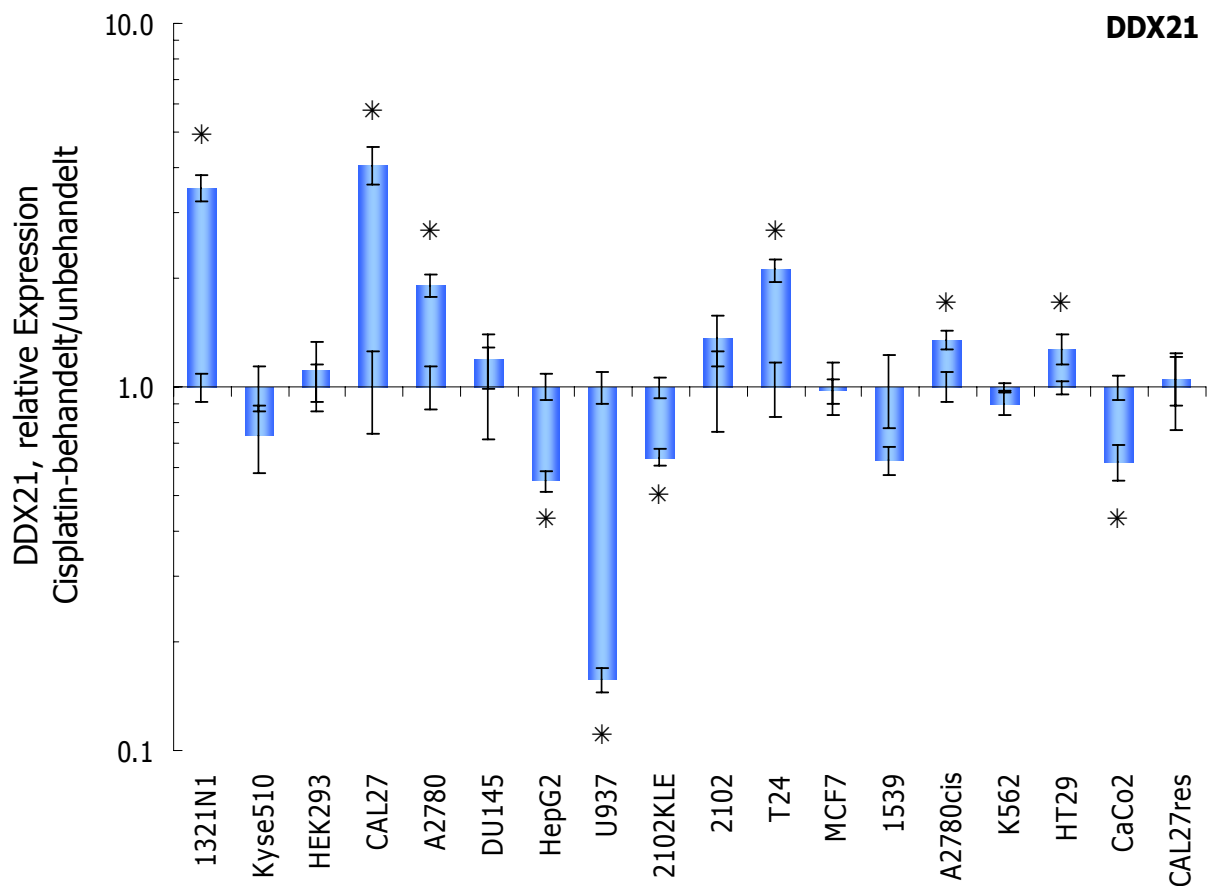
Das Gen **PI15** kodiert für einen 25 kDa schweren Trypsin-Inhibitor, der als Sekretionsprotein von humanen Glioblastomzellen erstmals gefunden wurde [122]. Yamakawa et al. fanden es stark exprimiert in humanen Neuroblastom- und



Glioblastom-Zellen. Bisher ist das PI15-Protein noch nicht weitreichend untersucht worden, und über die spezifische Funktion des Proteins liegen noch keine Erkenntnisse vor. In den qRT-PCR-Untersuchungen der differentiellen Genexpression der Ovarialkarzinom-Zelllinien in dieser Arbeit zeigte PI15 eine massive Überexpression mit und ohne Cisplatin-Inkubation in A2780 um den Faktor 300 (s. Abb. 32 und Tab. 63). Die Expression scheint also nicht durch Cisplatin induziert zu werden, sondern sie ist in der sensitiveren Zelllinie permanent höher. Die Untersuchungen der Zelllinien im Grundzustand, ohne Cisplatin-Inkubation, mittels cDNA Microarray wiesen ebenfalls eine Überexpression in der sensitiveren Zelllinie auf (s. Tab. 49). Auffällig ist die massive Überexpression in der Melanom-Zelllinie NW1539 nach Cisplatin-Behandlung um den Faktor 230. Allerdings liefert dieser Wert nur einen Anhaltspunkt. Er ist rechnerisch ermittelt worden, indem der CT-Wert der unbehandelten Probe auf 36 festgelegt wurde, nachdem nach 36 PCR-Zyklen kein Fluoreszenzsignal auftrat. Die Expression von PI15 konnte also in einer Reihe von Tumorzelllinien heterogenen Ursprungs nachgewiesen werden. In den untersuchten Zelllinien konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Expression vor und nach Cisplatin-Behandlung und der Chemosensitivität gegenüber Cisplatin beobachtet werden.

Es handelt sich bei PI15 um ein interessantes Kandidaten-Gen für zukünftige Studien, vor allem wegen der massiven differentiellen Expression in Cisplatin-sensitiven und -resistenten Ovarialkarzinom-Zelllinien.

Die Abb. 36 zeigt des Genexpressionsprofil von **DDX21** vor und nach Cisplatin-Behandlung. Es ist nur eine stärkere Hochregulierung nach Cisplatin-Behandlung in den Zelllinien 1321N1 (4fach), CAL27 (4fach) und T24 (2fach) und A2780 (1,8fach) zu beobachten. Eine signifikant stärkere Expression in der unbehandelten Probe zeigt sich nur in den Zelllinien HepG2, U937, 2102KLE und CaCo2. In 8 Zelllinien tritt keine signifikante Regulierung von DDX21 nach Cisplatin-Behandlung auf.



**Abb. 36: Relative Expression ( $\pm$  SD) der qRT-PCR Analyse des Gens DDX21 in 18 Tumorzelllinien nach Cisplatin-Behandlung. Für eine detaillierte Beschreibung des Diagramms s. Abb. 34.**

**DDX21** stammt aus der Familie der DEAD-Box-Proteine, die durch das konservierte Motiv Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD) charakterisiert sind. Es handelt sich um RNA-Helikasen, die aber noch weitere, teilweise von der Helikase-Aktivität unabhängige Funktionen ausüben [111]. DDX21 wurde erstmals als ein nukleäres Protein isoliert, das von einem Autoimmun-Antikörper eines Patienten mit der „watermelon stomach

disease“ erkannt wurde [113]. Westermarck et al. identifizierten DDX21 schließlich als einen Co-Faktor für die c-Jun aktivierte Transkription [112]. Es scheint dabei als Helikase in Erscheinung zu treten. c-Jun ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Stress-Antwort, Apoptose und Zell-Differenzierung eine wichtige Rolle spielt.

DDX21 zeigte in der Untersuchung der Genexpression der Zelllinien A2780 und A2780cis in dieser Arbeit eine 8fach höher Expression in A2780 (s. Abb. 32). Ohne Cisplatin-Inkubation wies DDX21 keine differentielle Genexpression zwischen A2780 und A2780cis auf (s. Microarray-Untersuchung, Tab. 49) Im Rahmen der Aufnahme des Genexpressionsprofils in 18 verschiedenen Tumorzelllinien zeigte sich wiederum nach Cisplatin-Inkubation (24 h, Auswaschphase 48 h; s. Abb. 36) eine um den Faktor zwei höhere Expression in der Zelllinie A2780 im Vergleich zur unbehandelten A2780. Die Expression von DDX21 scheint also durch Cisplatin in der sensitiven Zelllinie heraufreguliert oder in der resistenteren Zelllinie herunterreguliert zu werden. Der gleiche Effekt ist auch in den Kopf- und Halstumor-Zelllinien CAL27 und CAL27res zu beobachten (s. Abb. 36). In CAL27 zeigte DDX21 eine Expressionserhöhung um den Faktor vier nach Cisplatin-Behandlung, wohingegen in der resistenteren Zelllinie CAL27res kein Expressionsunterschied zu sehen war. Ansonsten zeigte sich nur in den Zelllinien 1321N1 und T24 eine Expressionserhöhung um den Faktor zwei bis vier und eine Expressionserniedrigung um den Faktor sechs in der Zelllinie U937.

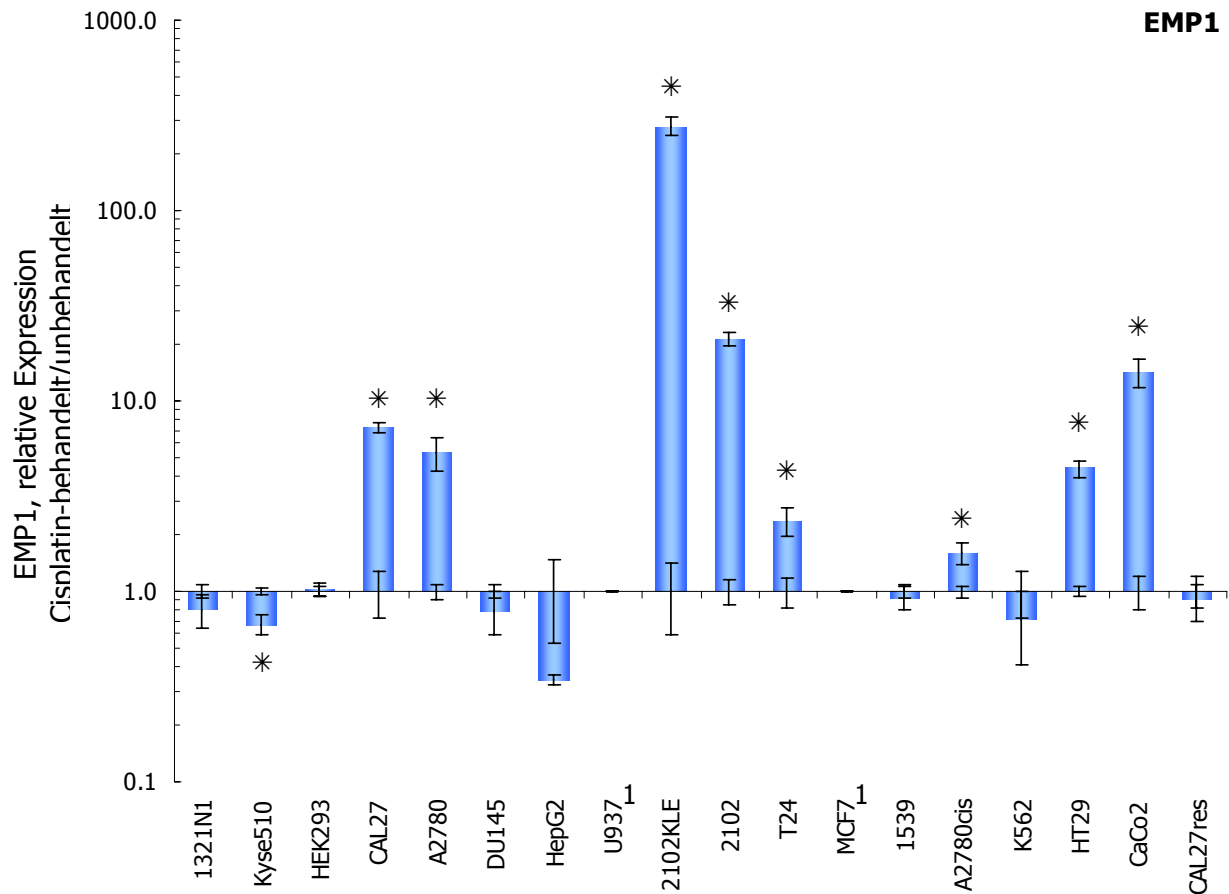
Die Stress-induzierten Proteinkinasen JNK (c-jun N-terminale Kinase) und p38 werden seit einiger Zeit als wichtige Mediatoren in der Induktion der Apoptose durch bestimmte Stress-Stimuli beschrieben. Unter anderem scheinen sie auch an der Signaltransduktion nach zytotoxischem Stress wie z. B durch Cisplatin beteiligt zu sein [123;124]. Mansouri et al. untersuchten den Einfluss von Cisplatin auf die MAPK-Signaltransduktionskaskaden der drei MAPKs JNK, p38 und ERK (Extracellular signal-regulated Kinase) in einem Ovarialkarzinom-Zelllinienpärchen [125]. Sie fanden eine längere Aktivierung der JNK und p38-Signaltransduktion in der sensitiveren Zelllinie und konnten nach Blockierung dieser beiden Wege eine Abnahme der Cisplatin-induzierten Apoptose beobachten. Sie postulieren eine Induktion der Apoptose durch Cisplatin über den  $JNK \Rightarrow c-Jun \Rightarrow FasL$  Signalweg. Ein wichtiger Transkriptionsfaktor der JNK-Signaltransduktion ist das c-Jun. Es wird durch JNK phosphoryliert und dimerisiert dann zu dem DNA-Transkriptionsfaktor AP-1. Nachfolgend kommt es zur

Bindung an Promotorregionen von verschiedenen Zielgenen, u. a. dem FasL. Dieses wiederum vermittelt über seinen FAS-Rezeptor ein proapoptotisches Signal. Die in dieser Arbeit beobachtete höhere Expression von DDX21 in den sensitiveren Zellen nach Cisplatin-Induktion scheint eine logische Konsequenz der erhöhten JNK/c-Jun-Aktivität zu sein. Als Helikase ist DDX21 bei der Transkription der c-Jun-Zielgene beteiligt [112]. Die verminderte DDX21-Expression in der resistenteren Zelllinie A2780cis könnte Bestandteil eines Resistenzmechanismus gegenüber Cisplatin sein. Die über den JNK-Signalweg und FasL vermittelte Apoptose wird auf diese Weise gestört.

## 4.4 Epitheliales Membranprotein 1 (EMP1)

### 4.4.1 Gexpressionsprofil in 18 Tumorzelllinien

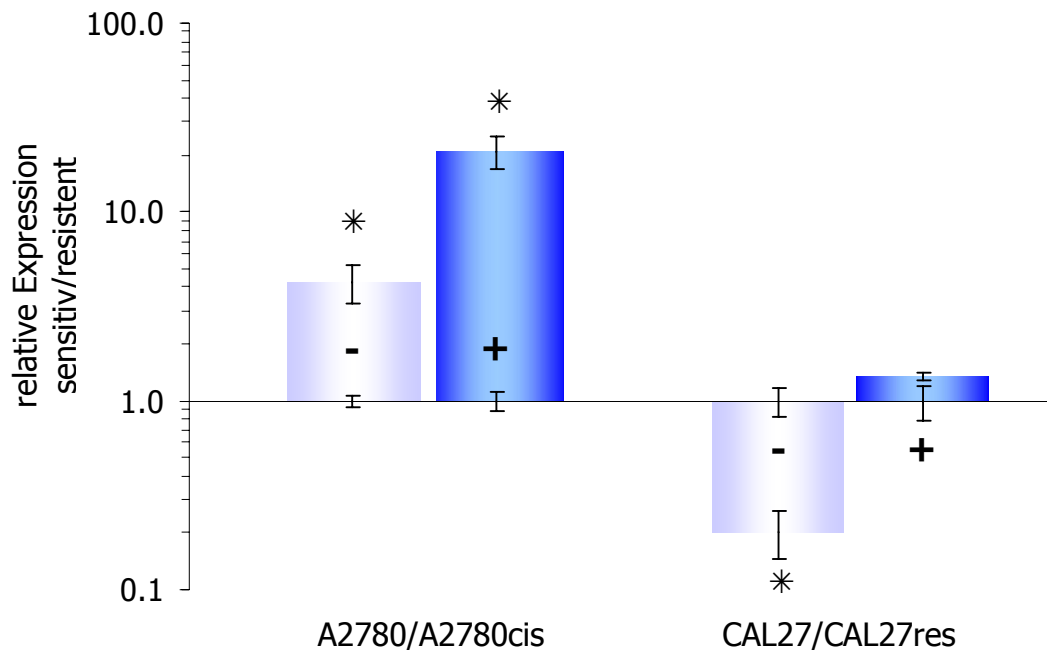
Das Genexpressionsprofil des Gens **EMP1** vor und nach Cisplatin-Behandlung in den 18 Zelllinien ist in Abb. 37 gezeigt. Bis auf eine Herunterregulierung um den kleinen Faktor von 1,5 nach Cisplatin-Behandlung in der Zelllinie Kyse510 wird das Gen EMP1 nach Cisplatin-Behandlung nur signifikant hochreguliert. Die stärkste Regulierung weist dabei die Hodenkarzinomzelllinie 2102KLE mit einem Faktor von 277 auf, gefolgt von ihrer parentalen Zelllinie 2102 mit einem Faktor von 21. In der Kolorektalkarzinom-Zelllinie CaCo2 erfährt EMP1 eine 14fache Hochregulierung. Weitere Hochregulierungen weisen die Zelllinien CAL27 (7fach), A2780 (5fach), T24 (2fach) und HT29 (4fach) auf. Die Zelllinien 1321N1, Hek293, DU145, HepG2, 1539, K562 und Cal27res reagieren nach Cisplatin-Behandlung nicht mit einer differentiellen Expression. In den Zelllinien U937 und MCF7 konnte nach 36 PCR-Zyklen in beiden untersuchten Proben keine Expression detektiert werden.



**Abb. 37: Relative Expression ( $\pm$  SD) der qRT-PCR-Analyse des Gens EMP1 in 18 Tumorzelllinien nach Cisplatin-Behandlung. Für eine detaillierte Beschreibung des Diagramms s. Abb. 34.**

Die mehrfach im Rahmen dieser Arbeit gefundene differentielle Expression von EMP1 in den Ovarialkarzinomzelllinie A2780 und A2780cis sowie die gezeigte Induktion der Expression auf Cisplatin-Behandlung in einer Reihe von verschiedenen Tumorzelllinien inklusive A2780 und A2780cis als auch die dem Gen EMP1 zugesprochenen Funktionen in der Zellproliferation und Apoptose, lassen dieses Gen als ein interessantes Kandidaten-Gen im Hinblick auf die Untersuchung der Cisplatin-Resistenz erscheinen. Des Weiteren weisen die Untersuchungen von Jain et al. und Mackay et al. auf interessante funktionelle Zusammenhänge mit der Weiterleitung von Signalen der Wachstumsfaktor-Rezeptoren hin [107;126]. Ein Zusammenhang von EMP1 und Cisplatin-Resistenz ist bisher jedoch noch nicht untersucht worden. Aus diesen Gründen sollte die Funktion des Genes EMP1 in nachfolgenden Untersuchungen näher beleuchtet werden.

In Abb. 38 ist der Vergleich der Expression von EMP1 in den beiden Zelllinien A2780 und A2780cis und CAL27 und CAL27res dargestellt. Es wurden jeweils die mit Cisplatin behandelten (dunkelblau) und die unbehandelten (hellblau) Proben aus der vorangegangenen qRT-PCR-Analyse miteinander verglichen.



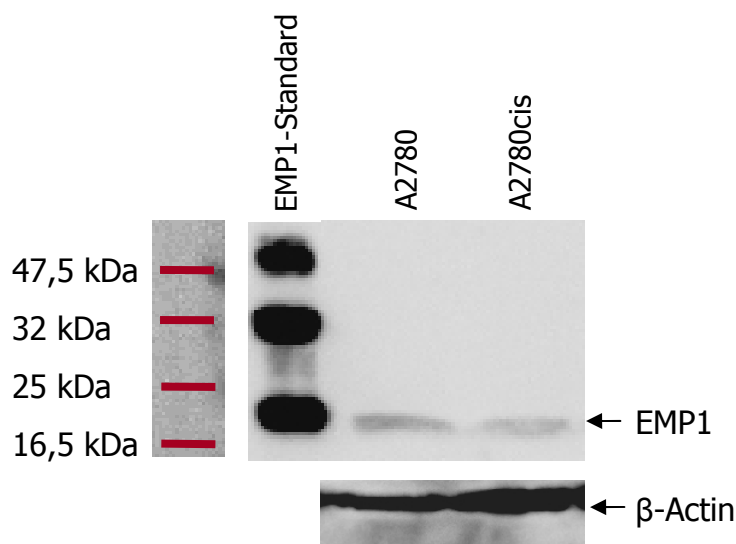
**Abb. 38: Relative Expression von EMP1 in den Zelllinien-Pärchen A2780/A2780cis und CAL27/CAL27res.** Es wurden jeweils die unbehandelten (hellblau, -) und die behandelten (dunkelblau, +) Proben aufeinander bezogen. Die Expression in den Cisplatin-resistenteren Sub-Zelllinien (A2780cis und CAL27res) wurde auf 1 normalisiert. Ein Expressionslevel größer 1 stellt eine Überexpression in der Zelllinie A2780 bzw. CAL27 dar, ein Expressionslevel kleiner 1 stellt eine Überexpression in der Zelllinie A2780cis bzw. CAL27res dar. Es wurden hier dieselben Daten und die gleiche Auswertmethode herangezogen, wie bereits bei den vorangegangenen Untersuchungen der 18 Zelllinien.

Für das Zelllinien-Pärchen A2780 und A2780cis bestätigen sich die Ergebnisse aus den vorangegangenen Experimenten (s. Tab. 47 und Abb. 32). In der unbehandelten Probe (hellblau) ist EMP1 in der Zelllinie A2780 um den Faktor 4 stärker exprimiert, welches sich nach Cisplatin-Inkubation (hier 24 h + 48 h Auswaschphase) nochmals signifikant auf den Faktor 21 verstärkt. Interessanterweise kehrt sich das Bild in der Kopf- und Halstumorzelllinie CAL27 um. Dort ist EMP1 im Grundzustand (ohne Cisplatin-Inkubation) 5fach stärker in der resistenten Sub-Zelllinie CAL27res

exprimiert. Nach Cisplatin-Behandlung ist kein signifikanter Expressionsunterschied mehr zwischen sensibler und resistenter Zelllinie zu erkennen.

#### 4.4.2 EMP1-Expression in A2780 und A2780cis auf Proteinebene

Um das Vorhandensein des Genproduktes von EMP1 zu untersuchen wurde mit den Proteinproben der Zelllinien A2780 und A2780cis ein Immunoblot erstellt. Zur Aufrechterhaltung der Cisplatin-Resistenz wurde die Zelllinie A2780cis über einen Zeitraum von 2 Monaten wöchentlich für 4 h mit 1-2  $\mu\text{M}$  Cisplatin (entspricht der  $\text{IC}_{50}$  der sensiblen A2780) inkubiert. Nach einem 2monatigen Cisplatin-freien Intervall wurden die Proteine isoliert. Der Resistenzfaktor der verwendeten A2780cis lag in der gleichen Größenordnung wie in den qRT-PCR-Experimenten dieser Arbeit (Faktor 5-6). In Abb. 39 ist zu erkennen, dass beide Zelllinien das EMP1-Protein (17,5 kDa + Glykosylierung) produzieren. Bei dem EMP1-Standardprotein handelt es sich um ein GST-Fusionsprotein, welches wohl auch ohne GST-tag und dimerisiert vorliegt (32 kDa). Ebenso wie in den qRT-PCR Expressionsstudien zeigt sich auch auf der Proteinebene eine höhere Konzentration von EMP1 in der sensibleren Zelllinie A2780 im Gegensatz zu der Zelllinie A2780cis.



**Abb. 39: Immunoblot von EMP1 in den Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780cis. Die aufgetragenen Proteinmengen wurden mit dem  $\beta$ -Actin-Antikörper kontrolliert.**

#### 4.4.3 Überexpression von EMP1 in Ovarialkarzinom-Zelllinien

Um den Einfluss von EMP1 auf die Sensitivität der Zelllinien A2780 und A2780cis weiter zu untersuchen, wurden EMP1-überexprimierende Zelllinien etabliert. Dafür wurde zunächst die kodierende Sequenz von EMP1 in den Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His kloniert und in *E. coli* vermehrt (s. Kapitel 3.11). Das nach der Aufreinigung erhaltene Plasmid wurde von der Firma MWG sequenziert. So konnte der korrekte Einbau der EMP1-Sequenz bestätigt werden. Es folgte die Transfektion der Zelllinien A2780 und A2780cis mit dem gewonnenen EMP1-Plasmid und eine Selektion von Einzelklonen (s. Kapitel 3.12).

#### Selektion der Einzelklone mittels PCR aus Zell-Lysaten

*Zum Test auf das Vorhandensein des EMP1-Inserts in den Klonen wurde eine PCR aus Zell-Lysaten der Klone durchgeführt. Dafür wurden die Primer des Gens EMP1 verwendet. Der linke Primer ragt über eine Exon/Exon Schnittstelle, sodass er nur an cDNA oder an die DNA des EMP1-Inserts hybridisieren kann, nicht aber an die genomische DNA von EMP1. Zur Kontrolle wurde parallel eine PCR-Reaktion mit einem Primer-Pärchen durchgeführt, das an genomische DNA hybridisieren kann (Primer E61).*

Die PCR-Ergebnisse einiger ausgewählter EMP1-Klone sind in Tab. 53 aufgeführt.

**Tab. 53: Beispielhafte PCR-Ergebnisse einiger selektierter EMP1-Überexpressionsklone der Zelllinie A2780. Gezeigt sind die CT-Werte, die mittels der Exon/Exon-Primer EMP1 und mittels der genomischen Kontroll-Primer E61 ermittelt wurden.**

Klon	CT EMP1	CT E61
K1	-	22,58
K3	26,28	24,50
K4	27,47	21,53
K5	22,26	20,73
K6	22,78	21,49
K7	23,35	21,38
K8	21,78	19,41
K9	24,31	21,26
K10	-	24,00



In den Klonen A2780EMP1 K3-9 wurden mit den EMP1-Primern CT-Werte zwischen 21 und 27 erhalten. Auch die E61-Primer, die genomische DNA amplifizieren, liefern alle ein Signal. In diesen Klonen scheint jeweils das Plasmid mit dem EMP1-Insert aufgenommen worden zu sein. Die Klone 1 und 10 hingegen zeigten nach Zyklus 40 noch kein EMP1-PCR Signal. In ihnen konnte das EMP1-Insert nicht nachgewiesen werden.

### Test auf Überexpression von EMP1 mittels qRT-PCR

Um eine vermehrte Expression von EMP1 auf mRNA-Ebene detektieren zu können, wurde mit den Klonen eine qRT-PCR Untersuchung durchgeführt. Dafür wurde zunächst die gesamtRNA isoliert. Nach einer DNase-Behandlung zur Entfernung von genomischer DNA-Verunreinigung wurde eine RT-Reaktion durchgeführt, gefolgt von einer PCR-Reaktion mit SYBR Green (s. 3.12.3). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm geNorm. Normalisiert wurden die Daten auf die bereits ermittelten HKG RPL13 und RPLP0. In Tab. 54 ist die relative Expression von EMP1 in dem Klon A2780-EMP K6 wiedergegeben.

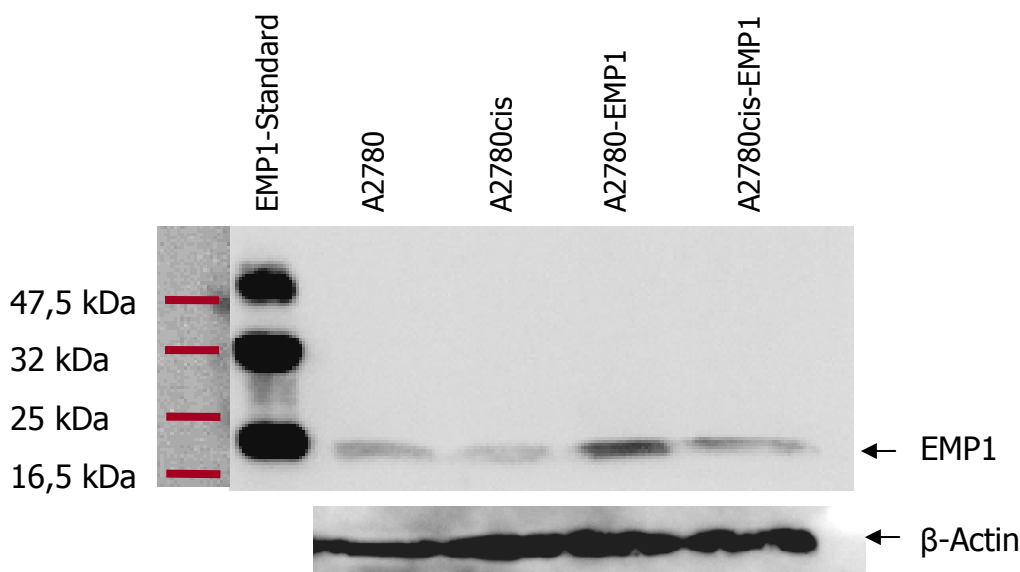
**Tab. 54: Exemplarische relative Expression des EMP1 Überexpressionsklons A2780-EMP1 im Vergleich zur parentalen Wildtyp Zelllinie A2780. Der Mittelwert errechnet sich aus drei PCR-Experimenten mit jeweils Duplikaten.**

PCR-Lauf	Probe	relative Expression	SD
20060711	A2780-EMP1	2,09	0,31
	A2780	1,00	0,00
20060717	A2780-EMP1	2,55	0,58
	A2780	1,00	0,31
20060825	A2780-EMP1	1,71	0,35
	A2780	1,00	0,23
<b>MW</b>	A2780-EMP1	<b>2,12*</b>	<b>0,41</b>
	A2780	<b>1,00</b>	<b>0,18</b>

Dieser Klon zeigte die höchste EMP1-Expression der untersuchten Klone. Bezogen wurde die Expression jeweils auf die Expression der Wildtyp-Zelllinie A2780. Der Überexpressionsklon A2780-EMP1 weist eine um den Faktor 2 signifikant höhere Expression von EMP1 als die Wildtyp-Zelllinie A2780 auf. Dieses Ergebnis liefert einen Hinweis auf eine EMP1-Überexpression in der neu etablierten Zelllinie. Sie wurde im Folgenden auf Proteinebene und anhand funktioneller Tests weiter untersucht.

### Test der EMP1-Expression auf Proteinebene in den EMP1-Klonen

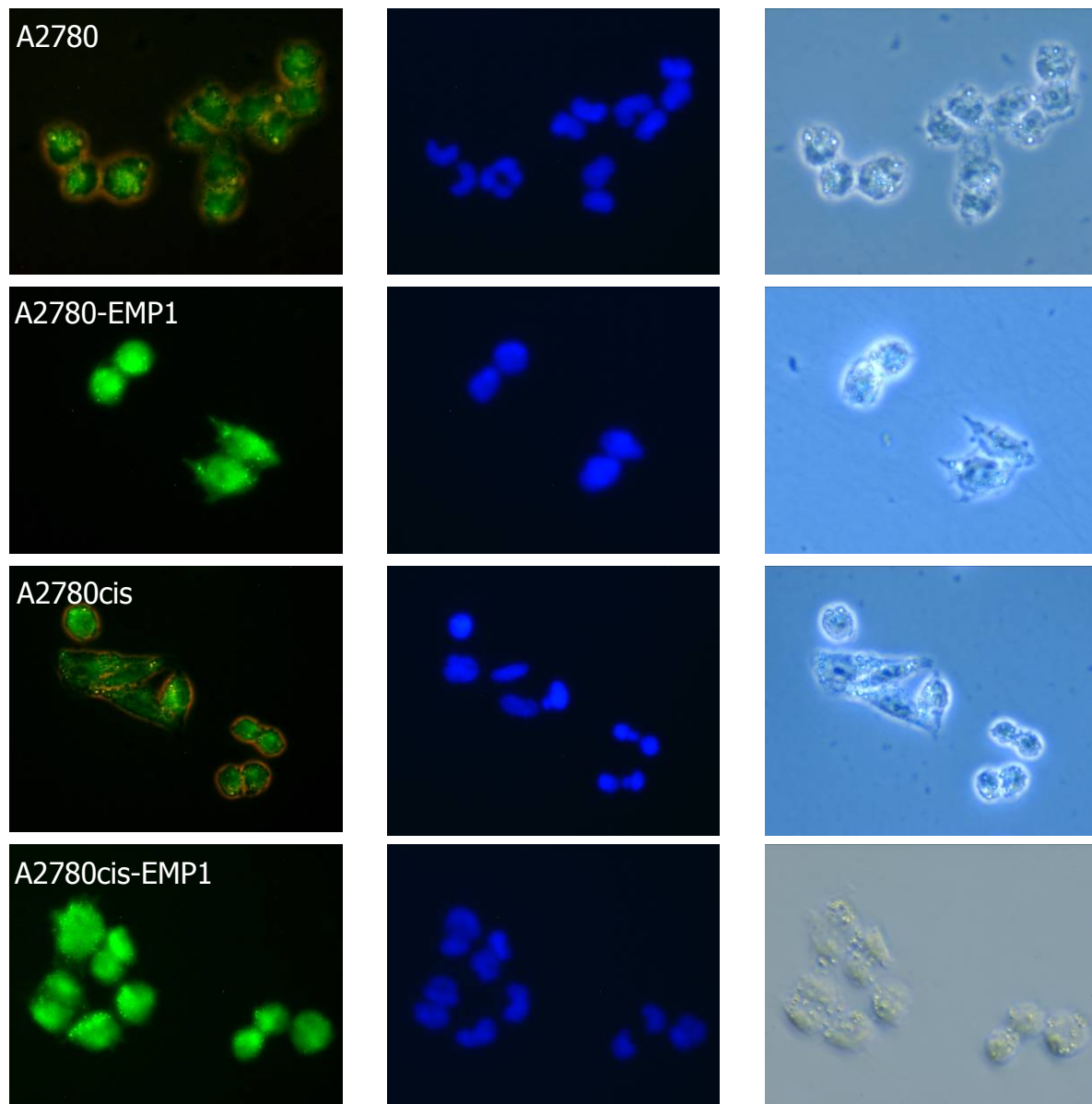
Die parentalen Zelllinien A2780 und A2780cis und die Überexpressionsklone A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1 wurden mittels Immunoblot-Analyse auf EMP1 untersucht (s. Abb. 40). Der Immunoblot zeigt auf der Höhe von 17,5 kDa die Bande von EMP1 in den untersuchten Proben sowie bei dem EMP1-Standard. In den Zelllinien A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1 ist deutlich eine stärkere Translation von EMP1 zu erkennen im Vergleich mit ihrer jeweiligen parentalen Zelllinie A2780 bzw. A2780cis. Die Proteinexpression der parentalen Zelllinien ist hier zur Veranschaulichung nochmals mit abgebildet. Die Daten wurden bereits in Abb. 39 gezeigt.



**Abb. 40: Immunoblot von EMP1 in den Ovarialkarzinom-Zellen A2780 und A2780cis und den Überexpressionsklonen A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1. Die aufgetragenen Proteinmengen wurden mit dem  $\beta$ -Actin-Antikörper kontrolliert.**

### Immunzytochemischer Nachweis von EMP1

Die zelluläre Verteilung und Protein-Expression von EMP1 wurde ebenfalls immunzytochemisch untersucht. Abb. 41 zeigt den Nachweis des EMP1-Proteins in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen einiger Zellen der Zelllinien A2780, A2780cis und der Transfektanten A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1.

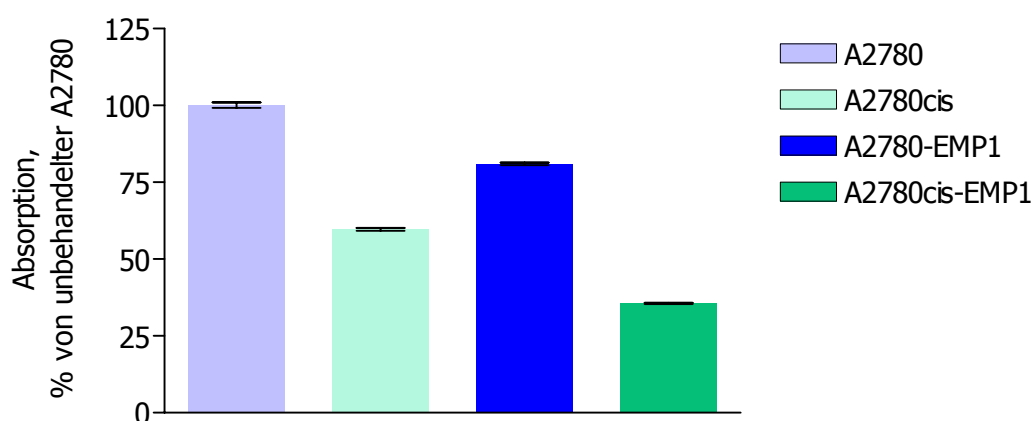


**Abb. 41: Immunzytochemischer Nachweis von EMP1 in den Zelllinien A2780, A2780cis und den Transfektanten A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1. Dargestellt sind jeweils im gleichen Bildausschnitt von links nach rechts die grüne Fluoreszenz des Alexa<sub>488</sub>-gekoppelten Sekundär-Antikörpers, gerichtet gegen den polyklonalen primären EMP1-Antikörper, die blaue DAPI-Färbung der Zellkerne und eine Durchlichtaufnahme derselben Zellen.**

Die Zellen wurden mit dem primären polyklonalen EMP1-Antikörper inkubiert und anschließend zur Fluoreszenzdetektion mit einem Alexa<sub>488</sub> gekoppelten Sekundärantikörper behandelt (grün). Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI-Anfärbung (blau). Vergleicht man die Fluoreszenzbilder (links) mit den Durchlichtaufnahmen (rechts) der Zellen, ist gut zu erkennen, dass das EMP1-Protein jeweils gleichmäßig über die Zelle verteilt ist. Dies spricht für eine Lokalisation in der Zellmembran, wie dies aufgrund seiner Aminosäurestruktur auch vermutet wird [105;106;127]. Des Weiteren deutet die stärkere grüne Fluoreszenz in den EMP1-Transfektanten A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1 im Vergleich zu den nativen Zellen auf eine höhere Protein-Expression von EMP1 in diesen Zellen hin.

#### 4.4.4 Wachstumsverhalten der EMP1-Überexpressionsklone

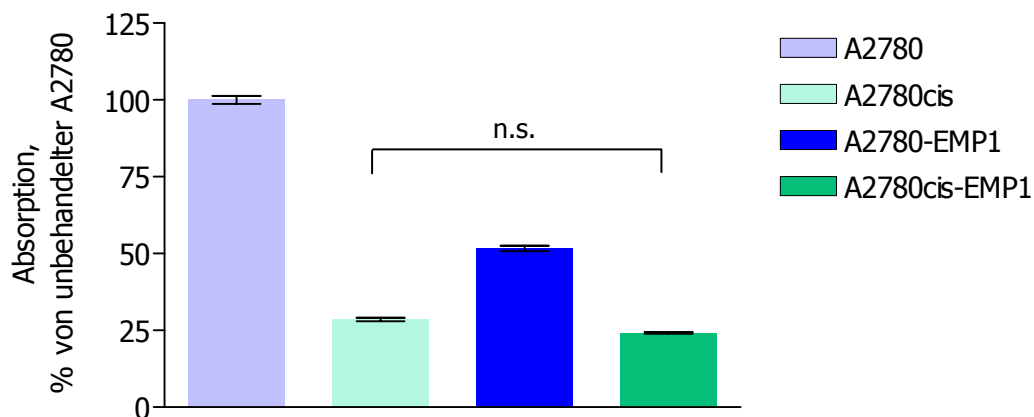
Parallel zu Untersuchungen des Wachstumsverhaltens der Zelllinien A2780 und A2780cis wurde das Wachstumsverhalten der Zelllinien A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1 untersucht. Es wurden ebenfalls die Absorptionswerte der unbehandelten Kontrollen von MTT-Tests ausgewertet. Ausgehend von einer gleichen Zellzahl lässt sich über den Testzeitraum von 72 h ein unterschiedlich schnelles Wachstum der Zelllinien beobachten (s. Abb. 42).



**Abb. 42: Prozentualisierte Absorptionswerte (MTT-Test nach 72 h von unbehandelten A2780, A2780cis, A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1)** A2780-Zellen wurden auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind  $MW \pm SE$  aus  $n = 2$  mit 6 Replikaten. Alle Balken sind hoch signifikant verschieden voneinander ( $p < 0,001$ ; Tukeys Multipler Vergleichstest).

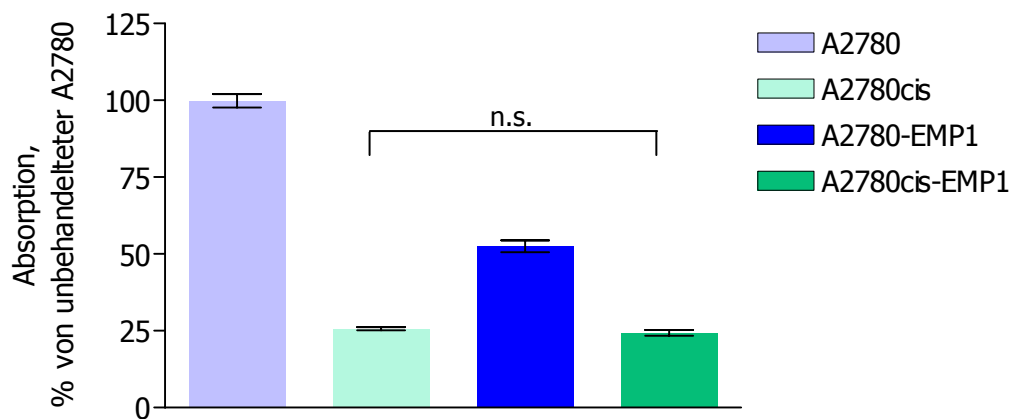
Die EMP1-überexprimierende Zelllinie A2780-EMP1 weist eine signifikant niedrigere Wachstumsgeschwindigkeit auf als ihre Ursprungszelllinie A2780 (81 % von A2780). Die Wachstumsgeschwindigkeit ist jedoch größer als die der resistenteren Zelllinie A2780cis. Die EMP1-überexprimierende Zelllinie A2780cis-EMP1 besitzt nur noch eine Wachstumsgeschwindigkeit von 35 % gegenüber A2780 und wächst somit auch langsamer als ihre Ursprungszelllinie A2780cis, die noch eine Wachstumsgeschwindigkeit von 60 % aufweist.

Nach 96 h ist die Differenz der Wachstumsgeschwindigkeit zwischen den A2780-Zellen und den A2780-EMP1-Zellen noch etwas größer (s. Abb. 43). Jetzt beträgt die Absorption der unbehandelten A2780-EMP1-Zellen noch 52 % von der A2780-Kontrolle. Ebenso ist die Differenz der Wachstumsgeschwindigkeit der A2780cis-Zellen zu den A2780-Zellen größer geworden. Die Absorption der unbehandelten A2780cis-Zellen beträgt nur noch 29 % von der A2780-Kontrolle und ist somit fast auf das Niveau der A2780cis-EMP1-Zellen gesunken (24 %).



**Abb. 43: Prozentualisierte Absorptionswerte (MTT-Test nach 96 h von unbehandelten A2780, A2780cis, A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1) A2780-Zellen wurden auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind MW  $\pm$  SE aus 6 Replikaten. Bis auf die bezeichneten Balken sind alle Balken hoch signifikant verschieden voneinander ( $p < 0,001$ ; Tukeys Multipler Vergleichstest).**

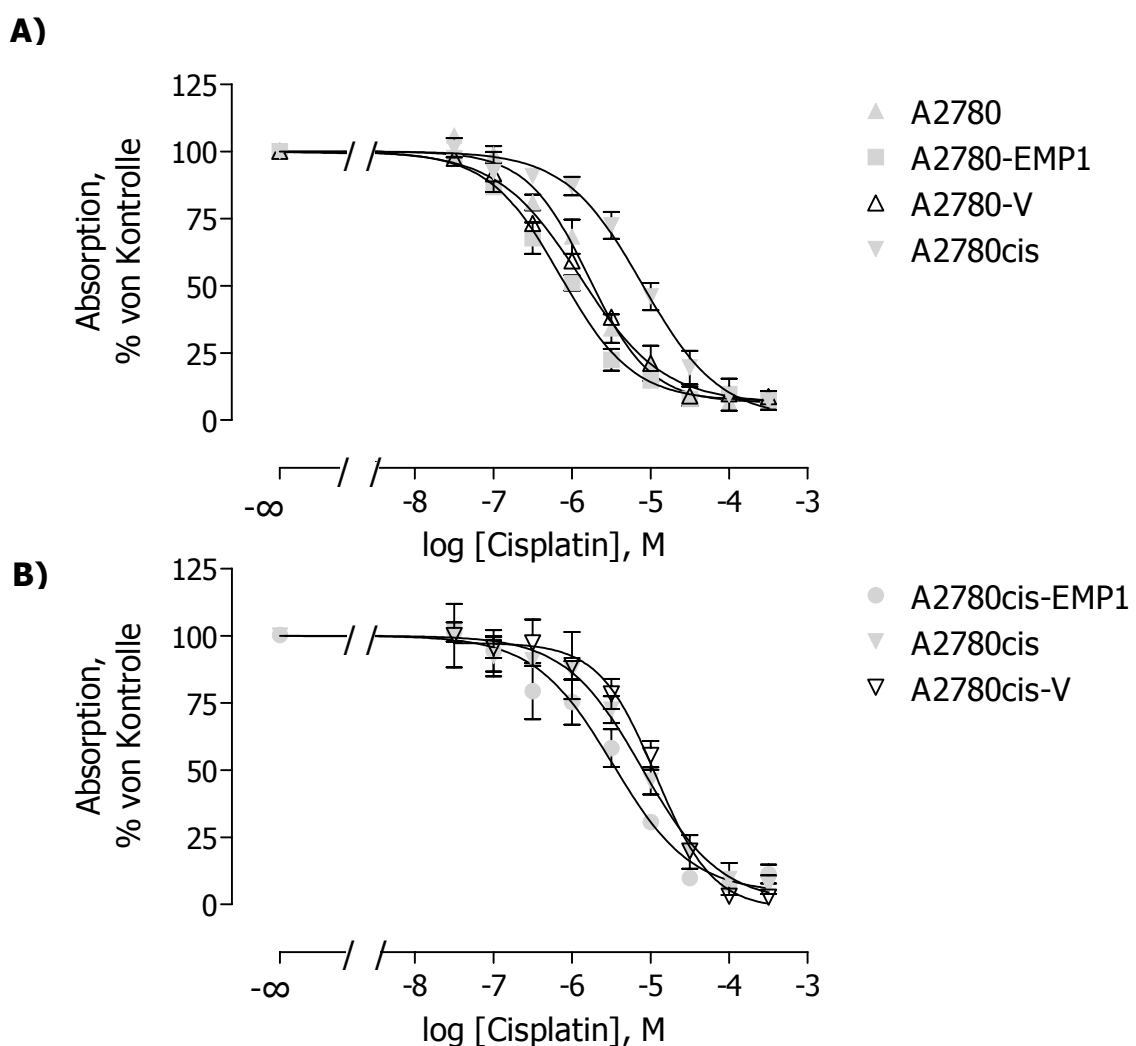
Der BrdU-Proliferationstest liefert vergleichbare Ergebnisse (s. Abb. 44). Nach 96 h liegt die Proliferationsrate der resistenten Zelllinie A2780cis nur noch bei 25 % von A2780. Die EMP1-Überexpressionsklone A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1 zeigen ebenfalls eine signifikant geringere Proliferationsrate als die Ursprungszelllinie A2780 (52 % bzw. 24 % von A2780). Die Proliferationsraten der A2780cis und der A2780cis-EMP1 zeigen keinen signifikanten Unterschied.



**Abb. 44: Prozentualisierte Absorptionswerte (BrdU-Test nach 96 h von unbehandelten A2780, A2780cis, A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1) A2780-Zellen wurden auf 100 % gesetzt. Dargestellt sind MW  $\pm$  SE aus 6 Replikaten. Bis auf die bezeichneten Balken sind alle Balken hoch signifikant verschieden voneinander ( $p < 0,001$ ; Tukeys Multipler Vergleichstest).**

#### 4.4.5 Wachstumsverhalten der EMP1-Überexpressionsklone in Gegenwart von Cisplatin mittels MTT-Test

Zur Untersuchung der Auswirkung einer EMP1-Überexpression auf die Cisplatin-Toleranz wurden mit den Wildtypzelllinien A2780, A2780cis, den Leervektorkontrollen A2780-V und A2780cis-V und den EMP1-Expressionsklonen A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1 MTT-Tests durchgeführt. Abb. 45 zeigt die Konzentrations-Wirkungskurven von 5 bis 11 zusammengefassten, auf die unbehandelte Kontrolle normalisierten Daten.



**Abb. 45: Konzentrations-Wirkungskurven (MW ± SE) der Cisplatin-Resistenztestung der Zelllinien A) A2780-EMP1, A2780-V, A2780 und A2780cis, sowie B) A2780cis-EMP1, A2780cis und A2780cis-V mittels MTT-Test. Gezeigt sind die auf die unbehandelte Kontrolle normierten Daten von 1 bis 11 Experimenten mit jeweils Triplikaten. Anzahl der einzelnen Experimente s. Tab. 55.**

In Tab. 55 sind die aus den Konzentrations-Wirkungskurven ermittelten Werte der Cisplatin-Resistenztestung aufgeführt und in Tab. 56 die entsprechenden Resistenzfaktoren aufgelistet.

**Tab. 55: Daten der Cisplatin-Resistenztestung mittels MTT-Test der Wildtypzelllinien A2780 und A2780cis, der EMP1-Expressionsklone A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1 und der Leervektor-transfizierten Klone A2780-V und A2780cis-V, abgeleitet aus den ermittelten Konzentrations-Wirkungskurven aus Abb. 45.**

	IC <sub>50</sub> [µM]	pIC <sub>50</sub> ± SE	n
<b>A2780</b>	1,63	5,79 ± 0,06	9
<b>A2780cis</b>	7,87	5,10 ± 0,10	5
<b>A2780-EMP1</b>	0,71	6,15 ± 0,05	11
<b>A2780cis-EMP1</b>	3,31	5,48 ± 0,10	3
<b>A2780-V</b>	1,27	5,90 ± 0,06	11
<b>A2780cis-V</b>	11,7	4,93 ± 0,10	1

**Tab. 56: Resistenzfaktoren gegenüber Cisplatin der mittels MTT-Test untersuchten Zelllinienpärchen.**

	<b>A2780cis/ A2780</b>	<b>A2780/ A2780-EMP1</b>	<b>A2780-V/ A2780-EMP1</b>	<b>A2780/ A2780-V</b>
<b>RF</b>	4,8***	2,3***	1,8**	1,3 <sup>n.s.</sup>

	<b>A2780cis/ A2780cis-EMP1</b>	<b>A2780cis-V/ A2780cis-EMP1</b>	<b>A2780cis-V/ A2780cis</b>
<b>RF</b>	2,4*	3,5*	1,5 <sup>n.s.</sup>

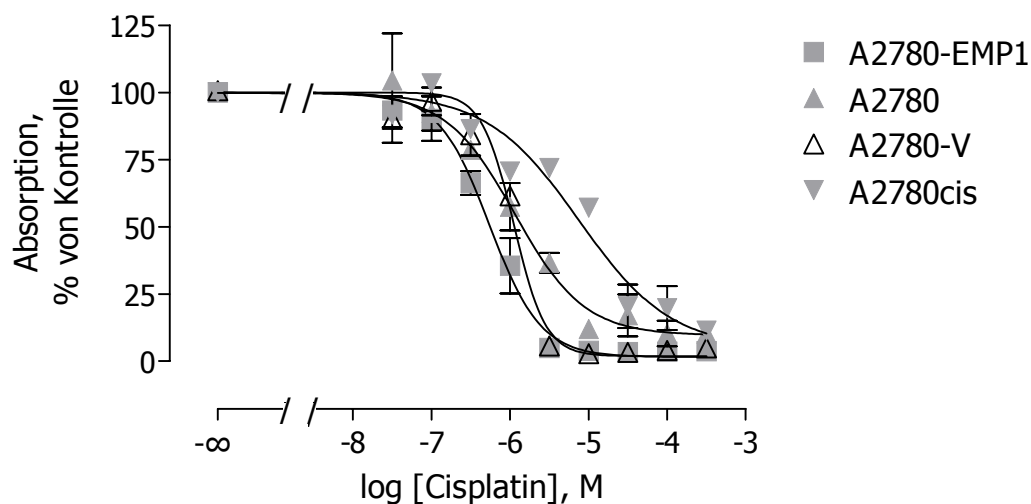
Die Zelllinie A2780cis besitzt gegenüber der parentalen Zelllinie A2780 einen Resistenzfaktor gegenüber Cisplatin von 4,8. Die Zelllinie A2780-EMP1 weist eine um den Faktor 2,3 höhere Sensitivität gegenüber Cisplatin auf als die parentale Zelllinie A2780 und eine um den Faktor 1,8 signifikant höhere Sensitivität als die mit dem Leervektor transfizierte Zelllinie A2780-V. Die Leervektorkontrolle und die ursprüngliche Zelllinie A2780 zeigen keine signifikant unterschiedliche Sensitivität gegenüber Cisplatin. Ähnlich verhält es sich mit den Klonen der Zelllinie A2780cis.



Auch hier weist der mit EMP1 transfizierte Klon A2780cis-EMP1 eine um den Faktor 2,4 (3,5) höhere Sensitivität auf als die Ursprungszelllinie A2780cis (A2780cis-V). Die Leervektorkontrolle ist in ihrem Resistenzfaktor gegenüber Cisplatin nicht signifikant verschieden von der Zelllinie A2780cis.

#### 4.4.6 Proliferationsverhalten der EMP1-Überexpressionsklone in Gegenwart von Cisplatin mittels BrdU-Test

Die gleiche Sensitivierung des EMP1-Überexpressionsklons gegenüber Cisplatin wird auch durch den BrdU-Test bestätigt. Die ermittelten Konzentrations-Wirkungskurven sind in Abb. 46 angegeben. Die entsprechenden Resistenzwerte und Resistenzfaktoren sind in Tab. 57 und Tab. 58 aufgeführt.



**Abb. 46: Konzentrations-Wirkungskurven (MW ± SE) der Cisplatin-Resistenztestung der Zelllinien A2780-EMP1, A2780, A2780-V und A2780cis mittels BrdU-Test. Gezeigt sind die auf die unbehandelte Kontrolle normierten Daten von 2-4 Experimenten mit jeweils Triplikaten.**

**Tab. 57: Daten der Cisplatin-Resistenztestung mittels BrdU-Test des EMP Expressionsklones A2780-EMP1, des Leervektorklones A2780-V und der Wildtypzelllinien A2780 und A2780cis, abgeleitet aus den ermittelten Konzentrations-Wirkungskurven aus Abb. 46.**

	IC <sub>50</sub> [µM]	pIC <sub>50</sub> ± SE	n
<b>A2780</b>	1,15	5,94 ± 0,09	4
<b>A2780cis</b>	7,53	5,12 ± 0,19	2
<b>A2780-EMP1</b>	0,55	6,26 ± 0,06	4
<b>A2780-V</b>	1,11	5,95 ± 0,04	5

**Tab. 58: Resistenzfaktoren gegenüber Cisplatin der mittels BrdU-Test untersuchten Zelllinienpärchen.**

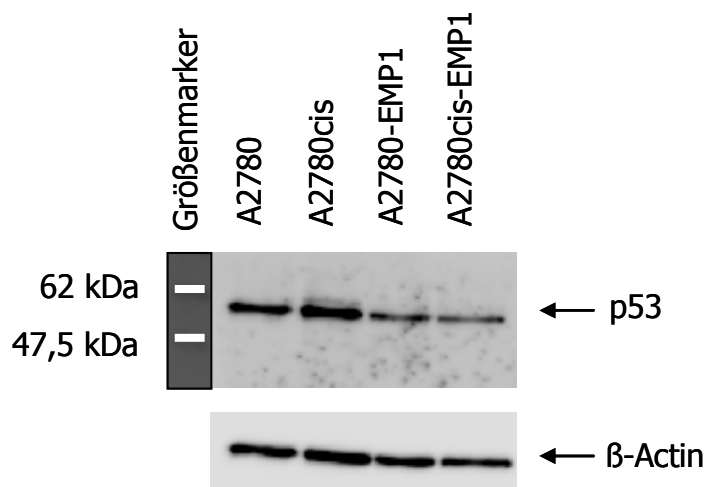
	A2780cis/ A2780	A2780/ A2780-EMP1	A2780-V/ A2780-EMP1	A2780/ A2780-V
<b>RF</b>	6,3*	2,1*	2,0**	1,0 <sup>n.s.</sup>

A2780-EMP1 weist einen IC<sub>50</sub>-Wert von 0,55 µM auf im Gegensatz zur parentalen Zelllinien A2780 mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 1,15 µM. Daraus ergibt sich ein Resistenzfaktor von 2,1. Dieser Faktor wird auch bezogen auf die A2780-V Leervektorkontrolle ermittelt. Die parentale Zelllinie A2780 und die Leervektorkontroll-Zelllinie unterscheiden sich nicht in der Cisplatin-Sensitivität. Die resistente Zelllinie A2780cis weist einen um den Faktor 6,3 höheren Resistenzgrad gegenüber der parentalen Zelllinie A2780 auf. Er liegt somit in der gleichen Größenordnung wie der mittels MTT-Test ermittelte Faktor. Auf die weitere Untersuchung des Resistenzfaktors der A2780cis-EMP1 mittels BrdU-Test wurde an dieser Stelle verzichtet.

#### 4.4.7 Immunoblot-Analysen

##### p53-Expression auf Proteinebene

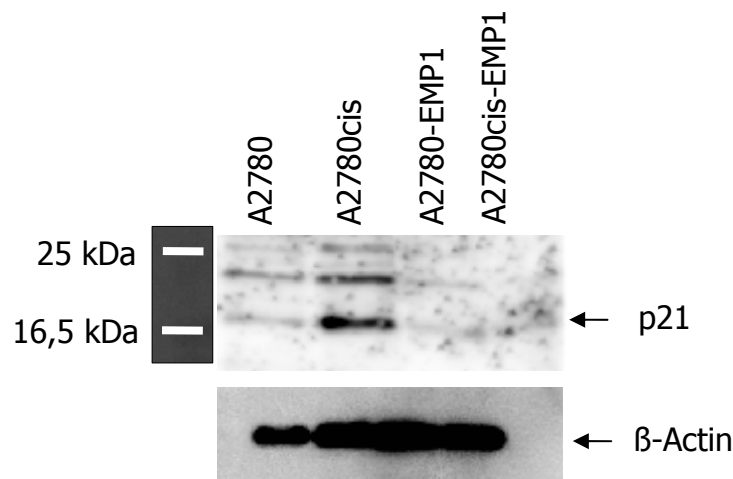
Da in den EMP1-Überexpressionsklonen eine Proliferationsminderung und eine Sensitivierung der Zellen gegenüber Cisplatin beobachtet wurde (s. Abb. 42 bis Abb. 46), sollte nach molekularen Mechanismen dieser Effekte gesucht werden. Aus diesem Grunde wurde die Proteinexpression des Tumorsuppressorgenes p53, welches eine zentrale Rolle in der Apoptose-Vermittlung spielt, näher untersucht. Die Expression des p53 Genes wurde mittels Immunoblot-Analyse nachgewiesen. Auf dem Blot (s. Abb. 47) ist deutlich zu erkennen, dass die EMP1-Überexpressionsklone der Zelllinien A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1 im Grundzustand, also ohne Cisplatin-Inkubation, weniger p53 exprimieren als ihre Ursprungszelllinien A2780 und A2780cis.



**Abb. 47: Immunoblot von p53 in den Ovarialkarzinom-Zellen A2780 und A2780cis und den Überexpressionsklonen A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1. Die aufgetragenen Proteinmengen wurden mit dem β-Actin-Antikörper kontrolliert.**

### p21-Expression auf Proteinebene

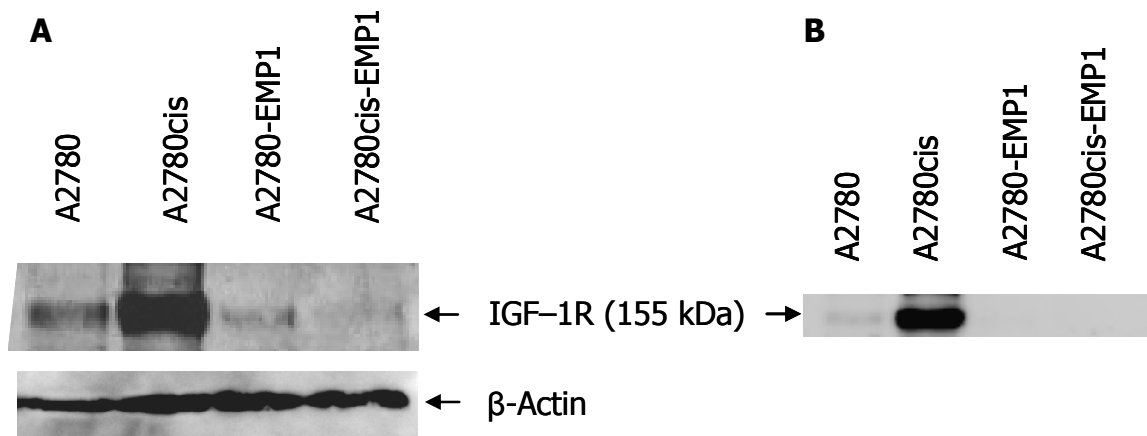
Das Gen p21 stellt einen wichtigen Regelpunkt in der Einleitung eines Zellzyklus-Arrestes dar. Da die EMP1-Überexpressionsklone ein vermindertes Wachstum aufweisen (s. Abb. 42 bis Abb. 44), sollte die Proteinexpression von p21 mittels Immunoblot-Analyse näher untersucht werden. Abb. 48 zeigt die Proteinexpression von p21 in den Zelllinien A2780, A2780cis und den EMP1-Überexpressionsklonen A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1. Es ist deutlich eine höhere Proteinexpression von p21 in der Zelllinie A2780cis zu erkennen. Sie ist etwas 2-3mal so hoch wie in der sensitiveren Zelllinie A2780. Die EMP1-Überexpressionsklone zeigen bei der verwendeten Auftragungsmenge von 20 µg Gesamtprotein kein nachweisbares p21 Protein.



**Abb. 48: Immunoblot von p21 in den Ovarialkarzinom-Zellen A2780 und A2780cis und den Überexpressionsklonen A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1. Die aufgetragenen Proteinmengen wurden mit dem β-Actin-Antikörper kontrolliert.**

### IGF-1R-Expression auf Proteinebene

Das Translationsprodukt des IGF-1R wurde mittels Immunoblot-Analyse nachgewiesen. Die Zelllinie A2780cis hat im Vorfeld des ersten Experimentes über zwei Monate kontinuierlich eine Induktion durch Cisplatin erfahren (wöchentlich 1-2  $\mu\text{M}$  Cisplatin für 4 h). Nach einer einwöchigen Auswaschphase wurden die Proteine isoliert (s. Abb. 49 A). Auf dem Blot ist deutlich zu erkennen, dass IGF-1R in der resistenten Zelllinie A2780cis stark exprimiert wird. In der sensitiven Zelllinie A2780 zeigt sich nur eine geringe Expression und die EMP1-Klone weisen eine sehr geringe bis keine IGF-1R-Expression auf Proteinebene auf. Nach einer 2monatigen Cisplatin-freien Phase der Zelllinie A2780cis änderte sich an diesem Bild nichts (s. Abb. 49 B).



**Abb. 49: Immunoblot von IGF-1R in den Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780cis und den Überexpressionsklonen A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1. A) Die Zelllinie A2780cis wurde vor dem Experiment 2 Monate mit Cisplatin behandelt (wöchentlich 1-2  $\mu\text{M}$ ; 4 h). Die aufgetragenen Proteinmengen wurden mit dem  $\beta$ -Actin-Antikörper kontrolliert. B) Die vorher mit Cisplatin behandelte Zelllinie A2780cis wurde einer 2monatigen Cisplatin-freien Phase unterzogen.**

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Die Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780cis

In dieser Arbeit wurde das Phänomen der Cisplatin-Resistenz anhand der Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780cis untersucht. Diese Zelllinien stellen ein gängiges Zellkulturmodell dar, welches in einer Vielzahl von Untersuchungen der Cisplatin-Resistenz Verwendung findet. Die Zelllinie A2780 stammt von einer unbehandelten Patientin ab und ist *in vitro* relativ sensitiv gegenüber Cisplatin [128]. 1987 wurde die resistente Sub-Zelllinie A2780cis erstmals von einer Arbeitsgruppe des „National Cancer Institutes“ durch intermittierende Cisplatin-Exposition der Ursprungszelllinie A2780 mit steigenden Konzentrationen über mehrere Passagen etabliert [129].

Es konnte in dieser Arbeit mittels Zytotoxizitäts-Untersuchungen (MTT-Test) gezeigt werden, dass die Cisplatin-resistentere Subzelllinie A2780cis im Vergleich zur Ursprungszelllinie A2780 einen Resistenzfaktor von 5 aufweist. Des Weiteren unterscheiden sich die hier untersuchten Zelllinien A2780 und A2780cis in ihrem Proliferationsverhalten. Es zeigte sich im MTT-Test nach 72 h eine um ca. 40 % signifikant geringere Wachstumsgeschwindigkeit der resistenteren Zelllinie A2780cis im Vergleich zur A2780-Zelllinie. Nach 96 h war die Wachstumsgeschwindigkeit sowohl im MTT-Test als auch im BrdU-Test auf ca. 25 % gesunken (s. Abb. 42 - Abb. 44). Die Beobachtung einer geringeren Wachstumsgeschwindigkeit der resistenteren Subzelllinie A2780cis wird ebenfalls in der Literatur beschrieben [130;131]. Das Proliferationsverhalten von Tumorzelllinien muss nicht mit ihrer Chemosensitivität gegenüber Cisplatin gekoppelt sein. Ein Beispiel für ein schnelleres Wachstum der Cisplatin-resistenten Zelllinie liefert die Mammakarzinom-Zelllinie MCF7, wohingegen das Zungenkarzinom-Zelllinienpärchen Cal27/Cal27res kein unterschiedliches Proliferationsverhalten aufweist (unveröffentlichte Daten von Dr. N. Eckstein Ceasar, Bonn und Dr. E. Gosepath, Universität Bonn).

Die Zelllinien A2780 und A2780cis unterscheiden sich auch hinsichtlich ihres Cisplatin-Aufnahmeverhaltens. Die Cisplatin-Aufnahme dieser Zelllinien wurde von J.

Zisowsky mittels Flammenloser-Atom-Absorptions-Spektroskopie (FAAS) untersucht [132]. Nach Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin und der Messung der Cisplatinaufnahme über einen Zeitraum von 0 - 120 min, ist in beiden Zelllinien ein kontinuierlicher Anstieg an intrazellulärem Cisplatin zu beobachten. Allerdings zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Menge an aufgenommenem Cisplatin zwischen der resistenten und der sensitiveren Zelllinie. Im Durchschnitt liegt die intrazelluläre Cisplatinkonzentration in der Zelllinie A2780cis 2,5fach niedriger als in der Zelllinie A2780. Die verminderte Aufnahme von Cisplatin stellt wohl einen Anteil an der Resistenz der A2780cis-Zellen gegenüber Cisplatin dar.

## 5.2 Differentielle Genexpression der SSH Kandidaten-Gene

Zunächst wurde in dieser Arbeit die differentielle Genexpression zwischen den Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780cis mittels SSH-Technik untersucht. Die SSH stellt eine geeignete Methode zur vergleichenden Genexpressionsanalyse dar und wird auch heute noch neben der neueren Microarray-Technik erfolgreich angewandt [133]. Teilweise werden beide Techniken auch hintereinander geschaltet, da mit der SSH bereits eine vorselektierte cDNA-Bibliothek erstellt werden kann [134;135]. Die quantitative Analyse der SSH Kandidaten-Gene mittels qRT-PCR ergab schließlich für das Gen HF1 eine Überexpression in der Zelllinie A2780cis. Die Gene PI15, DDX21 und EMP1 wurden in der Zelllinie A2780 höher exprimiert gefunden. Inwieweit diese Gene in anderen Tumorzellen eine Rolle spielen und wie sie auf die Behandlung mit Cisplatin reguliert werden, sollte in weiterführenden Untersuchungen der Genexpression in 18 verschiedenen Tumorzelllinien analysiert werden. Die drei Gene HF1, PI15 und DDX21 wurden bereits im Ergebnisteil vorgestellt und die Ergebnisse der Expressionsstudien kurz diskutiert. Im weiteren Verlauf sollen die Ergebnisse der Untersuchungen des Genes EMP1 näher betrachtet und diskutiert werden.

### 5.3 Epitheliales Membranprotein 1

EMP1 (Epithelial Membrane Protein 1/Epitheliales Membranprotein 1) ist ein Glykoprotein, bestehend aus 157 Aminosäuren, das mit vier transmembranären Domänen in der Zellmembran verankert ist. Alternative Bezeichnungen für EMP1 sind TMP (Tumor-associated Membrane Protein) und CL-20 (Squamous Cell-specific Protein). Es zeigt große strukturelle Ähnlichkeiten mit PMP22 (Peripheral Myelin Protein) und wird in die PMP22-Familie eingeordnet [105;136]. Die EMP-Subfamilie besteht noch aus zwei weiteren Mitgliedern, dem EMP2 und EMP3. EMP1 wurde ursprünglich aus einer myc-induzierten Maustumor-cDNA-Bibliothek isoliert [137]. Es konnte alsbald identifiziert werden als ein tumorassoziiertes Gen, da es im Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Gewebe überexprimiert vorkam [106].

Die EMPs sind in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, und es werden ihnen Funktionen bei der Regulierung von Zell-Zell-Erkennung, des Zell-Zyklus, der Zell-Differenzierung und der Apoptose zugesprochen [136;138-140].

Die mehrfach beobachtete, deutliche differentielle Expression in den Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780cis und die gezeigte differentielle Expression des Genes EMP1 auf Cisplatin-Behandlung ließen dieses Gen für weitere funktionelle Untersuchungen im Hinblick auf die Cisplatin-Resistenz interessant erscheinen. Um die Funktion von EMP1 in Bezug auf die Cisplatin-Resistenz näher zu untersuchen, wurden EMP1-überexprimierende Klone der Zelllinien A2780 und A2780cis durch stabile Transfektion etabliert. Die Überexpression konnte auf Proteinebene mittels Immunoblot-Analyse und ICC für die Klone beider Zelllinien bestätigt werden (s. Abb. 40 u. Abb. 41). Eine näher gehende Betrachtung von EMP1 und die Diskussion der Ergebnisse der Überexpressionsstudien erfolgt im weiteren Verlauf dieses Kapitels.

#### **Wachstumsverhalten und EMP1**

Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich die parentalen Zelllinien A2780 und A2780cis in ihrem Wachstumsverhalten. Die resistenterere Zelllinie A2780cis weist nach 72 h



eine um ca. 40 % geringere Proliferation auf als die Zelllinie A2780, welche eine höhere native EMP1-Expression zeigt.

Eine rekombinante EMP1-Überexpression scheint im Gegensatz dazu eine Verminderung der Proliferation zur Folge zu haben, da sich die EMP1-Überexpressionsklone durch ein vermindertes Wachstum nach 72 h gegenüber ihrer jeweiligen parentalen Zelllinie auszeichnen (s. Abb. 42). Nach 96 h ist dieser Effekt bei dem A2780cis-Klon nicht mehr zu beobachten, da dann auch bei der parentalen A2780cis ein stark vermindertes Wachstum auftritt, welches sich auf dem gleichen Niveau des A2780cis-EMP1-Klones bei ca. 25 % der A2780-Zelllinie einpendelt (s. Abb. 43). Es ist wahrscheinlich, dass der in den parentalen Zelllinien A2780 und A2780cis gefundene Proliferationsunterschied nicht alleine durch EMP1 gesteuert wird. Die beiden Zelllinien unterschieden sich nicht nur in der EMP1-Expression. Da es sich bei der Cisplatin-Resistenz um ein multifaktorielles Geschehen handelt, differieren die beiden Zelllinien auf mehreren Ebenen.

Dennoch könnte der Proliferationsunterschied teilweise durch die differentielle Expression von EMP1 bedingt sein. Untersuchungen von Ben-Porath et al. zeigen einen Zusammenhang zwischen EMP1, dem c-myc-Onkogen und der Tumorgenese [106;127]. Sie weisen in der EMP1-Promotorregion eine c-myc Bindestelle nach. Ebenso wurde von Bredel et al. [141] in humanen Glioblastomzellen eine Verknüpfung zwischen der Genexpression von c-myc und EMP1 gefunden. Beide Gene sind während der Gliomagenese hochreguliert. Die Autoren postulieren eine schnelle transkriptionelle EMP1-Induktion durch c-myc, welches einen proliferativen Effekt zur Folge hat.

Es werden aber auch antiproliferative Effekte von EMP1 in der Literatur beschrieben, die die von uns beobachteten Auswirkungen der EMP1-Überexpression in den Klonen bestätigen. Die transiente Überexpression von EMP1 in Immunoblasten minderte die Proliferation um mehr als 50 % [142]. Des Weiteren wurde in stark proliferierenden Subklonen einer Magenkarzinom-Zelllinie eine verminderte EMP1-Expression auf Proteinebene im Gegensatz zu der Ursprungszelllinie gefunden [143] und in einem Ösophagustumor führte die EMP1-Überexpression zu einer Proliferationshemmung, welches mit einem S-Phasen-Stopp und einer G<sub>1</sub>-Phasen-Verlängerung im Zellzyklus

erklärt wird [144]. Inwieweit der beobachtete antiproliferative Effekt in den A2780- und A2780cis-Klonen direkt von der EMP1-Überexpression herrührt, und auf welchem Wege dieser Effekt zustande kommt, kann an dieser Stelle nicht eindeutig geklärt werden. Die verminderte p53-Proteinexpression und die fehlende p21-Induktion (s. Abb. 47 und Abb. 48) weisen auf einen p53-unabhängigen Weg hin.

### **Cisplatin-Resistenz und EMP1**

Bei der Untersuchung der differentiellen Genexpression mittels SSH und nachfolgender qRT-PCR in dieser Arbeit wurde das Gen EMP1 in A2780 höher exprimiert gefunden als in der Zelllinie A2780cis (Faktor 41, s. Abb. 32). Schon im Grundzustand, also ohne Cisplatin-Induktion, ist EMP1 in den A2780-Zellen laut qRT-PCR um den Faktor vier höher exprimiert, dieser Faktor steigt nach 24stündiger Cisplatin-Behandlung und weiteren 48 h Auswaschphase auf 21 an (s. Abb. 38). Eine Microarray-Untersuchung der beiden Zelllinien im Grundzustand bestätigt die differentielle Expression von EMP1 (s. Tab. 49). Die Betrachtung des Expressionsprofils von EMP1 in den 18 untersuchten Tumorzelllinien zeigt bei der Mehrzahl der Zelllinien eine Induktion des Genes nach Cisplatin-Behandlung (s. Abb. 37). Es setzt sich also die in den Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780cis beobachtete Tendenz auch in Zelllinien anderer Genese fort. Auffallend ist vor allem die Induktion um den Faktor 277 in der Hodenkarzinom-Zelllinie 2102KLE. In der Hals- und Kopfkrebs-Zelllinie CAL27 zeigt sich eine Hochregulierung von EMP1 auf Cisplatin-Behandlung nur in der sensitiveren Zelllinie. Sie gleicht damit den Überschuss an EMP1 im Grundzustand in der resistenteren CAL27res (Faktor 5) an (s. Abb. 38). Eine Korrelation der Induktion von EMP1 auf Cisplatin-Behandlung mit der Sensitivität der Zelllinien gegenüber Cisplatin lässt sich aus den Untersuchungen jedoch nicht herleiten. EMP1 wird offensichtlich gewebespezifisch induziert.

Eine Überexpression des Genes wirkte sich in den beiden Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780cis durch eine Sensitivierung gegenüber Cisplatin etwa um den Faktor zwei aus (s. Abb. 45, Tab. 56, Abb. 46, Tab. 57). Dies konnte auch gegenüber den mit dem Leervektor transfizierten Klonen bestätigt werden und scheint somit kein unspezifischer Transfektions-Nebeneffekt zu sein. Diese Ergebnisse lassen eine

Beteiligung von EMP1 an der Wirkungsvermittlung von Cisplatin vermuten. Zur näheren Betrachtung möglicher Faktoren dieses Sensitivierungseffektes wurde die Expression des Apoptose-regulierenden Proteins p53 und des Zell-Zyklus-regulierenden Proteins p21 in den EMP1-Überexpressionsklonen untersucht. Diese Ergebnisse werden weiter unten diskutiert.

EMP1 interagiert mit einer Reihe von Membranproteinen, u. a. dem EGFR und dem P2X<sub>7</sub>-Rezeptor. Des Weiteren wird aufgrund von großer Strukturhomologie von EMP1 mit  $\gamma$ -Untereinheiten von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen und Claudinen ebenfalls eine Interaktion mit diesen Membranproteinen vermutet [126;145;146]. Wilson et al. [145] konnten zeigen, dass EMP1 mit dem C-Terminus des P2X<sub>7</sub>-Rezeptors interagiert und fanden bei einer Überexpression der EMPs 1-3 und von PMP22 in HEK-293-Zellen jeweils eine gesteigerte Apoptoserate. Sie beobachteten auch jeweils das für eine Aktivierung des P2X<sub>7</sub>-Rezeptors typische Auftreten von Blasenbildungen der Zellmembran [147]. Diese morphologischen Veränderungen und der proapoptotische Effekt wurden bereits in anderen Überexpressionsstudien für die Gene EMP2 und PMP22 beschreiben [148-151].

Diese Beschreibungen eines proapoptotischen Effektes von EMP1 passen zu den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen. Die höhere Sensitivität der A2780-Zellen und der EMP1-überexprimierenden Zellen gegenüber Cisplatin könnte an einer aktiveren Apoptose-Maschinerie, bedingt durch EMP1, im Vergleich zu den A2780cis Zellen liegen.

### **p53/p21 und EMP1**

Das Tumorsuppressor-Gen p53 spielt eine zentrale Rolle in der Vermittlung von Stress-Antworten nach DNA-Schäden, wie sie z. B. durch Cisplatin verursacht werden [152;153]. Es bewirkt u. a. die transkriptionale Aktivierung von Genen, die an der Zellzyklus-Kontrolle, der DNA-Reparatur und der Apoptose beteiligt sind. In vielen Tumoren ist das p53-Gen mutiert, sodass seine Funktion entweder gestört oder sogar komplett unterdrückt ist. Somit ist durch einen gestörten Zellzyklus-Arrest und die Verhinderung der Apoptose ein stark proliferatives Zellwachstum möglich. In

vielen Tumoren, u. a. in Ovarialtumoren, wird über das Vorhandensein von p53-Mutationen berichtet [154;155]. Des Weiteren wird ein Zusammenhang zwischen dem p53-Status eines Tumors und der Cisplatin-Resistenz postuliert. Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Zelllinie A2780 ein Wildtyp-p53 Gen besitzt [131;156-158]. Die Aussagen in der Literatur über den p53-Status der Cisplatin-resistenteren Sub-Zelllinie A2780cis sind nicht einheitlich. Vermutlich liegt es an dem heterogen ausgebildeten Resistenzgrad und der teilweise unterschiedlichen Cisplatin-Vorbehandlung der untersuchten Zelllinienproben. Mehrere Untersuchungen der Zelllinien A2780 und A2780cis fanden den Wildtyp des Genes p53 in beiden Zelllinien vor, berichten aber über einen Funktionsverlust des p53-Genes in der resistenten Zelllinie. So zeigte sich in der A2780cis eine Verminderung des G<sub>1</sub>-Zyklusarrestes nach Bestrahlung im Vergleich zu der parentalen Zelllinie A2780 sowie eine verminderte p21-Transkription und Apoptoseinduktion [156;159;160]. Im Gegensatz dazu fanden Siddik et al. in der Zelllinie A2780cis ein mutiertes p53, welches nach Bestrahlung keinen Funktionsverlust aufwies, aber auf die Behandlung mit Cisplatin keine Induktion zeigte [130]. Lu et. al detektierten die gleiche heterozygote Mutation des p53 in A2780cis wie Siddik et al., fanden aber ebenfalls keine p53-Induktion nach Bestrahlung. Sie zeigten interessanterweise mittels Immunoblot-Technik, dass im Grundzustand in den A2780cis-Zellen eine höhere p53-Proteinkonzentration vorliegt als in den A2780-Zellen [157]. Dies wurde ebenso von Brown et al. beschrieben [156].

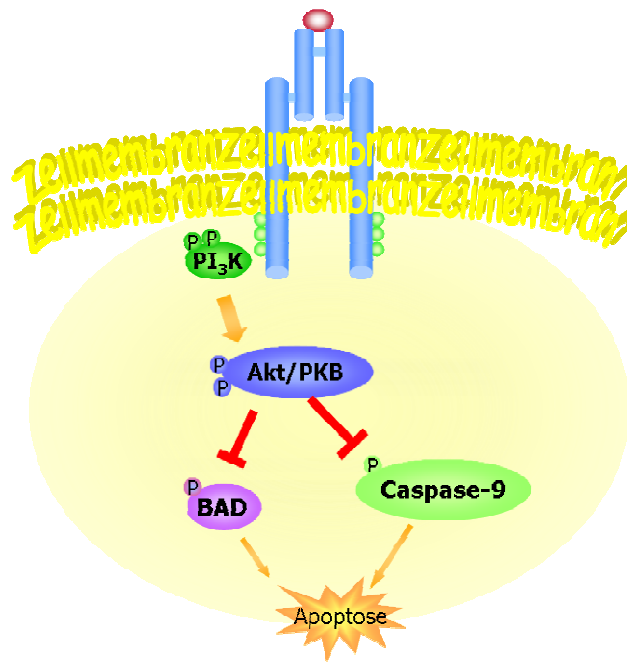
Die Immunoblot-Untersuchungen der Zelllinien in dieser Arbeit zeigten eine deutliche Expression des p53-Proteins in der resistenten A2780cis-Zelllinie. Sie scheint etwas stärker auszufallen als in der A2780-Zelllinie (s. Abb. 47). Interessanterweise besitzen die EMP1-Überexpressionsklone eine deutlich geringere p53-Proteinexpression. Die Betrachtung des von p53 aktivierten p21, welches einen G<sub>1</sub>/S-Zyklusarrest einleitet, könnte den starken Proliferationsunterschied der beiden Ursprungszelllinien erklären. Die langsamer wachsende Zelllinie A2780cis weist eine deutliche p21-Induktion auf (s. Abb. 48). Dieser von p53 eingeleitete, primär antiproliferative Effekt könnte Folge einer p53-Mutation sein und als Konsequenz einen antiapoptotischen Effekt haben. Allerdings ist der p53-Status der hier

verwendeten A2780cis unklar. Ein Zusammenhang der EMP1-Expression mit der Cisplatin-Resistenz wird aus diesen Ergebnissen jedoch nicht ersichtlich.

### **Wachstumsfaktor-Rezeptoren und EMP1**

Die Wachstumsfaktor-Rezeptoren sind in letzter Zeit in den Fokus der Krebsforschung gerückt. Sie fungieren in einer Vielzahl von Tumoren als neue therapeutische Targets. Für das Ovarialkarzinom wird der Einsatz von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren (RTK-Is) derzeit in vielen Studien untersucht [161]. Eine erhöhte Aktivität des durch Wachstumsfaktor-Rezeptoren aktivierten PI<sub>3</sub>K/Akt-Signaltransduktionsweges wird zunehmend für die Chemoresistenz von Tumorzellen verantwortlich gemacht [162;163]. Für die Cisplatin-Resistenz des Ovarialkarzinoms sind solche Phänomene ebenfalls beschrieben [164;165]. Es wurde nun in dieser Arbeit nach einem Zusammenhang zwischen der Expression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren, der EMP1-Expression und der Cisplatin-Sensitivität geschaut. Da die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien A2780 und A2780cis keine EGFR-Expression aufweisen [166;167], wurde der Wachstumsfaktor-Rezeptor IGF1R näher untersucht.

Einige Untersuchungen in Tumorzellen konnten zeigen, dass eine durch Wachstumsfaktoren wie z. B. IGF1 und II hervorgerufene Aktivierung von Akt/PKB und eine nachfolgende Deaktivierung von BAD und Caspase-9 durch Phosphorylierung ein antiapoptotisches Signal verursacht [168-170]. Das ansonsten proapoptotisch wirksame BAD erfährt durch die Phosphorylierung eine Inaktivierung und wird in das Zytoplasma abgesondert. Ebenso verhindert eine Phosphorylierung der Pro-Caspase-9 die Spaltung in die aktive Caspase-9 und der nachfolgende proapoptotische Caspaseweg wird gestört (s. Abb. 50) [171]. Gotlieb et al. berichten über eine Sensitivierung der untersuchten Ovarialkarzinom-Zelllinien OVCAR-3 und -4 gegenüber Cisplatin durch Zugabe eines IGF1R-Kinase-Inhibitors [164].



**Abb. 50: Schematische Darstellung des antiapoptotischen Akt-Signalswegs über den IGF-1R.**

In der Zelllinie A2780cis ist in den Immunoblot-Untersuchungen dieser Arbeit eine deutliche IGF-1R-Proteinexpression zu beobachten. Dies gilt sowohl nach wöchentlicher Cisplatin-Inkubation (1-2  $\mu\text{M}$ ; 4 h) über 2 Monate, als auch nach einer im Anschluß an die Cisplatin-Behandlung erfolgten 2monatigen Cisplatin-freien Phase. Die EMP1-Überexpressionsklone sowie die Ursprungszelllinie A2780 weisen eine deutlich geringere bis keine IGF-1R-Proteinexpression auf (s. Abb. 49). Die Beobachtung, dass die EMP1-Überexpressionsklone und die A2780-Zelllinie weniger IGF-1R exprimieren ist auffällig, und es könnte eventuell einen Zusammenhang zwischen EMP1-Expression, IGF-1R-Expression und Cisplatin-Sensitivität geben. In allen drei Zelllinien ist EMP1 stark exprimiert (s. Abb. 40) und IGF-1R reduziert. Die hohe IGF-1R-Expression in der resistenten A2780cis mit ihrer verminderten EMP1-Expression passt in dieses Bild.

Das fehlende Proliferationssignal durch den Wachstumsfaktor-Rezeptor IGF-1R könnte eine Erklärung für das veränderte Wachstumsverhalten der EMP1-Klone sein. Dennoch bleibt der Widerspruch zu der im Verhältnis schnell wachsenden Ursprungszelllinie A2780, bei der dieser Proliferationssignalweg nicht aktiv ist. Hier muss ein anderes Proliferationssignal vorliegen. Eine Beteiligung des Proto-Onkogenes c-myc wäre denkbar, zumal dieses mehrfach mit einer EMP1-Expression

in Zusammenhang gebracht wurde [127;137;141]. Die sehr starke Proteinexpression von IGF1R in der A2780cis-Zelllinie (s. Abb. 49) spräche eigentlich für eine verstärkte Proliferation. Es wurde in diesen Zellen allerdings auch eine erhöhte Expression des p21-Proteins gefunden (s. Abb. 48), welches der Proliferation entgegenwirkt und somit das im Gegensatz zur A2780-Zelllinie verlangsamte Wachstum erklären könnte.

Die Frage, inwieweit EMP1 in die Akt-Signaltransduktion oder direkt an dem Wachstumsfaktor-Rezeptor angreift, kann jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht beantwortet werden. In der Literatur sind bereits einige Zusammenhänge zwischen EMP1 und verschiedenen Wachstumsfaktor-Rezeptoren beschrieben. Diese Studien liefern eine Vielzahl von Ansatzpunkten und sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Diehl et al. fanden eine Beziehung zwischen EMP1 und einem Mitglied der IGFR-Familie, dem IGFBP-4 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein-4) [134]. Sie verglichen Wildtyp Kolorektalkarzinomzellen mit Zellen, die das IGFBP-4 überexprimieren. Dieses bindet den natürlichen Liganden des Rezeptors und bewirkt somit eine verminderte Rezeptor-Aktivität. Es konnte eine Reduktion der EMP1-Expression auf Proteinebene in den Zellen, die IGFBP-4 überexprimieren und somit eine verringerte IGFR-Stimulation erfahren, festgestellt werden.

Ein Bezug von EMP1 zu EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), einem weiteren Vertreter der Wachstumsrezeptoren, wurde bei der Untersuchung von Resistenzen gegenüber Gefitinib (Iressa<sup>®</sup>) in humanen Prostatakarzinomen und NSCLC-Patientenproben gefunden [126]. Jain et al. postulieren EMP1 als einen molekularen Biomarker für eine primäre oder erworbene Gefitinib-Resistenz. Durch die Interaktion von EMP1 mit EGFR scheint der EGFR-Signalweg trotz Gefitinib-Bindung aktiviert zu sein und das Tumorwachstum gefördert zu werden. EMP1 wird als neues therapeutisches Target und als Marker für eine Gefitinib-Resistenz betrachtet. Untersuchungen zur Identifizierung molekularer Prädiktivmarker für die Wirksamkeit von Dasatinib, einem kürzlich zur Behandlung der CML bei Imatinib-Resistenz zugelassenen Tyrosinkinase-Inhibitor, zeigen einen weiteren Zusammenhang der EMP-Familie mit der Resistenz gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren auf. Huang et al.

[172] identifizierten in einer Microarray-Analyse von 23 Brustkrebs-Zelllinien EMP2 als einen Marker für das Vorhandensein einer Dasatinib-Resistenz.

Ebenfalls einen Zusammenhang zwischen EMP1 und EGFR konnten Ramnarain et al. herstellen [173]. Sie fanden EMP1 in der Untersuchung von Glioblastomzellen, welche einen mutierten, autoaktiven EGF-Rezeptor besitzen, im Gegensatz zu den Wildtypzellen überexprimiert.

Bei Untersuchungen von humanen Brustepitheltumoren wurde eine höhere Expression von EMP1 in Zusammenhang mit einer Überexpression von ERBB2 (auch EGFR2 oder HER2/neu) und c-myc gefunden [107]. Der Rezeptor stellt einen weiteren Vertreter der EGFR-Familie dar. Die ERBB2-Überexpression ist oft verbunden mit stark metastasierenden Tumoren und einer schlechten Prognose beim Mammakarzinom. Trastuzumab (Herceptin®), ein humanisierter Antikörper gegen ERBB2, zeigt in klinischen Studien bei Patienten mit ERBB2-positivem Mammakarzinom einen klinischen Nutzen [174].

Die beschriebenen Interaktionen und Zusammenhänge zwischen EMP1 und einigen Vertretern der Wachstumsfaktor-Rezeptoren stellen interessante Ansatzpunkte für das Verständnis des Eingreifens von EMP1 in die Tumorpheriferation und die RTK-Inhibitoren-Resistenz dar. Die Vielfalt der mit EMP1 in Zusammenhang gebrachten Rezeptoren lässt sich u. a. durch die Heterogenität der untersuchten Tumorarten und Zelllinien erklären. Es ist bekannt, dass in unterschiedlichen Tumoren unterschiedliche Wachstumsfaktor-Rezeptoren verstärkt an der Tumorgenese und/oder der Resistenz gegenüber Zytostatika und neueren Krebstherapeutika beteiligt sind.

In der Literatur wird eine hohe EMP1-Expression mit einer hohen Aktivität einiger Wachstumsfaktor-Rezeptoren korreliert, bzw. die Beteiligung von EMP1 an der RTK-Inhibitoren-Resistenz beschrieben. Im Hinblick auf die Cisplatin-Resistenz wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der EMP1-Expression und den Wachstumsfaktor-Rezeptoren jedoch noch nicht untersucht.



Die Expression von IGF1R geht in dieser Arbeit mit einer verminderten Expression von EMP1 in der Cisplatin-resistenten Sub-Zelllinie A2780cis einher. Des Weiteren wurde eine verstärkte EMP1-Expression mit einer Sensitivierung der Zellen gegenüber Cisplatin in Zusammenhang gebracht. Es bleibt der Zusammenhang zwischen der EMP1-Expression mit den Wachstumsfaktor-Rezeptoren und der Cisplatin-Resistenz in Cisplatin-resistenten und -sensitiven Ovarialtumoren näher zu analysieren.

Zusammenfassend und ausblickend lässt sich sagen, dass eine EMP1-Überexpression in der Literatur mit einer RTK-Inhibitoren-Resistenz in Verbindung gebracht wird [126], andererseits in dieser Arbeit eine Erhöhung der EMP1-Expression zu einer Sensitivierung gegen Cisplatin und in der Zelllinie A2780cis-EMP1 zu einem Verlust der IGF1R-Expression führte. Der Effekt der Sensitivierung durch EMP1-Überexpression passt zu der Tatsache, dass EMP1 in der sensitiven Ursprungszelllinie A2780 gegenüber der resistenteren Sub-Zelllinie A2780cis höher exprimiert vorliegt. Der molekulare Mechanismus, mit der EMP1 an der Sensitivierung gegenüber Cisplatin beteiligt ist, bedarf der weiteren Aufklärung. Ein Ansatzpunkt liefert die von Wilson et al. beobachtete Blasenbildung der Membran von EMP1-überexprimierenden HEK293-Zellen mit einem Apoptose-induzierenden Effekt [145]. Möglicherweise lässt sich über die Untersuchung der Beteiligung von EMP1 an der Cisplatin-Sensitivität die Entstehung einer Cisplatin-Resistenz näher erklären und es böte sich mit der Aufklärung der EMP1-Funktion die Entdeckung neuer therapeutischer Targets an.

Des Weiteren sind Prädiktivmarker für den Erfolg einer Cisplatin-Therapie in Hinblick auf das Auftreten von primären und sekundären Resistenzen wichtig. EMP1 stellt einen möglichen diagnostischen Marker für das Vorhandensein einer Cisplatin-Sensitivität dar. Dieser Ansatz könnte durch Untersuchungen von Patientenproben weiter verfolgt werden. Weiterhin wäre die Untersuchung des Ansprechens auf RTK-Inhibitoren wie z.B. Gefitinib oder Erlotinib in Bezug auf die EMP1-Expression interessant. Schilder et al. [175] untersuchten Cisplatin-resistente Patientenproben auf eine Sensitivität gegenüber Gefitinib. Sie fanden in der kleinen untersuchten Gruppe von 30 Patientinnen eine Ansprechrate von 4 %. Untersuchungen von Dai et al. bezogen sich auf die Sensitivität von Tumorzelllinien gegenüber Erlotinib in

Abhängigkeit von der Resistenz gegenüber verschiedenen Zytostatika [176]. Sie fanden in der Gruppe von sieben stark EGFR-exprimierenden Zelllinien nur drei Zelllinien mit einer erhöhten Erlotinib-Sensitivität. Da EMP1 von Jain et al. [126] als Gefitinib-Resistenzmarker postuliert wird, wäre eine Untersuchung Cisplatin-resistenter **und** EMP1-herunterregulierender Ovarialkarzinom-Zelllinien in Hinblick auf ein Ansprechen auf eine Gefitinib-Behandlung interessant.

Die Untersuchungen von Schilder et al. und Dai et al. zeigen einmal mehr, dass die molekularen Mechanismen in Tumoren einer Gewebeart individuell sehr verschieden sind und verdeutlichen die Notwendigkeit einer personalisierten Therapie. EMP1 stellt also einen interessanten Ansatzpunkt für die Erforschung von Resistenzmarkern für RTK-Inhibitoren und umgekehrt für die Erforschung von Sensitivitätsmarkern für Cisplatin dar und könnte zur Entwicklung einer individualisierten Tumorthherapie des Ovarialkarzinoms beitragen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Cisplatin wird in der Behandlung einer Vielzahl von Tumoren eingesetzt. Es ist u. a. Bestandteil der „First-Line“-Therapie des Ovarialkarzinoms. Leider ist seine Wirksamkeit durch das Auftreten von Resistenzen limitiert. Die Cisplatin-Resistenz ist seit einiger Zeit schon Gegenstand intensiver Forschungen. Es scheint sich um ein multifaktorielles Geschehen zu handeln, dessen einzelne Mechanismen jedoch noch nicht komplett bekannt sind.

In dieser Arbeit wurde die differentielle Genexpression der Cisplatin-sensitiven und –resistenten Ovarialkarzinom-Zelllinien A2780 und A2780cis nach 24stündiger Cisplatin-Inkubation (10  $\mu$ M; 0,5 h Auswaschphase) untersucht. Mit der Methode der Suppressions-Subtraktions-Hybridisierung (SSH) wurden vier differentiell exprimierte Kandidaten-Gene ermittelt. In einer nachfolgenden qRT-PCR konnte die Überexpression von EMP1 (Faktor 41), PI15 (Faktor 370) und DDX21 (Faktor 8) in der Cisplatin-sensitiven Zelllinie A2780 und die Überexpression von HF1 (Faktor 3) in der Cisplatin-resistenten Zelllinie A2780cis bestätigt werden.

Aufgrund der interessanten Zusammenhänge in Hinblick auf Proliferation und Wachstumsfaktor-Rezeptoren wurde das Gen EMP1 (Epitheliales Membranprotein 1) im Folgenden funktionell untersucht. Zunächst wurde das Gen EMP1 in einen Expressionsvektor kloniert. Anschließend konnten EMP1-überexprimierende Klone aus den Zelllinien A2780 und A2780cis etabliert werden (A2780-EMP1 und A2780cis-EMP1). Dies wurde mittels qRT-PCR, Immunoblot-Analyse und ICC auf Genexpressions- und Proteinebene verifiziert. Die EMP1-Klone zeichnen sich durch ein geringeres Zellwachstum innerhalb von 72 h im Vergleich zu ihren jeweiligen parentalen Zelllinien aus. Die beiden EMP1-Klone zeigten in Immunoblot-Analysen eine geringere Expression von p53 und p21 als ihre Ursprungszelllinien A2780 und A2780cis. Außerdem weisen die EMP1-überexprimierenden Zelllinien und die parentale A2780 nur eine sehr geringe bis keine IGF1R-Expression auf Proteinebene auf. Im Gegensatz dazu besitzt die Cisplatin-resistente Zelllinie A2780cis eine starke IGF1R-Expression, sowohl nach Cisplatin Inkubation (über 2 Monate wöchentlich für 4 h 1 – 2  $\mu$ M) als auch nach einer zweimonatigen Cisplatin-freien Phase.

Das interessanteste Ergebnis in dieser Arbeit war die signifikante Steigerung der Sensitivität gegenüber Cisplatin in den EMP1-überexprimierenden Klonen jeweils um den Faktor 2 (MTT-Test/BrdU-Test).

In vorhergehenden Studien wurde die EMP1-Expression mit einer Resistenz gegenüber Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren in Zusammenhang gebracht. Die in dieser Arbeit gefundene Sensitivierung gegenüber Cisplatin durch eine EMP1-Überexpression erscheint zunächst in einem Gegensatz dazu. Weitere Untersuchungen zur der Funktion von EMP1 in den Netzwerken der Cisplatin-Resistenz und der RTK-Inhibitoren-Resistenz können hier Aufklärung leisten. Außerdem kann die Aufklärung des Cisplatin-sensitivierenden Effektes von EMP1 zur Entdeckung neuer therapeutischer Targets führen. Vor allem stellt EMP1 einen interessanten Ansatzpunkt für Studien zur Untersuchung von Prädiktivmarkern für ein Ansprechen auf Cisplatin dar.

## 7 ABSTRACT

### **Differential gene expression in cisplatin-resistant and -sensitive ovarian cancer cell lines and analysis of the function of EMP1**

Ovarian cancer is the most frequent cause of death among the gynaecologic malignancies. The first-line chemotherapeutic treatment of ovarian cancer commonly comprises the use of cisplatin. Unfortunately resistance limits its effectiveness. The phenomenon of cisplatin-resistance is intensively investigated but still not fully understood.

In this study we analysed the cisplatin-sensitive and -resistant ovarian carcinoma cell lines A2780 and A2780cis. Suppressive-subtractive hybridisation (SSH) has been used to examine differential gene expression of the two cell lines after incubation with 10  $\mu$ M cisplatin for 24 h. A set of four candidate genes has finally been confirmed by qRT-PCR to be differentially expressed.

The genes EMP1, PI15 and DDX21 are overexpressed in the cisplatin-sensitive cell line A2780 (factor 4, 370 and 8 respectively) and the gene HF1 is overexpressed in the cisplatin-resistant cell line A2780cis (3-fold).

In the following, we focused on the gene EMP1, which is associated with cell proliferation, apoptosis and growth factor receptors. EMP1 was cloned and transfected into A2780 and A2780cis cells. Recombinant overexpression was confirmed by qRT-PCR, immunoblotting and ICC. Proliferation of EMP1-clones (A2780-EMP1 and A2780cis-EMP1) is lower after 72 h and they show less p53 and p21 protein expression compared to their parental cell lines. The parental cell line A2780 and both EMP1-clones exhibit only very weak IGF1R expression on protein level, whereas the cisplatin-resistant cell line A2780cis shows strong IGF1R expression. Most strikingly, both A2780-EMP1 and A2780cis-EMP1, exhibit a 2-fold sensitisation against cisplatin (MTT-assay/BrdU-assay).

As a conclusion we have identified EMP1 as a differentially expressed gene in the cisplatin-sensitive and -resistant ovarian cancer cell lines A2780 and A2780cis. It has been reported that EMP1 is involved in receptor tyrosin kinase inhibitor-resistance. In this study we show that overexpression of EMP1 in ovarian carcinoma cell lines leads to a 2-fold sensitisation against cisplatin. These results demonstrate that EMP1 is a promising target for further research, particularly with regard to its use as a predictive marker for cisplatin-resistance.

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	ATM-and Rad3-related Protein
BAD	Bcl-2-associated Death Promotor
Bax	Bcl-2-associated X Protein
Bcl-2	B-cell Lymphoma 2
BER	Base Excision Repair
bp	Basenpaare (Base Pair)
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
C	Cytosin
cDDP	Cisplatin
CSPD	Dinatrium-3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chlor)-tricyclo[3.3.1.1.3,7]-decan-4-yl)-phenylphosphat)
CTP	Cytidintriphosphat
CTR1	High-affinity Copper Transporter 1
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Minimum Essential Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E	Effizienz
EGFR	Epidermal Growth Factor receptor
EMP1	Epithelial Membrane Protein 1
ERK	Extracellular signal-regulated Kinase
FAAS	Flammenlose-Atom-Absorptions-Spektroskopie
G	Guanin
GOI	Gene of Interest
GOI <sub>rel</sub>	relative Expression des GOI
GOI <sub>rrE</sub>	reskalierte relative Expression des GOI
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HF1	H-Faktor1

HKG	Housekeeping-Gen
HMG	High-mobility Group
hUBF	Human Upstream binding Factor
IC <sub>50</sub>	Inhibitory Concentration 50 %
ICC	Immuncytochemistry
IGF1R	Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
IGFBP-4	Insulin-like Growth Factor Binding Protein 4
IPTG	Isopropylthio- $\beta$ -D-galactose
JNK	c-jun N-terminale Kinase
KI	Konfidenzintervall
M	Gen-Stabilitätswert
M	Molar
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MDR	Multidrug Resistance P-Glykoprotein
MMR	Mismatch Repair
MOS	Mirror Orientation Selection
MRP	Multidrug Resistance-associated Protein
MTT	3-(4,4-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NER	Nucleotide Excision Repair
NF	Normalisierungsfaktor
NM	Nährmedium
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Protein Kinase B (=Akt)
Q	Quantity
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-PCR
RG	Resistenzgrad
RNA	Ribonucleic Acid
RT	Reverse Transkriptase/Reverse Transkription
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RTKI	Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor
s	Steigung
SD	Standard Diviation
SE	Standard Error
sec	Sekunde
SSH	Suppressions-Subtraktions-Hybridisierung
T	Thymin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
U	Uracil

U	Units
UTP	Uridintriphosphat
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactose
Xiap	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein



## 9 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57-70.
- [2] Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(1):10-30.
- [3] Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland und Robert Koch Institut. Krebs in Deutschland-Häufigkeiten und Trends. 2006.
- [4] Schmalfeldt, B., Burges, A., Diebold, J., Harbeck, N., Nathrath, W., Unich, M., and Wolf, Ch. Manual Maligne Ovarialtumoren; Prognosefaktoren. 2004;30-33.
- [5] Hoskins WJ, McGuire WP, Brady MF, Homesley HD, Creasman WT, Berman M et al. The effect of diameter of largest residual disease on survival after primary cytoreductive surgery in patients with suboptimal residual epithelial ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170(4):974-979.
- [6] Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK, Trimble EL, Montz FJ. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2002; 20(5):1248-1259.
- [7] McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 1996; 334(1):1-6.
- [8] Piccart MJ, Bertelsen K, James K, Cassidy J, Mangioni C, Simonsen E et al. Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(9):699-708.
- [9] Deutsche Krebsgesellschaft. Maligne Ovarialtumoren Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinie. 2004;269-282.
- [10] duBois A, Luck HJ, Meier W, Adams HP, Mobus V, Costa S et al. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(17):1320-1329.
- [11] Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2003; 21(17):3194-3200.
- [12] Kyrgiou M, Salanti G, Pavlidis N, Paraskeva E, Ioannidis JP. Survival benefits with diverse chemotherapy regimens for ovarian cancer: meta-analysis of multiple treatments. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(22):1655-1663.
- [13] Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 19(3):183-232.
- [14] Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Pomatice G, De Placido S et al. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by

- ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2000; 6(5):2053-2063.
- [15] Dai Q, Ling YH, Lia M, Zou YY, Kroog G, Iwata KK et al. Enhanced sensitivity to the HER1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib hydrochloride in chemotherapy-resistant tumor cell lines. *Clin Cancer Res* 2005; 11(4):1572-1578.
- [16] Bookman MA, Darcy KM, Clarke-Pearson D, Boothby RA, Horowitz IR. Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol* 2003; 21(2):283-290.
- [17] Serrano-Olvera A, Duenas-Gonzalez A, Gallardo-Rincon D, Candelaria M, Garza-Salazar J. Prognostic, predictive and therapeutic implications of HER2 in invasive epithelial ovarian cancer. *Cancer Treat Rev* 2006; 32(3):180-190.
- [18] Hu L, Hofmann J, Zaloudek C, Ferrara N, Hamilton T, Jaffe RB. Vascular endothelial growth factor immunoneutralization plus Paclitaxel markedly reduces tumor burden and ascites in athymic mouse model of ovarian cancer. *Am J Pathol* 2002; 161(5):1917-1924.
- [19] Eisen T, Boshoff C, Mak I, Sapunar F, Vaughan MM, Pyle L et al. Continuous low dose Thalidomide: a phase II study in advanced melanoma, renal cell, ovarian and breast cancer. *Br J Cancer* 2000; 82(4):812-817.
- [20] Abramson N, Stokes PK, Luke M, Marks AR, Harris JM. Ovarian and papillary-serous peritoneal carcinoma: pilot study with thalidomide. *J Clin Oncol* 2002; 20(4):1147-1149.
- [21] Ronsenberg B, vanCamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrophoresis products from a platinum electrode. *Nature* 1965; 205:698-699.
- [22] Kelland LR. A new resistance mechanism to cisplatin? *Drug Resist Updat* 2000; 3(3):139-141.
- [23] Eastman A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol Ther* 1987; 34(2):155-166.
- [24] Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev* 1999; 99(9):2467-2498.
- [25] Kelland LR. New platinum antitumor complexes. *Crit Rev Oncol Hematol* 1993; 15(3):191-219.
- [26] Bellon SF, Coleman JH, Lippard SJ. DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry* 1991; 30(32):8026-8035.
- [27] Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22(47):7265-7279.
- [28] Sorenson CM, Eastman A. Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1988; 48(23):6703-6707.

- [29] Treiber DK, Zhai X, Jantzen HM, Essigmann JM. Cisplatin-DNA adducts are molecular decoys for the ribosomal RNA transcription factor hUBF (human upstream binding factor). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(12):5672-5676.
- [30] Zhai X, Beckmann H, Jantzen HM, Essigmann JM. Cisplatin-DNA adducts inhibit ribosomal RNA synthesis by hijacking the transcription factor human upstream binding factor. *Biochemistry* 1998; 37(46):16307-16315.
- [31] Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4(4):307-320.
- [32] Imamura T, Izumi H, Nagatani G, Ise T, Nomoto M, Iwamoto Y et al. Interaction with p53 enhances binding of cisplatin-modified DNA by high mobility group 1 protein. *J Biol Chem* 2001; 276(10):7534-7540.
- [33] Amundson SA, Myers TG, Fornace AJ, Jr. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* 1998; 17(25):3287-3299.
- [34] Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG, Jr., Levrero M et al. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 1999; 399(6738):806-809.
- [35] Chaney SG, Sancar A. DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88(19):1346-1360.
- [36] Zamble DB, Lippard SJ. Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem Sci* 1995; 20(10):435-439.
- [37] Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev* 2003; 103(3):645-662.
- [38] ESMO Recommendations for prophylaxis of chemotherapy-induced nausea and vomiting (NV). *Ann Oncol* 2001; 12(8):1059-1060.
- [39] Kris MG, Hesketh PJ, Herrstedt J, Rittenberg C, Einhorn LH, Grunberg S et al. Consensus proposals for the prevention of acute and delayed vomiting and nausea following high-emetic-risk chemotherapy. *Support Care Cancer* 2005; 13(2):85-96.
- [40] Muggia FM, Los G. Platinum resistance: laboratory findings and clinical implications. *Stem Cells* 1993; 11(3):182-193.
- [41] Jassem J. Chemotherapy of advanced non-small cell lung cancer. *Ann Oncol* 1999; 10 Suppl 6:77-82.
- [42] Kelland LR, Mistry P, Abel G, Freidlos F, Loh SY, Roberts JJ et al. Establishment and characterization of an in vitro model of acquired resistance to cisplatin in a human testicular nonseminomatous germ cell line. *Cancer Res* 1992; 52(7):1710-1716.
- [43] Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer* 1993; 67(6):1171-1176.

- [44] Andrews PA, Velury S, Mann SC, Howell SB. cis-Diamminedichloroplatinum(II) accumulation in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 1988; 48(1):68-73.
- [45] Dornish JM, Pettersen EO. Modulation of cis-dichlorodiammineplatinum(II)-induced cytotoxicity by benzaldehyde derivatives. *Cancer Lett* 1989; 46(1):63-68.
- [46] Lin X, Okuda T, Holzer A, Howell SB. The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol* 2002; 62(5):1154-1159.
- [47] Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(22):14298-14302.
- [48] Katano K, Kondo A, Safaei R, Holzer A, Samimi G, Mishima M et al. Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer Res* 2002; 62(22):6559-6565.
- [49] Nakayama K, Kanzaki A, Ogawa K, Miyazaki K, Neamati N, Takebayashi Y. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP. *Int J Cancer* 2002; 101(5):488-495.
- [50] Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(16):1295-1302.
- [51] Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA et al. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 1997; 57(16):3537-3547.
- [52] Kruh GD, Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 2003; 22(47):7537-7552.
- [53] Wada H, Saikawa Y, Niida Y, Nishimura R, Noguchi T, Matsukawa H et al. Selectively induced high MRP gene expression in multidrug-resistant human HL60 leukemia cells. *Exp Hematol* 1999; 27(1):99-109.
- [54] Kawai K, Kamatani N, Georges E, Ling V. Identification of a membrane glycoprotein overexpressed in murine lymphoma sublines resistant to cis-diamminedichloroplatinum(II). *J Biol Chem* 1990; 265(22):13137-13142.
- [55] Deuchars KL, Ling V. P-glycoprotein and multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Semin Oncol* 1989; 16(2):156-165.
- [56] Gosland M, Lum B, Schimmelpfennig J, Baker J, Doukas M. Insights into mechanisms of cisplatin resistance and potential for its clinical reversal. *Pharmacotherapy* 1996; 16(1):16-39.
- [57] Yamada-Okabe T, Yamada-Okabe H, Kashima Y, Doi R. Effects of oncogenes on the resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) and metallothionein gene expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; 133(2):233-238.

- [58] Kasahara K, Fujiwara Y, Nishio K, Ohmori T, Sugimoto Y, Komiya K et al. Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer Res* 1991; 51(12):3237-3242.
- [59] Andrews PA, Murphy MP, Howell SB. Metallothionein-mediated cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987; 19(2):149-154.
- [60] Kelley SL, Basu A, Teicher BA, Hacker MP, Hamer DH, Lazo JS. Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science* 1988; 241(4874):1813-1815.
- [61] Eastman A, Schulte N. Enhanced DNA repair as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry* 1988; 27(13):4730-4734.
- [62] Scanlon KJ, Kashani-Sabet M, Tone T, Funato T. Cisplatin resistance in human cancers. *Pharmacol Ther* 1991; 52(3):385-406.
- [63] Reed E. Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 1998; 24(5):331-344.
- [64] Dabholkar M, Bostick-Bruton F, Weber C, Bohr VA, Egwuagu C, Reed E. ERCC1 and ERCC2 expression in malignant tissues from ovarian cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84(19):1512-1517.
- [65] Drummond JT, Anthony A, Brown R, Modrich P. Cisplatin and adriamycin resistance are associated with MutL $\alpha$  and mismatch repair deficiency in an ovarian tumor cell line. *J Biol Chem* 1996; 271(33):19645-19648.
- [66] Asselin E, Mills GB, Tsang BK. XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61(5):1862-1868.
- [67] Cho HJ, Kim JK, Kim KD, Yoon HK, Cho MY, Park YP et al. Upregulation of Bcl-2 is associated with cisplatin-resistance via inhibition of Bax translocation in human bladder cancer cells. *Cancer Lett* 2006; 237(1):56-66.
- [68] Gebauer G, Mirakhur B, Nguyen Q, Shore SK, Simpkins H, Dhanasekaran N. Cisplatin-resistance involves the defective processing of MEK1 in human ovarian adenocarcinoma 2008/C13 cells. *Int J Oncol* 2000; 16(2):321-325.
- [69] Gallagher WM, Cairney M, Schott B, Roninson IB, Brown R. Identification of p53 genetic suppressor elements which confer resistance to cisplatin. *Oncogene* 1997; 14(2):185-193.
- [70] Marx D, Meden H, Ziemek T, Lenthe T, Kuhn W, Schauer A. Expression of the p53 tumour suppressor gene as a prognostic marker in platinum-treated patients with ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1998; 34(6):845-850.
- [71] Branch P, Masson M, Aquilina G, Bignami M, Karran P. Spontaneous development of drug resistance: mismatch repair and p53 defects in resistance to cisplatin in human tumor cells. *Oncogene* 2000; 19(28):3138-3145.
- [72] O'Connor PM, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M et al. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute

- anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* 1997; 57(19):4285-4300.
- [73] Lavarino C, Pilotti S, Oggionni M, Gatti L, Perego P, Bresciani G et al. p53 gene status and response to platinum/paclitaxel-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 2000; 18(23):3936-3945.
- [74] Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(5):341-354.
- [75] Hengstler JG, Lange J, Kett A, Dornhofer N, Meinert R, Arand M et al. Contribution of c-erbB-2 and topoisomerase IIalpha to chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res* 1999; 59(13):3206-3214.
- [76] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244(4905):707-712.
- [77] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2):55-63.
- [78] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1):156-159.
- [79] Ausubel FM. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons, 1999.
- [80] Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230(4732):1350-1354.
- [81] Mülhardt C. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 3. Aufl. ed. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2002.
- [82] Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 1996; 24(18):3546-3551.
- [83] Goodman MF, Creighton S, Bloom LB, Petruska J. Biochemical basis of DNA replication fidelity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1993; 28(2):83-126.
- [84] Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 1991; 108(1):1-6.
- [85] *QuantiTect SYBR Green Handbook*. Qiagen: Hilden, 2003.
- [86] Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000; 132:365-386.
- [87] Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, editors. *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*. Springer Press, Heidelberg, 2001: 21-34.

- [88] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3(7).
- [89] Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 1999; 75(2-3):291-295.
- [90] Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 2004; 37(1):112-119.
- [91] Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25(2):169-193.
- [92] geNorm Manual; Version 3.4. 6-9-2004.
- [93] Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(12):6025-6030.
- [94] Gadgil C, Rink A, Hu WS, Beattie C. A Mathematical Model for Suppression Subtractive Hybridization. *Comp Funct Genom* 2002; 3(5):405-422.
- [95] Clontech Laboratories. PCR-Select cDNA Subtraction Kit User Manual. 2000.
- [96] Clontech Laboratories. PCR-Select Differential Screening Kit User Manual. 10-9-2001.
- [97] Rebrikov DV, Britanova OV, Gurskaya NG, Lukyanov KA, Tarabykin VS, Lukyanov SA. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(20):E90.
- [98] Boengler K, Pipp F, Schaper W, Deindl E. Rapid identification of differentially expressed genes by combination of SSH and MOS. *Lab Invest* 2003; 83(5):759-761.
- [99] Diatchenko L, Lukyanov S, Lau YF, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 1999; 303:349-380.
- [100] DIG Application Manual for Filter Hybridisation. 2000.
- [101] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(17):3389-3402.
- [102] Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(2):615-619.
- [103] Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(18):8392-8396.

- [104] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
- [105] Taylor V, Welcher AA, Program AE, Suter U. Epithelial membrane protein-1, peripheral myelin protein 22, and lens membrane protein 20 define a novel gene family. *J Biol Chem* 1995; 270(48):28824-28833.
- [106] Ben Porath I, Benvenisty N. Characterization of a tumor-associated gene, a member of a novel family of genes encoding membrane glycoproteins. *Gene* 1996; 183(1-2):69-75.
- [107] Mackay A, Jones C, Dexter T, Silva RL, Bulmer K, Jones A et al. cDNA microarray analysis of genes associated with ERBB2 (HER2/neu) overexpression in human mammary luminal epithelial cells. *Oncogene* 2003; 22(17):2680-2688.
- [108] Pio R, Martinez A, Unsworth EJ, Kowalak JA, Bengoechea JA, Zipfel PF et al. Complement factor H is a serum-binding protein for adrenomedullin, and the resulting complex modulates the bioactivities of both partners. *J Biol Chem* 2001; 276(15):12292-12300.
- [109] Pio R, Elsasser TH, Martinez A, Cuttitta F. Identification, characterization, and physiological actions of factor H as an adrenomedullin binding protein present in human plasma. *Microsc Res Tech* 2002; 57(1):23-27.
- [110] Yamakawa T, Miyata S, Ogawa N, Koshikawa N, Yasumitsu H, Kanamori T et al. cDNA cloning of a novel trypsin inhibitor with similarity to pathogenesis-related proteins, and its frequent expression in human brain cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1395(2):202-208.
- [111] Fuller-Pace FV. DEXD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(15):4206-4215.
- [112] Westermarck J, Weiss C, Saffrich R, Kast J, Musti AM, Wessely M et al. The DEXD/H-box RNA helicase RHII/Gu is a co-factor for c-Jun-activated transcription. *EMBO J* 2002; 21(3):451-460.
- [113] Valdez BC, Henning D, Busch RK, Woods K, Flores-Rozas H, Hurwitz J et al. A nucleolar RNA helicase recognized by autoimmune antibodies from a patient with watermelon stomach disease. *Nucleic Acids Res* 1996; 24(7):1220-1224.
- [114] Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 2004; 37(1):112-119.
- [115] Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem* 2001; 295(1):17-21.
- [116] Fijen CA, Kuijper EJ, Te BM, van de Heuvel MM, Holdrinet AC, Sim RB et al. Heterozygous and homozygous factor H deficiency states in a Dutch family. *Clin Exp Immunol* 1996; 105(3):511-516.



- [117] Ying L, Katz Y, Schlesinger M, Carmi R, Shalev H, Haider N et al. Complement factor H gene mutation associated with autosomal recessive atypical hemolytic uremic syndrome. *Am J Hum Genet* 1999; 65(6):1538-1546.
- [118] Jozsi M, Manuelian T, Heinen S, Oppermann M, Zipfel PF. Attachment of the soluble complement regulator factor H to cell and tissue surfaces: relevance for pathology. *Histol Histopathol* 2004; 19(1):251-258.
- [119] Cuttitta F, Pio R, Garayoa M, Zudaire E, Julian M, Elsasser TH et al. Adrenomedullin functions as an important tumor survival factor in human carcinogenesis. *Microsc Res Tech* 2002; 57(2):110-119.
- [120] Nikitenko LL, Fox SB, Kehoe S, Rees MC, Bicknell R. Adrenomedullin and tumour angiogenesis. *Br J Cancer* 2006; 94(1):1-7.
- [121] Martinez A. A new family of angiogenic factors. *Cancer Lett* 2006; 236(2):157-163.
- [122] Koshikawa N, Nakamura T, Tsuchiya N, Isaji M, Yasumitsu H, Umeda M et al. Purification and identification of a novel and four known serine proteinase inhibitors secreted by human glioblastoma cells. *J Biochem (Tokyo)* 1996; 119(2):334-339.
- [123] Sanchez-Perez I, Murguia JR, Perona R. Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene* 1998; 16(4):533-540.
- [124] Zanke BW, Boudreau K, Rubie E, Winnett E, Tibbles LA, Zon L et al. The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cisplatin, UV irradiation or heat. *Curr Biol* 1996; 6(5):606-613.
- [125] Mansouri A, Ridgway LD, Korapati AL, Zhang Q, Tian L, Wang Y et al. Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2003; 278(21):19245-19256.
- [126] Jain A, Tindell CA, Laux I, Hunter JB, Curran J, Galkin A et al. Epithelial membrane protein-1 is a biomarker of gefitinib resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(33):11858-11863.
- [127] Ben Porath I, Yanuka O, Benvenisty N. The tmp gene, encoding a membrane protein, is a c-Myc target with a tumorigenic activity. *Mol Cell Biol* 1999; 19(5):3529-3539.
- [128] Hamilton TC, Young RC, Ozols RF. Experimental model systems of ovarian cancer: applications to the design and evaluation of new treatment approaches. *Semin Oncol* 1984; 11(3):285-298.
- [129] Behrens BC, Hamilton TC, Masuda H, Grotzinger KR, Whang-Peng J, Louie KG et al. Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Res* 1987; 47(2):414-418.
- [130] Siddik ZH, Mims B, Lozano G, Thai G. Independent pathways of p53 induction by cisplatin and X-rays in a cisplatin-resistant ovarian tumor cell line. *Cancer Res* 1998; 58(4):698-703.

- [131] Caserini C, Pratesi G, Tortoreto M, Bedogne B, Carenini N, Supino R et al. Apoptosis as a determinant of tumor sensitivity to topotecan in human ovarian tumors: preclinical in vitro/in vivo studies. *Clin Cancer Res* 1997; 3(6):955-961.
- [132] Zisowsky J, Koegel S, Leyers S, Devarakonda K, Kassack MU, Osmak M et al. Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. *Biochem Pharmacol* 2007; 73(2):298-307.
- [133] Feng HC, Tsao SW, Ngan HY, Xue WC, Chiu PM, Cheung AN. Differential expression of insulin-like growth factor binding protein 1 and ferritin light polypeptide in gestational trophoblastic neoplasia: combined cDNA suppression subtractive hybridization and microarray study. *Cancer* 2005; 104(11):2409-2416.
- [134] Diehl D, Lahm H, Wolf E, Bauersachs S. Transcriptome analysis of a human colorectal cancer cell line shows molecular targets of insulin-like growth factor-binding protein-4 overexpression. *Int J Cancer* 2005; 113(4):588-599.
- [135] Liu Y, Sun W, Zhang K, Zheng H, Ma Y, Lin D et al. Identification of genes differentially expressed in human primary lung squamous cell carcinoma. *Lung Cancer* 2007.
- [136] Chen Y, Medvedev A, Ruzanov P, Marvin KW, Jetten AM. cDNA cloning, genomic structure, and chromosome mapping of the human epithelial membrane protein CL-20 gene (EMP1), a member of the PMP22 family. *Genomics* 1997; 41(1):40-48.
- [137] Benvenisty N, Leder A, Kuo A, Leder P. An embryonically expressed gene is a target for c-Myc regulation via the c-Myc-binding sequence. *Genes Dev* 1992; 6(12B):2513-2523.
- [138] Jetten AM, Suter U. The peripheral myelin protein 22 and epithelial membrane protein family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2000; 64:97-129.
- [139] Marvin KW, Fujimoto W, Jetten AM. Identification and characterization of a novel squamous cell-associated gene related to PMP22. *J Biol Chem* 1995; 270(48):28910-28916.
- [140] Zhang J, Gao FL, Zhi HY, Luo AP, Ding F, Wu M et al. Expression patterns of esophageal cancer deregulated genes in C57BL/6J mouse embryogenesis. *World J Gastroenterol* 2004; 10(8):1088-1092.
- [141] Bredel M, Bredel C, Juric D, Harsh GR, Vogel H, Recht LD et al. Functional network analysis reveals extended gliomagenesis pathway maps and three novel MYC-interacting genes in human gliomas. *Cancer Res* 2005; 65(19):8679-8689.
- [142] Ruegg CL, Wu HY, Fagnoni FF, Engleman EG, Laus R. B4B, a novel growth-arrest gene, is expressed by a subset of progenitor/pre-B lymphocytes negative for cytoplasmic mu-chain. *J Immunol* 1996; 157(1):72-80.
- [143] Hippo Y, Yashiro M, Ishii M, Taniguchi H, Tsutsumi S, Hirakawa K et al. Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with high metastatic potential to peritoneum or lymph nodes. *Cancer Res* 2001; 61(3):889-895.
- [144] Wang HT, Kong JP, Ding F, Wang XQ, Wang MR, Liu LX et al. Analysis of gene expression profile induced by EMP-1 in esophageal cancer cells using cDNA Microarray. *World J Gastroenterol* 2003; 9(3):392-398.

- [145] Wilson HL, Wilson SA, Surprenant A, North RA. Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the P2X7 receptor C terminus. *J Biol Chem* 2002; 277(37):34017-34023.
- [146] Van Itallie CM, Anderson JM. The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology (Bethesda)* 2004; 19:331-338.
- [147] Virginio C, MacKenzie A, North RA, Surprenant A. Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *J Physiol* 1999; 519 Pt 2:335-346.
- [148] Fabbretti E, Edomi P, Brancolini C, Schneider C. Apoptotic phenotype induced by overexpression of wild-type gas3/PMP22: its relation to the demyelinating peripheral neuropathy CMT1A. *Genes Dev* 1995; 9(15):1846-1856.
- [149] Zoidl G, D'Urso D, Blass-Kampmann S, Schmalenbach C, Kuhn R, Muller HW. Influence of elevated expression of rat wild-type PMP22 and its mutant PMP22Trembler on cell growth of NIH3T3 fibroblasts. *Cell Tissue Res* 1997; 287(3):459-470.
- [150] Brancolini C, Marzinotto S, Edomi P, Agostoni E, Fiorentini C, Muller HW et al. Rho-dependent regulation of cell spreading by the tetraspan membrane protein Gas3/PMP22. *Mol Biol Cell* 1999; 10(7):2441-2459.
- [151] Wang CX, Wadehra M, Fisk BC, Goodglick L, Braun J. Epithelial membrane protein 2, a 4-transmembrane protein that suppresses B-cell lymphoma tumorigenicity. *Blood* 2001; 97(12):3890-3895.
- [152] Nelson WG, Kastan MB. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol* 1994; 14(3):1815-1823.
- [153] Oren M. Relationship of p53 to the control of apoptotic cell death. *Semin Cancer Biol* 1994; 5(3):221-227.
- [154] Zheng J, Benedict WF, Xu HJ, Hu SX, Kim TM, Velicescu M et al. Genetic disparity between morphologically benign cysts contiguous to ovarian carcinomas and solitary cystadenomas. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(15):1146-1153.
- [155] Yaginuma Y, Westphal H. Abnormal structure and expression of the p53 gene in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1992; 52(15):4196-4199.
- [156] Brown R, Clugston C, Burns P, Edlin A, Vasey P, Vojtesek B et al. Increased accumulation of p53 protein in cisplatin-resistant ovarian cell lines. *Int J Cancer* 1993; 55(4):678-684.
- [157] Lu X, Errington J, Curtin NJ, Lunec J, Newell DR. The impact of p53 status on cellular sensitivity to antifolate drugs. *Clin Cancer Res* 2001; 7(7):2114-2123.
- [158] Li J, Wood WH, III, Becker KG, Weeraratna AT, Morin PJ. Gene expression response to cisplatin treatment in drug-sensitive and drug-resistant ovarian cancer cells. *Oncogene* 2006.

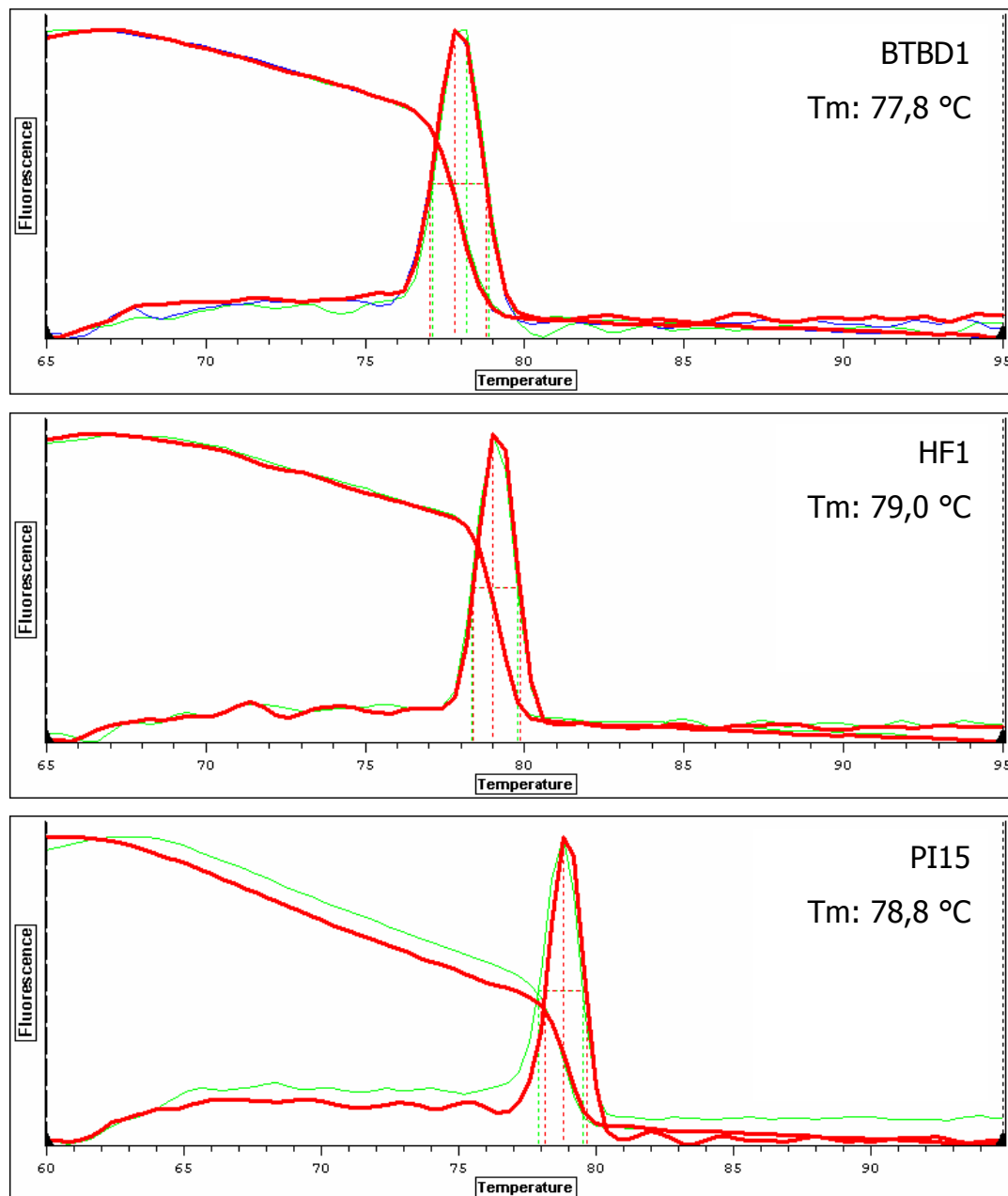
- [159] Anthoney DA, McIlwrath AJ, Gallagher WM, Edlin AR, Brown R. Microsatellite instability, apoptosis, and loss of p53 function in drug-resistant tumor cells. *Cancer Res* 1996; 56(6):1374-1381.
- [160] Jones NA, Turner J, McIlwrath AJ, Brown R, Dive C. Cisplatin- and paclitaxel-induced apoptosis of ovarian carcinoma cells and the relationship between bax and bak up-regulation and the functional status of p53. *Mol Pharmacol* 1998; 53(5):819-826.
- [161] Blank SV, Chang R, Muggia F. Epidermal growth factor receptor inhibitors for the treatment of epithelial ovarian cancer. *Oncology (Williston Park)* 2005; 19(4):553-559.
- [162] Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 2004; 30(2):193-204.
- [163] Tang HJ, Jin X, Wang S, Yang D, Cao Y, Chen J et al. A small molecule compound inhibits AKT pathway in ovarian cancer cell lines. *Gynecol Oncol* 2006; 100(2):308-317.
- [164] Gotlieb WH, Bruchim I, Gu J, Shi Y, Camirand A, Blouin MJ et al. Insulin-like growth factor receptor I targeting in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006; 100(2):389-396.
- [165] Dai Q, Ling YH, Lia M, Zou YY, Kroog G, Iwata KK et al. Enhanced sensitivity to the HER1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib hydrochloride in chemotherapy-resistant tumor cell lines. *Clin Cancer Res* 2005; 11(4):1572-1578.
- [166] Dai Q, Ling YH, Lia M, Zou YY, Kroog G, Iwata KK et al. Enhanced sensitivity to the HER1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib hydrochloride in chemotherapy-resistant tumor cell lines. *Clin Cancer Res* 2005; 11(4):1572-1578.
- [167] Sewell JM, Macleod KG, Ritchie A, Smyth JF, Langdon SP. Targeting the EGF receptor in ovarian cancer with the tyrosine kinase inhibitor ZD 1839 ("Iressa"). *Br J Cancer* 2002; 86(3):456-462.
- [168] Liu AX, Testa JR, Hamilton TC, Jove R, Nicosia SV, Cheng JQ. AKT2, a member of the protein kinase B family, is activated by growth factors, v-Ha-ras, and v-src through phosphatidylinositol 3-kinase in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58(14):2973-2977.
- [169] Yuan ZQ, Sun M, Feldman RI, Wang G, Ma X, Jiang C et al. Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene* 2000; 19(19):2324-2330.
- [170] Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91(2):231-241.
- [171] Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005; 9(1):59-71.

- [172] Huang F, Reeves K, Han X, Fairchild C, Platero S, Wong TW et al. Identification of candidate molecular markers predicting sensitivity in solid tumors to dasatinib: rationale for patient selection. *Cancer Res* 2007; 67(5):2226-2238.
- [173] Ramnarain DB, Park S, Lee DY, Hatanpaa KJ, Scoggin SO, Otu H et al. Differential gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells. *Cancer Res* 2006; 66(2):867-874.
- [174] Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, Esteva FJ. Adjuvant therapy with trastuzumab for HER-2/neu-positive breast cancer. *Oncologist* 2006; 11(8):857-867.
- [175] Schilder RJ, Sill MW, Chen X, Darcy KM, Decesare SL, Lewandowski G et al. Phase II study of gefitinib in patients with relapsed or persistent ovarian or primary peritoneal carcinoma and evaluation of epidermal growth factor receptor mutations and immunohistochemical expression: a Gynecologic Oncology Group Study. *Clin Cancer Res* 2005; 11(15):5539-5548.
- [176] Dai Q, Ling YH, Lia M, Zou YY, Kroog G, Iwata KK et al. Enhanced sensitivity to the HER1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib hydrochloride in chemotherapy-resistant tumor cell lines. *Clin Cancer Res* 2005; 11(4):1572-1578.

## 10 ANHANG

### 10.1 Schmelzpunktanalyse zur Kontrolle der Primer

#### 10.1.1 Primer der SSH Kandidaten-Gene



Fortsetzung Abb. 51

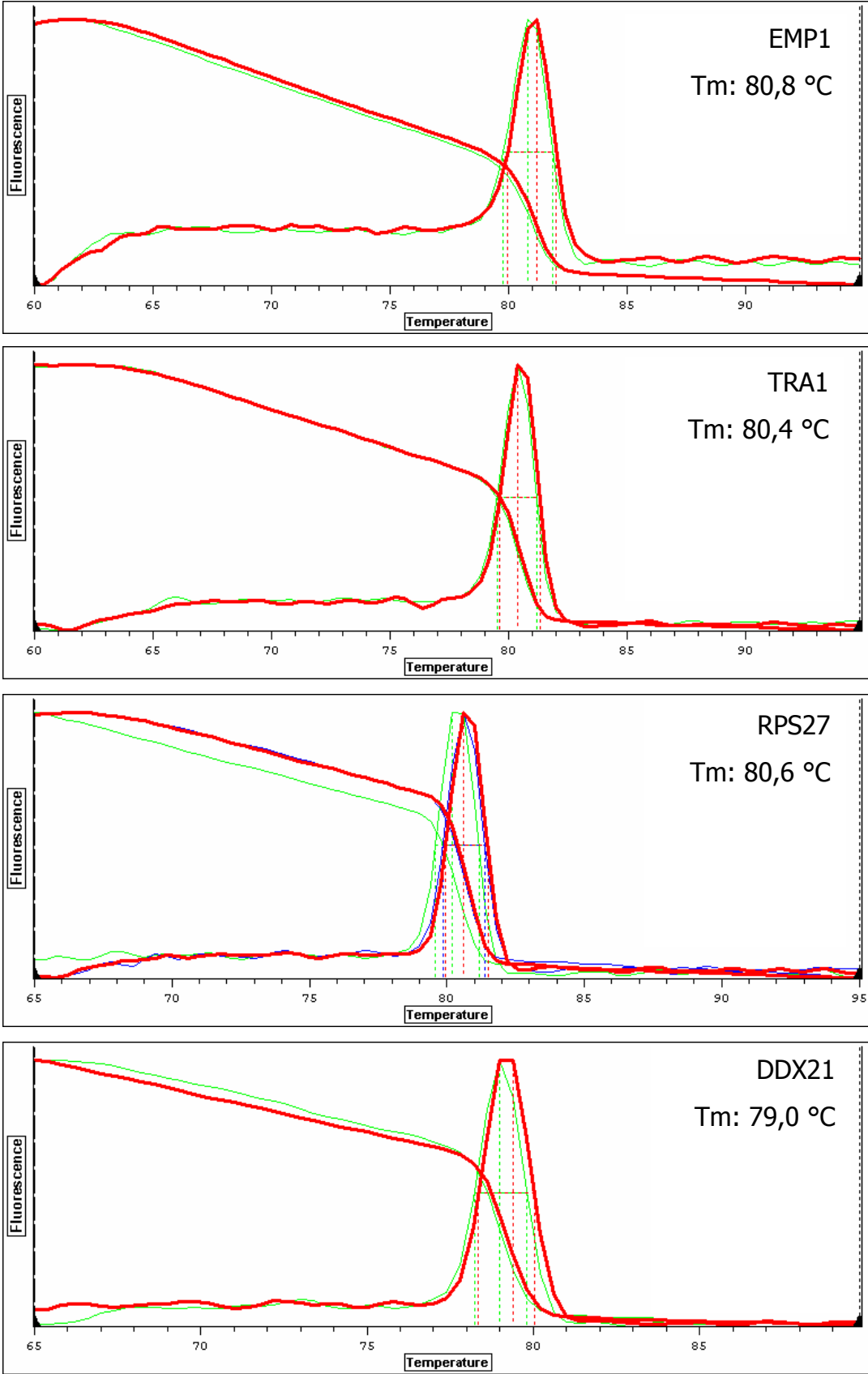
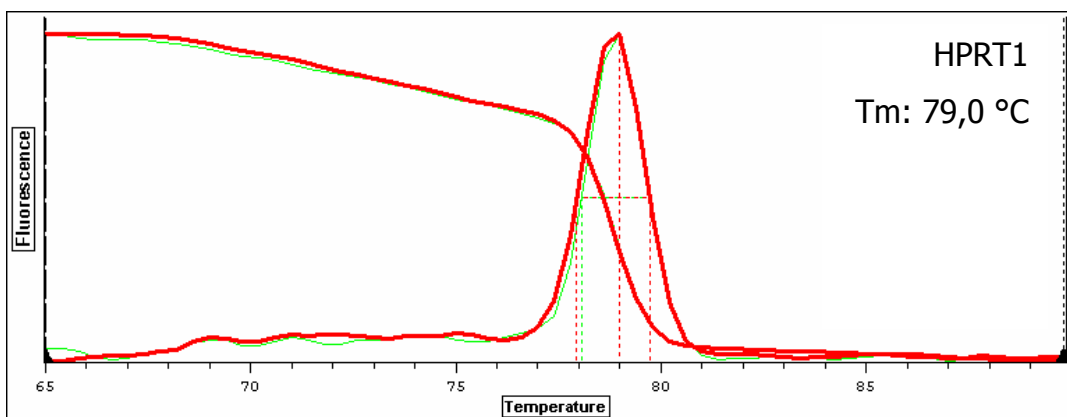
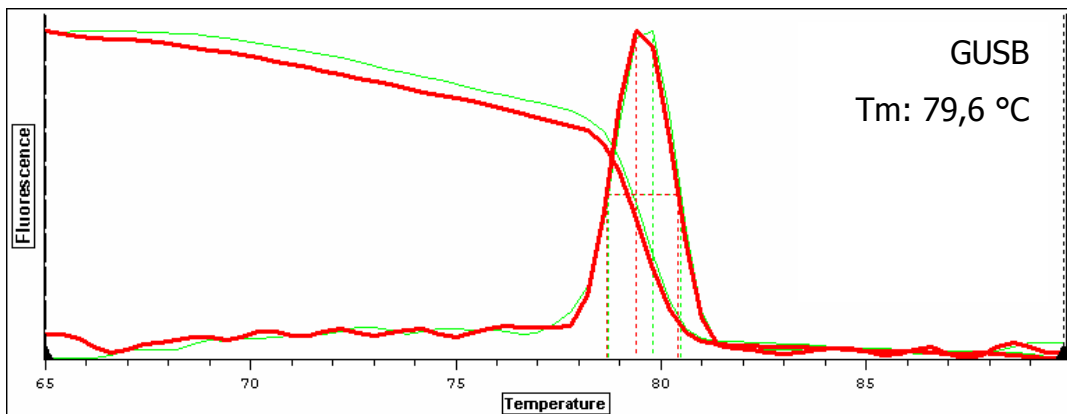
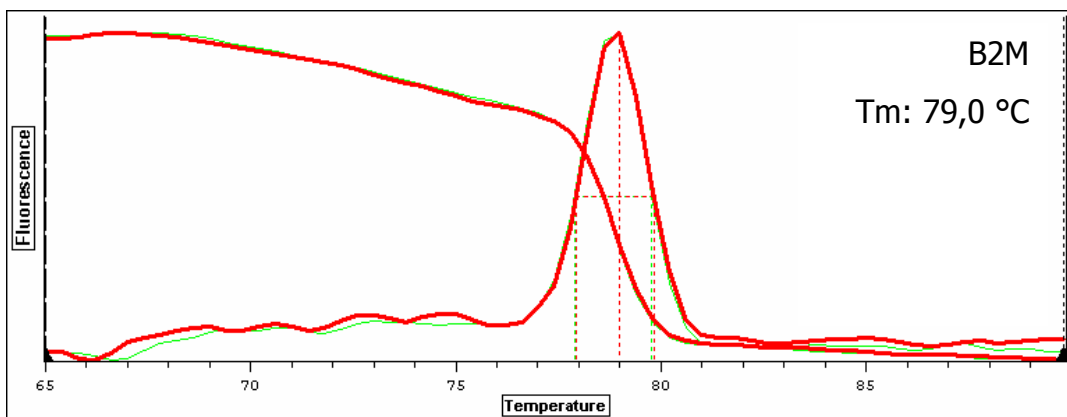
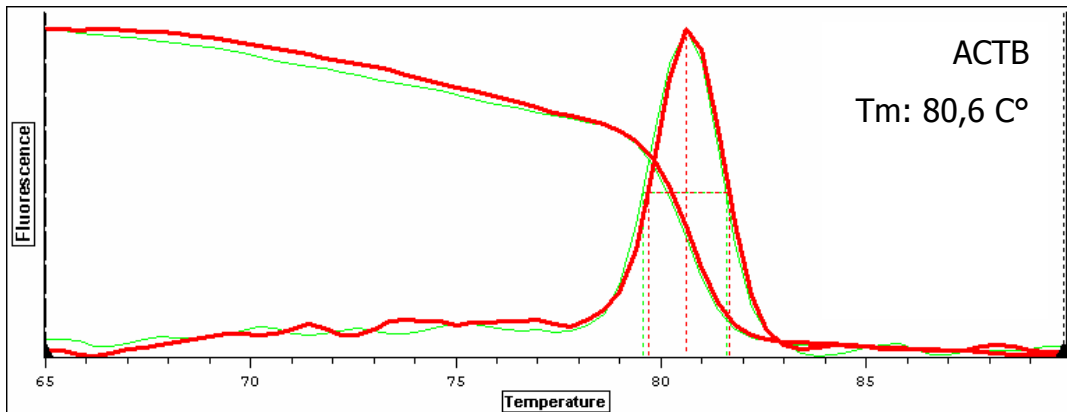


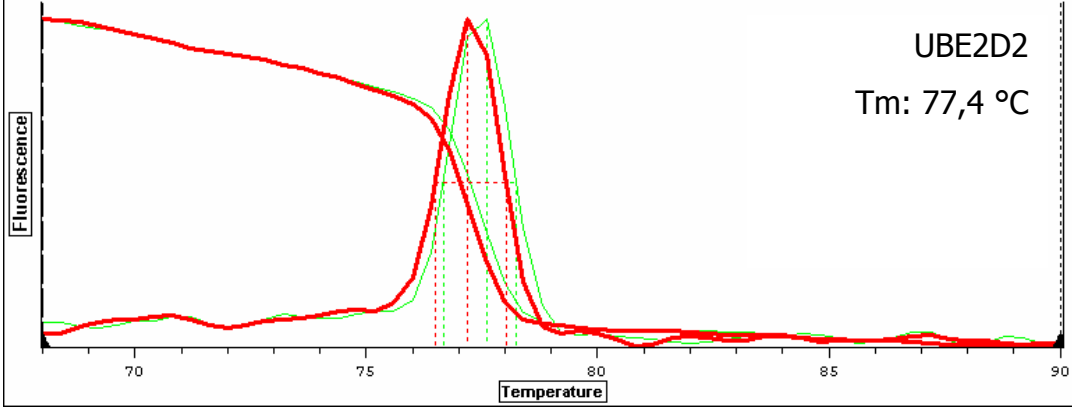
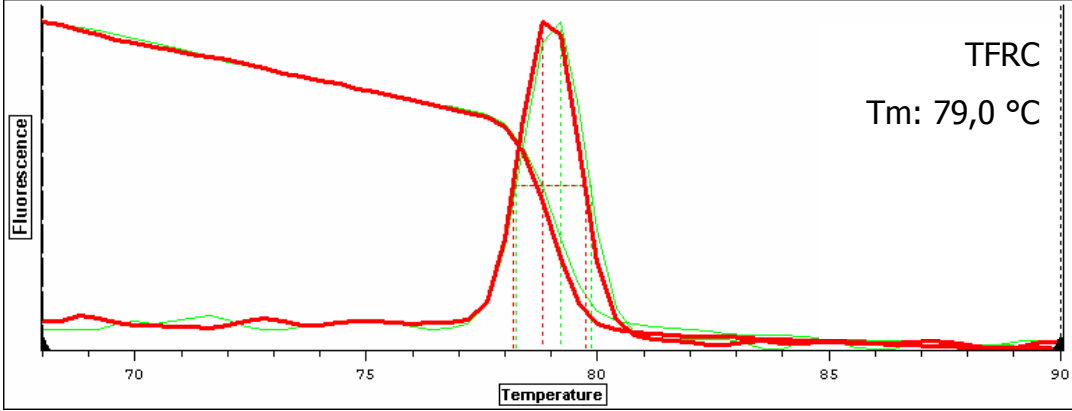
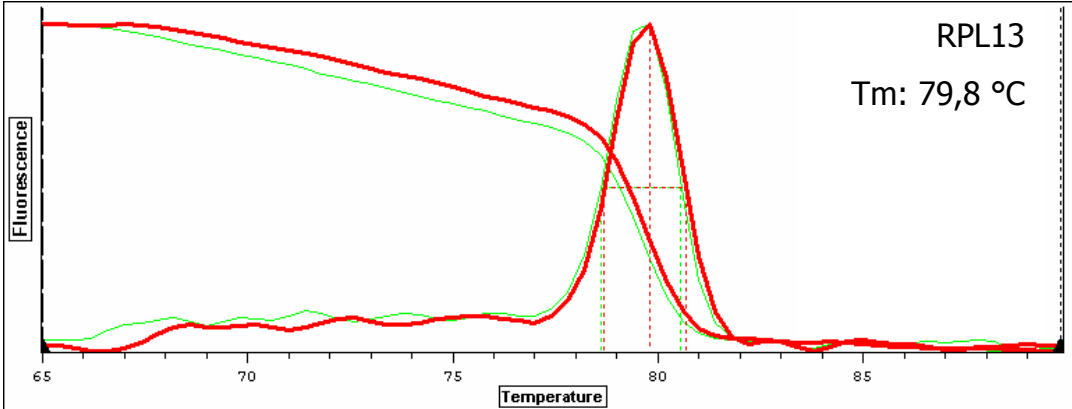
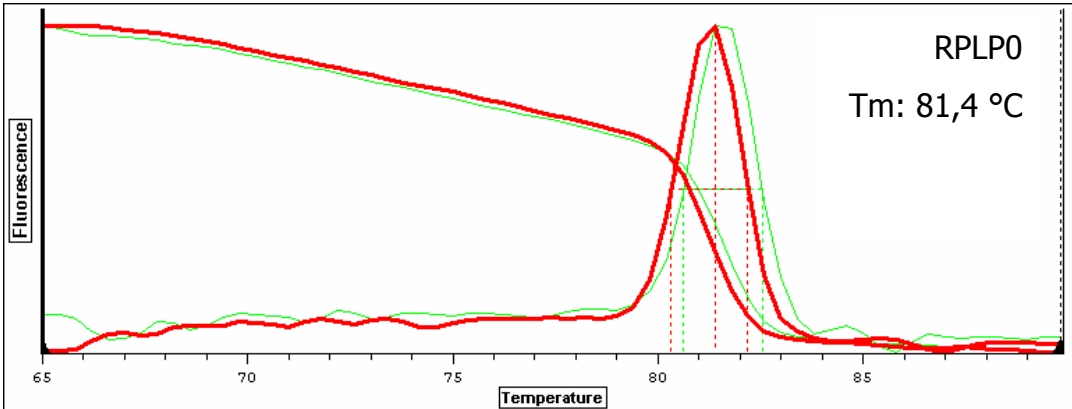
Abb. 51: Schmelzpunktkurven und Schmelzpunkte der PCR-Produkte der SSH Kandidatengene.

### 10.1.2 Primer der Housekeeping-Gene

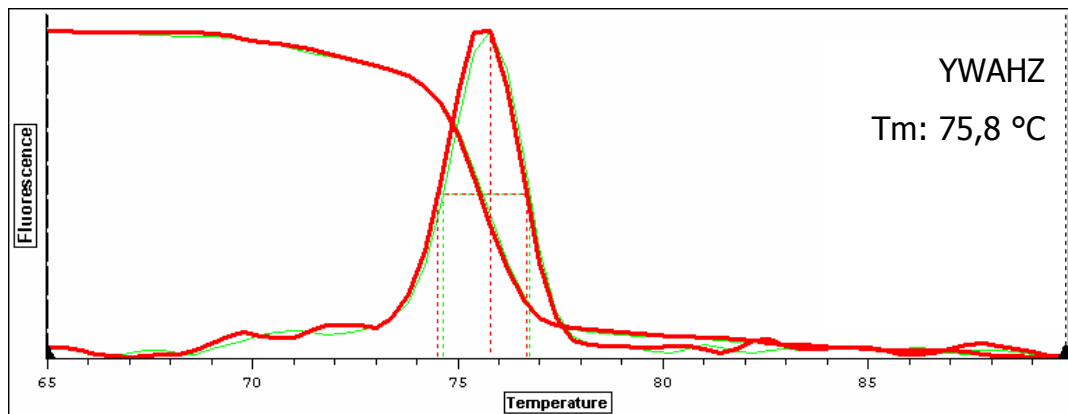




Fortsetzung Abb. 52



Fortsetzung Abb. 52



**Abb. 52: Schmelzpunktkurven und Schmelzpunkte der PCR-Produkte der Housekeeping-Gene.**

## 10.2 PCR-Effizienz der SSH Kandidaten-Gene und der HKG

**Tab. 59: Daten der PCR-Effizienzbestimmung für die SSH Kandidaten-Gene und RPL13 als HKG. S ± SD = Steigung der Regressionsgeraden ± Standardabweichung, 95 % KI = 95 % Konfidenzintervall, E = Effizienz der PCR-Reaktion, r<sup>2</sup> = Güte der Anpassung der Regressionsgeraden.**

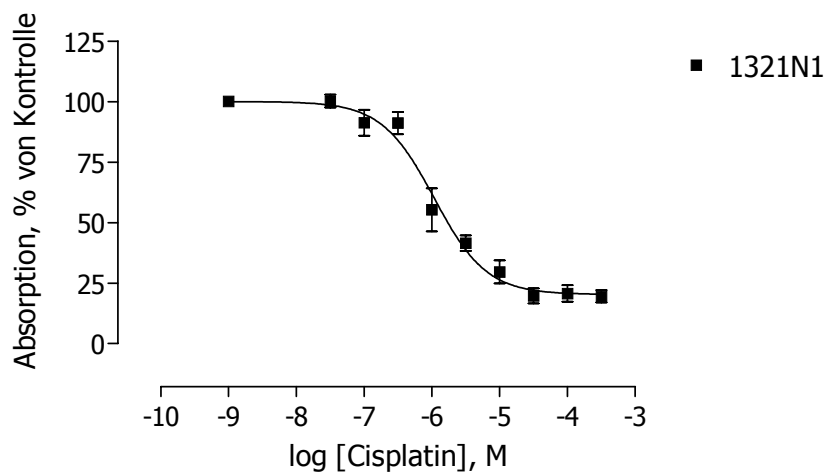
Gen	S ± SD	95 % KI S	95 % KI E	r <sup>2</sup>
BTBD1	-3,8 ± 0,2	-4,2 – -3,4	1,7 – 2,0	0,989
HF1	-3,3 ± 0,1	-3,6 – -3,1	1,9 – 2,1	0,999
PI15	-3,4 ± 0,1	-3,7 – -3,1	1,9 – 2,1	0,999
EMP1	-3,3 ± 0,1	-3,6 – -3,1	1,9 – 2,1	0,995
TRA1	-3,2 ± 0,1	-3,5 – -3,0	1,9 – 2,2	0,994
RPS27	-3,6 ± 0,1	-3,8 – -3,4	1,8 – 2,0	0,998
DDX21	-3,5 ± 0,1	-3,6 – -3,3	1,9 – 2,0	0,998
RPL13	-3,5 ± 0,1	-3,7 – -3,4	1,9 – 2,0	0,997

**Tab. 60: Daten der PCR-Effizienz-Bestimmung für die Housekeeping-Gene. S: Steigung der Kalibriergeraden, KI: Konfidenzintervall, E: Effizienz der PCR-Reaktion, r<sup>2</sup>: Güte der Anpassung der Kalibriergeraden.**

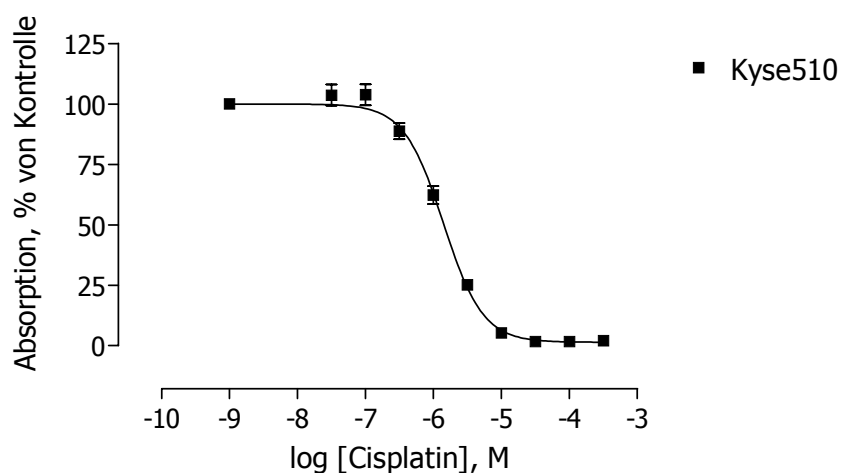
Gen	S ± SD	95 % KI S	95 % KI E	r <sup>2</sup>
ACTB	-3,4 ± 0,2	-3,8 bis -3,0	1,8 bis 2,1	0,987
B2M	-3,4 ± 0,1	-3,7 bis -3,2	1,9 bis 2,1	0,994
GUSB	-3,3 ± 0,2	-3,7 bis -2,9	1,9 bis 2,2	0,989
HPRT1	-3,5 ± 0,1	-3,8 bis -3,1	1,8 bis 2,1	0,994
RPL13	-3,0 ± 0,2	-3,4 bis -2,6	2,0 bis 2,4	0,983
RPLP0	-3,5 ± 0,2	-3,8 bis -3,1	1,8 bis 2,1	0,987
TFRC	3,5 ± 0,1	-3,8 bis -3,1	1,8 bis 2,1	0,991
UBE2D2	-3,7 ± 0,2	-4,3 bis -3,1	1,7 bis 2,1	0,981
YWHAZ	-3,4 ± 0,2	-3,8 bis -3,0	1,8 bis 2,2	0,985

## 10.3 Differentielle Genexpression der SSH Kandidaten-Gene in 18 humanen Zelllinien

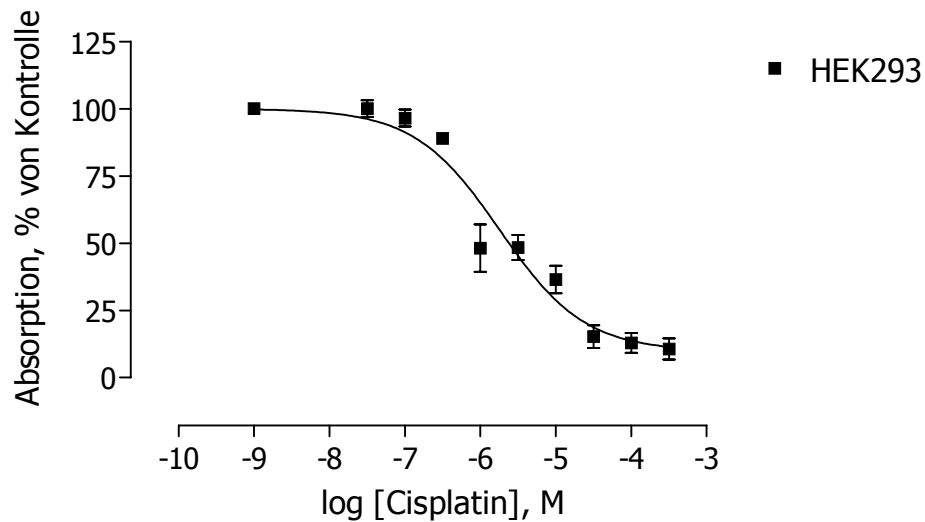
### 10.3.1 Konzentrations-Wirkungskurven der 18 Tumorzelllinien ermittelt mittels MTT-Test



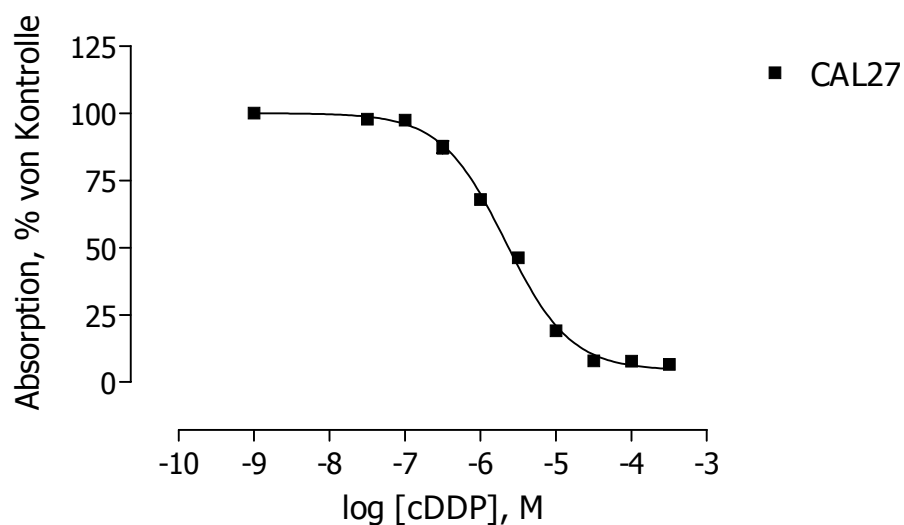
**Abb. 53:** Mittels MTT-Test ermittelte und auf 100 % der Kontrolle normalisierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinie 1321N1. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus drei Experimenten mit jeweils Triplikaten. Die unbehandelten Kontrollwerte sind als Konzentration  $10^{-9}$  angegeben.



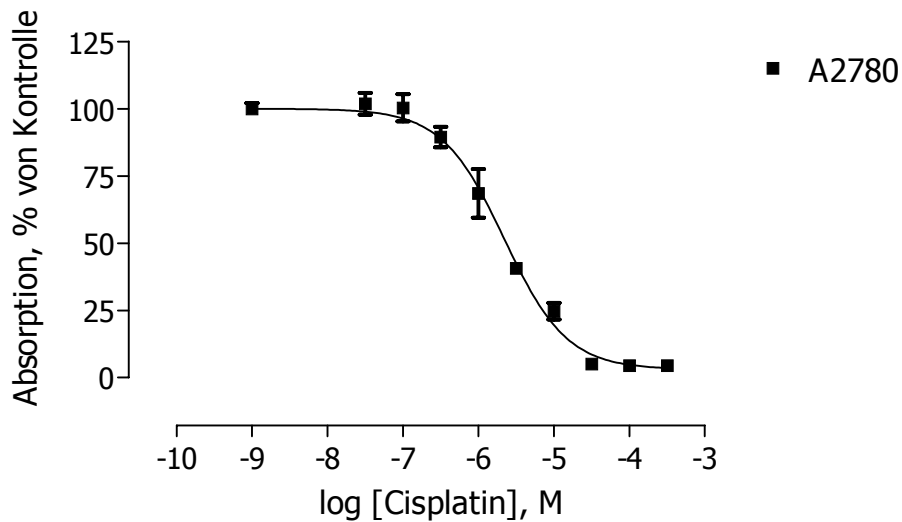
**Abb. 54:** Mittels MTT-Test ermittelte und auf 100 % der Kontrolle normalisierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinie Kyse510. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus drei Experimenten mit jeweils Triplikaten. Die unbehandelten Kontrollwerte sind als Konzentration  $10^{-9}$  angegeben.



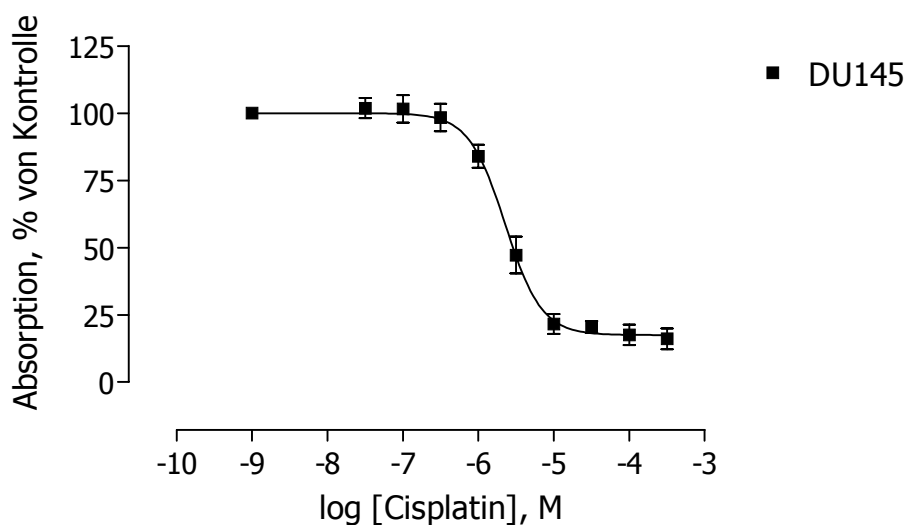
**Abb. 55:** Mittels MTT-Test ermittelte und auf 100 % der Kontrolle normalisierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinie HEK293. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus drei Experimenten mit jeweils Triplikaten. Die unbehandelten Kontrollwerte sind als Konzentration  $10^{-9}$  angegeben.



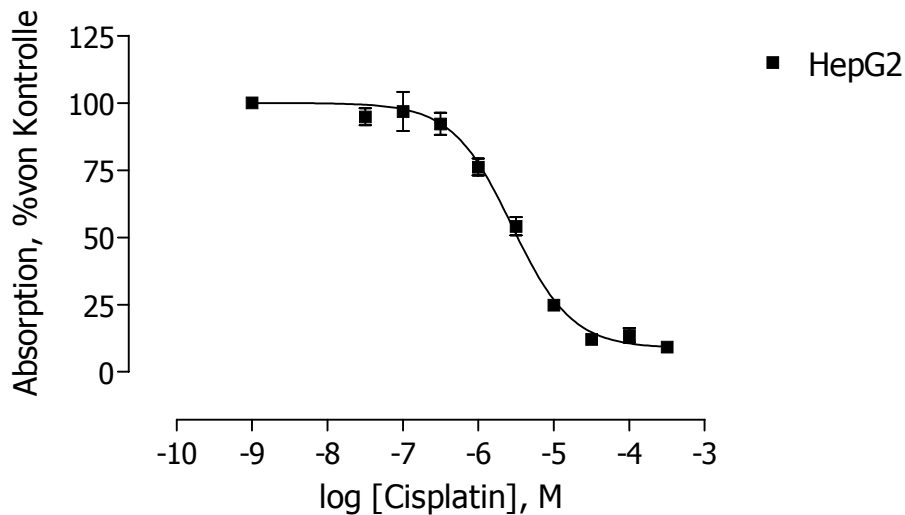
**Abb. 56:** Mittels MTT-Test ermittelte und auf 100 % der Kontrolle normalisierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinie CAL27. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus drei Experimenten mit jeweils Triplikaten. Die unbehandelten Kontrollwerte sind als Konzentration  $10^{-9}$  angegeben.



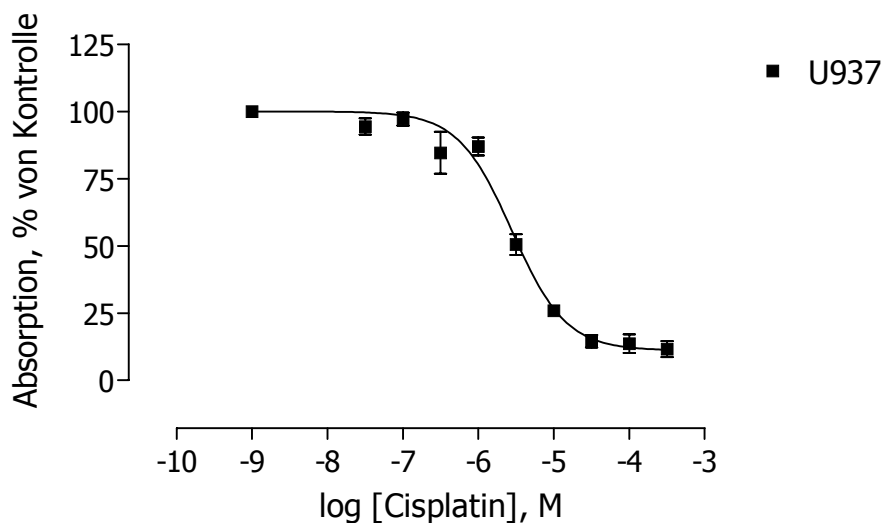
**Abb. 57:** Mittels MTT-Test ermittelte und auf 100 % der Kontrolle normalisierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinie A2780. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus fünf Experimenten mit jeweils Triplikaten. Die unbehandelten Kontrollwerte sind als Konzentration  $10^{-9}$  angegeben.



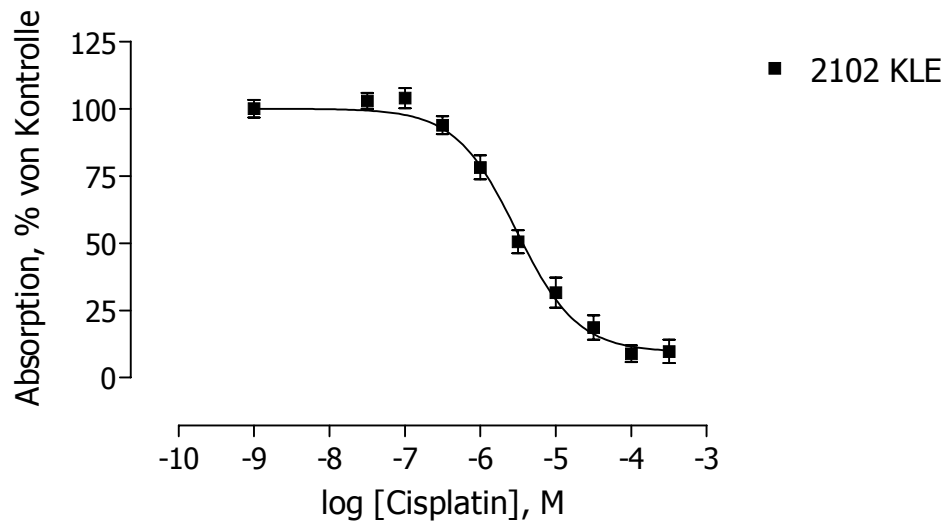
**Abb. 58:** Mittels MTT-Test ermittelte und auf 100 % der Kontrolle normalisierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinie DU145. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus drei Experimenten mit jeweils Triplikaten. Die unbehandelten Kontrollwerte sind als Konzentration  $10^{-9}$  angegeben.



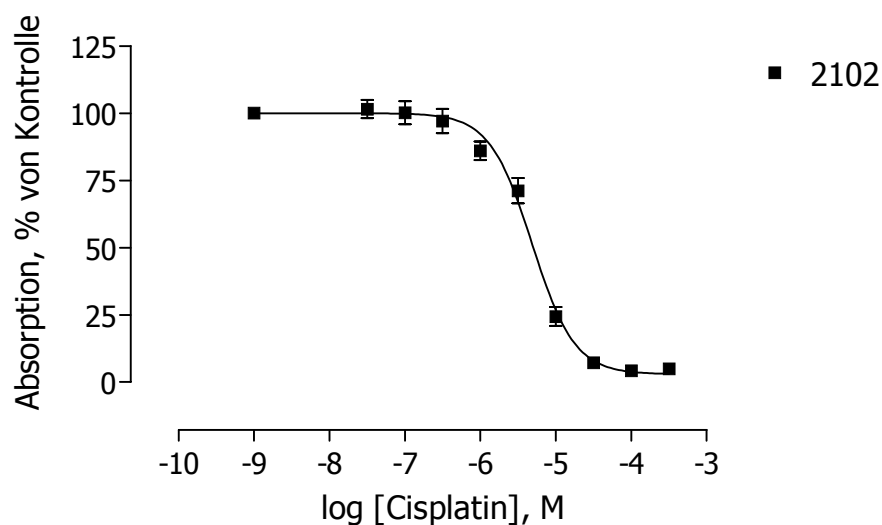
**Abb. 59:** Mittels MTT-Test ermittelte und auf 100 % der Kontrolle normalisierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinie HepG2. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus vier Experimenten mit jeweils Triplikaten. Die unbehandelten Kontrollwerte sind als Konzentration  $10^{-9}$  angegeben.



**Abb. 60:** Mittels MTT-Test ermittelte und auf 100 % der Kontrolle normalisierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinie U937. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus vier Experimenten mit jeweils Triplikaten. Die unbehandelten Kontrollwerte sind als Konzentration  $10^{-9}$  angegeben.

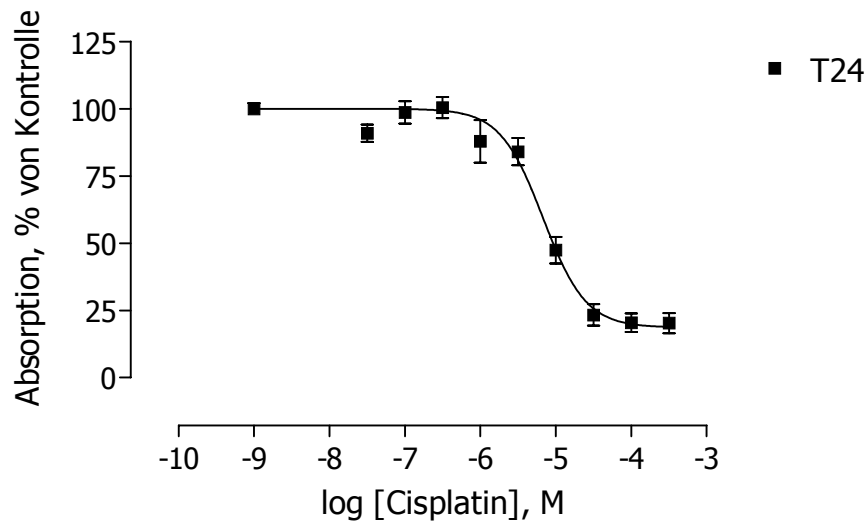


**Abb. 61:** Mittels MTT-Test ermittelte und auf 100 % der Kontrolle normalisierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinie 2102KLE. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus fünf Experimenten mit jeweils Triplikaten. Die unbehandelten Kontrollwerte sind als Konzentration  $10^{-9}$  angegeben.

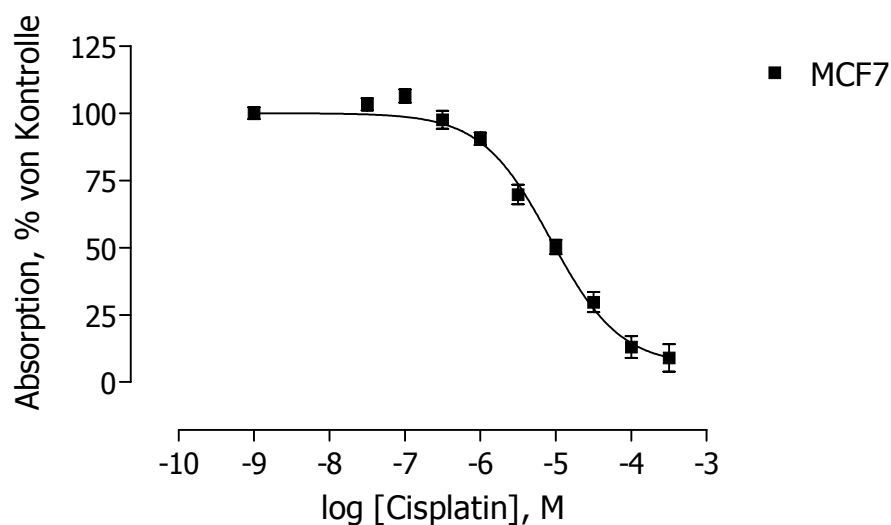


**Abb. 62:** Mittels MTT-Test ermittelte und auf 100 % der Kontrolle normalisierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinie 2102. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus drei Experimenten mit jeweils Triplikaten. Die unbehandelten Kontrollwerte sind als Konzentration  $10^{-9}$  angegeben.

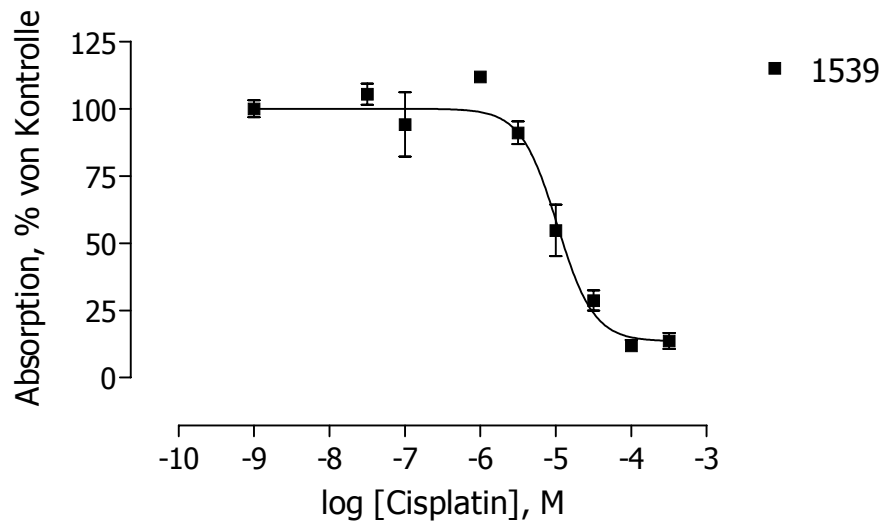




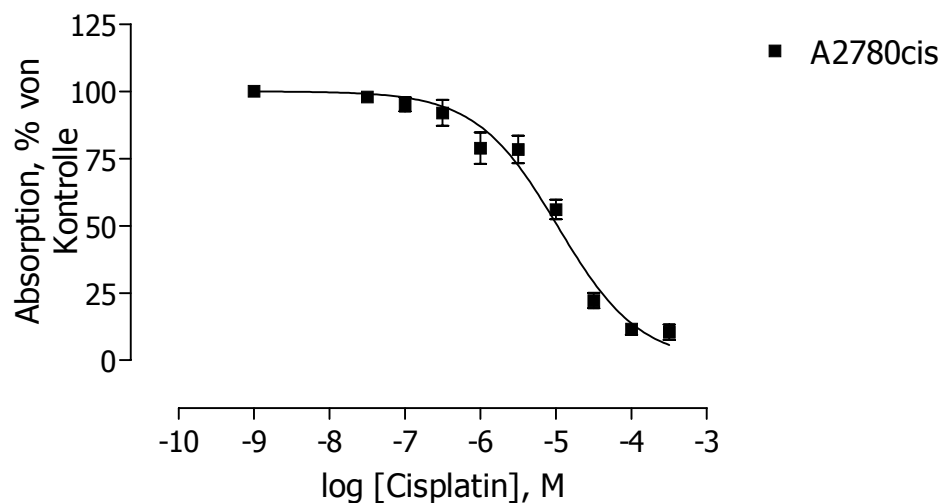
**Abb. 63:** Mittels MTT-Test ermittelte und auf 100 % der Kontrolle normalisierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinie T24. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus fünf Experimenten mit jeweils Triplikaten. Die unbehandelten Kontrollwerte sind als Konzentration  $10^{-9}$  angegeben.



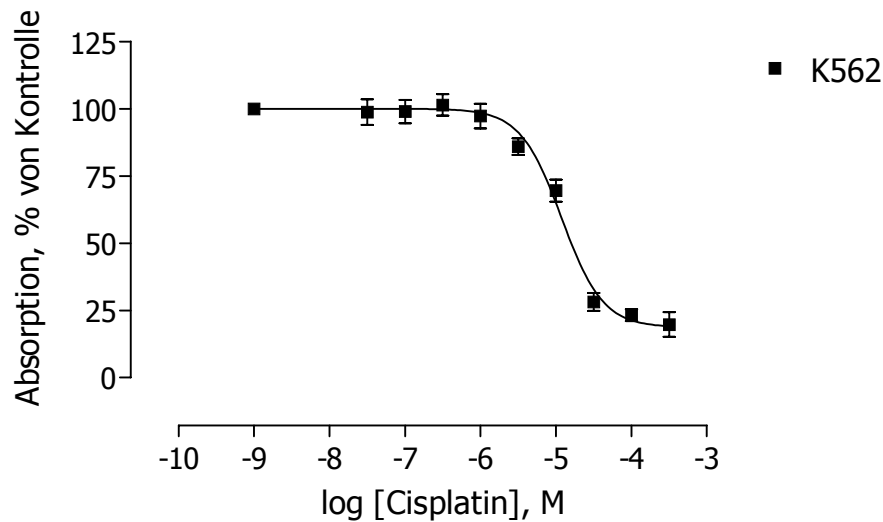
**Abb. 64:** Mittels MTT-Test ermittelte und auf 100 % der Kontrolle normalisierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinie MCF7. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus vier Experimenten mit jeweils Triplikaten. Die unbehandelten Kontrollwerte sind als Konzentration  $10^{-9}$  angegeben.



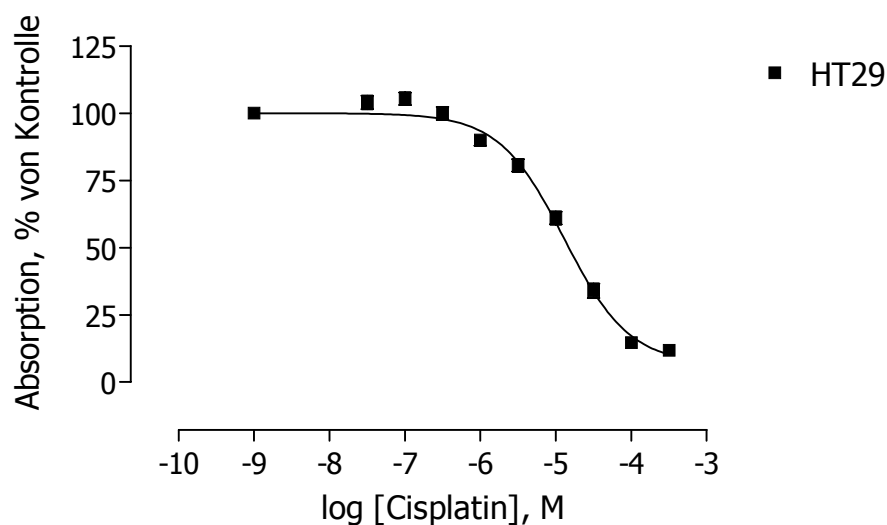
**Abb. 65:** Mittels MTT-Test ermittelte und auf 100 % der Kontrolle normalisierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinie 1539. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus drei Experimenten mit jeweils Triplikaten. Die unbehandelten Kontrollwerte sind als Konzentration  $10^{-9}$  angegeben.



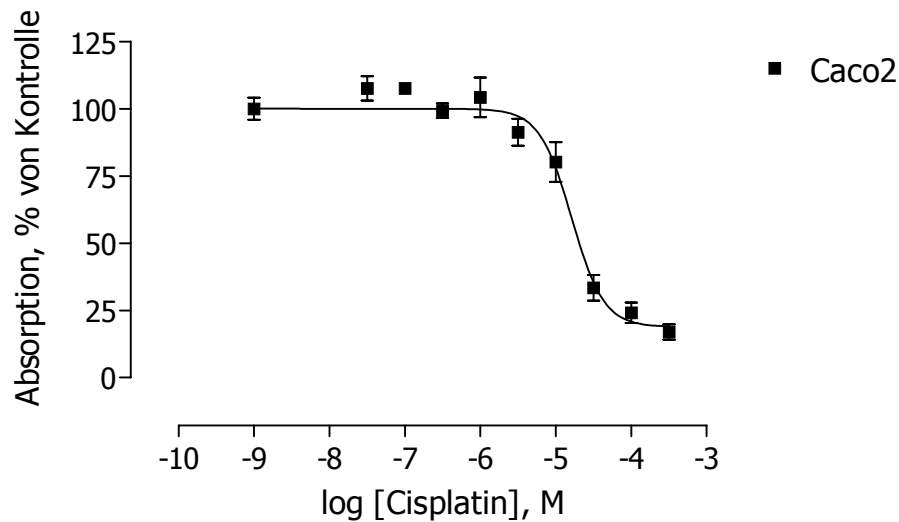
**Abb. 66:** Mittels MTT-Test ermittelte und auf 100 % der Kontrolle normalisierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinie A2780cis. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus drei Experimenten mit jeweils Triplikaten. Die unbehandelten Kontrollwerte sind als Konzentration  $10^{-9}$  angegeben.



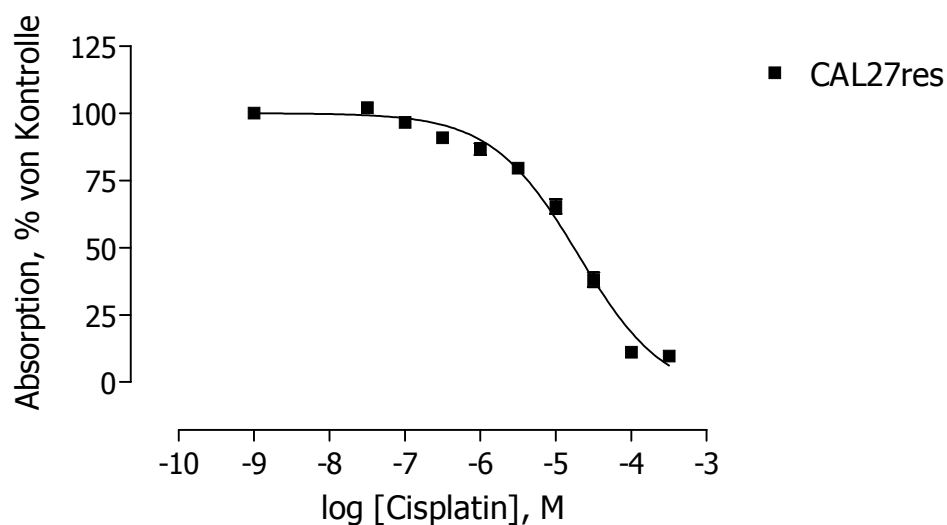
**Abb. 67:** Mittels MTT-Test ermittelte und auf 100 % der Kontrolle normalisierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinie K562. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus vier Experimenten mit jeweils Triplikaten. Die unbehandelten Kontrollwerte sind als Konzentration  $10^{-9}$  angegeben.



**Abb. 68:** Mittels MTT-Test ermittelte und auf 100 % der Kontrolle normalisierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinie HT29. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus vier Experimenten mit jeweils Triplikaten. Die unbehandelten Kontrollwerte sind als Konzentration  $10^{-9}$  angegeben.



**Abb. 69:** Mittels MTT-Test ermittelte und auf 100 % der Kontrolle normalisierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinie CaCo2. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus drei Experimenten mit jeweils Triplikaten. Die unbehandelten Kontrollwerte sind als Konzentration  $10^{-9}$  angegeben.



**Abb. 70:** Mittels MTT-Test ermittelte und auf 100 % der Kontrolle normalisierte Konzentrations-Wirkungskurve von Cisplatin der Zelllinie CAL27res. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SE) aus drei Experimenten mit jeweils Triplikaten. Die unbehandelten Kontrollwerte sind als Konzentration  $10^{-9}$  angegeben.

### 10.3.2 qRT-PCR zur Ermittlung der Housekeeping-Gene mittels geNorm

Tab. 61: Auflistung der mittels qRT-PCR ermittelten Quantities und mittels geNorm errechneten M-Werte und Normalisierungsfaktoren (NF) der 18 untersuchten Zelllinien. Verglichen wurden jeweils die mit Cisplatin behandelten (+) und nicht behandelten (-) Proben einer Zelllinie. Die M-Werte der ermittelten HKGs sind jeweils in fett unter den entsprechenden Genen eingetragen.

	ACTB	B2M	GUSB	HPRT1	RPL13	PRLP0	TFRC	UBE2D2	YWHAZ
<b>1321-</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>1321+</b>	0,53	0,73	0,45	0,84	0,70	0,83	0,99	0,26	0,43
<b>M</b>				<b>0,18</b>		<b>0,10</b>			<b>0,12</b>
<b>1539-</b>	0,35	1,00	0,55	0,61	1,00	0,48	0,55	0,40	0,46
<b>1539+</b>	1,00	0,60	1,00	1,00	0,97	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>M</b>			<b>0,07</b>			<b>0,07</b>	<b>0,14</b>		
<b>2102-</b>	1,00	0,85	1,00	1,00	1,00	1,00	0,97	0,97	1,00
<b>2102+</b>	0,50	1,17	0,61	0,71	0,67	0,37	1,03	1,03	0,84
<b>M</b>					<b>0,07</b>	<b>0,12</b>		<b>0,10</b>	
<b>2102KLE-</b>	1,00	0,69	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,74	0,38
<b>2102KLE+</b>	0,42	1,00	0,31	0,64	0,75	0,54	0,66	1,00	1,00
<b>M</b>			<b>0,09</b>		<b>0,16</b>			<b>0,11</b>	
<b>A2780-</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,19	1,00	1,00
<b>A2780+</b>	0,92	0,74	0,29	0,52	0,55	0,64	1,00	0,36	0,43
<b>M</b>				<b>0,13</b>	<b>0,11</b>	<b>0,18</b>			
<b>A2780cis-</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>A2780cis+</b>	0,15	0,61	0,56	0,40	0,65	0,21	0,67	0,39	0,27
<b>M</b>		<b>0,08</b>	<b>0,06</b>		<b>0,05</b>				
<b>CaCo-</b>	1,00	0,82	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,10	1,00
<b>CaCo+</b>	0,50	1,00	0,76	0,68	0,63	0,43	0,92	1,00	0,62
<b>M</b>					<b>0,05</b>			<b>0,09</b>	<b>0,05</b>
<b>Cal27-</b>	0,67		1,00	0,80	1,00	1,00	1,00		1,00
<b>CAL27+</b>	0,83		0,51	0,98	0,30	0,49	0,83		0,60
<b>M</b>			<b>0,10</b>			<b>0,13</b>			<b>0,19</b>
<b>Cal27res -</b>	1,00		0,56	1,00	0,49	0,58	0,90		0,48
<b>Cal27res +</b>	0,87		0,58	0,96	0,50	0,61	0,78		0,49
<b>M</b>			<b>0,01</b>		<b>0,01</b>				<b>0,01</b>

Fortsetzung Tab. 61

	ACTB	B2M	GUSB	HPRT1	RPL13	PRLP0	TFRC	UBE2D2	YWAHZ
DU145-	1,00	0,46	1,00	0,65	0,14	0,83	0,46	0,87	1,36
DU145+	0,51	1,00	0,91	1,00	1,00	1,20	1,00	1,00	0,73
M		<b>0,18</b>	<b>0,18</b>					<b>0,35</b>	
HEK239-	1,00	0,74	1,00	1,00	1,00	0,89	1,00	1,00	1,00
HEK239+	0,96	1,00	0,93	0,97	0,65	1,00	0,69	0,74	0,76
M				<b>0,02</b>		<b>0,04</b>		<b>0,03</b>	
HepG2-	1,00	0,85	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
HepG2+	0,37	1,00	0,31	0,53	0,29	0,51	0,69	0,29	0,46
M							<b>0,07</b>	<b>0,09</b>	<b>0,13</b>
HT29-	0,45	0,15	1,35	0,44	1,00	0,42	0,37	0,58	0,58
HT29+	1,00	1,00	1,00	1,00	0,58	1,00	1,00	1,00	1,00
M				<b>0,04</b>			<b>0,06</b>	<b>0,03</b>	
K562-	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
K562+	0,32	0,69	0,33	0,45	0,30	0,66	0,79	0,37	0,36
M	<b>0,06</b>					<b>0,10</b>			<b>0,05</b>
Ky5e510-	0,46	1,00	0,88	0,74	1,00	0,59	0,90	0,48	0,61
Ky5e510+	1,00	0,88	1,00	1,00	0,68	1,00	1,00	1,00	1,00
M							<b>0,13</b>	<b>0,21</b>	<b>0,11</b>
MCF7-	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90	1,00
MCF7+	0,27	0,61	0,62	0,57	0,77	0,43	0,53	1,00	0,88
M		<b>0,04</b>				<b>0,04</b>		<b>0,08</b>	
T24-	0,48	0,47	0,79	0,44	1,00	0,31	0,33	1,01	1,00
T24+	1,00	1,00	1,00	1,00	0,79	1,00	1,00	1,00	0,67
M		<b>0,04</b>		<b>0,05</b>				<b>0,08</b>	
U937-	0,92	0,21	1,00	0,93	0,07	0,57	0,26	0,09	0,32
U937+	1,00	1,00	0,52	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
M		<b>0,31</b>	<b>0,21</b>						<b>0,32</b>

### 10.3.3 qRT-PCR der Kandidaten-Gene

**Tab. 62: Übersicht über die Ergebnisse der qRT-PCR Analyse der 18 Zelllinien (unbehandelt (-) und Cisplatin-behandelt (+) für die SSH Kandidaten-Gene (HF1, PI15, DDX21 und EMP1). Gezeigt sind die CT Werte der Duplikate (CT1; CT2), die sich daraus ergebenden Quantities ( $Q_{GOI}$ ), die mit den HKGs ermittelten Normalisierungsfaktoren (NF), die sich aus  $Q_{GOI}$  und NF errechnende „relative Expression“ ( $GOI_{rE}$ ) und die auf die jeweils unbehandelte Probe (-) bezogene „reskalierte relative Expression“ ( $GOI_{rRE}$ ). -: Es konnte bis zu einem PCR-Zyklus von 36 kein Signal detektiert und dann teilweise keine differentielle Expression ermittelt werden.**

<b>HF1</b>						
<b>Probe</b>	<b>CT1</b>	<b>CT2</b>	<b><math>Q_{GOI}</math></b>	<b>NF</b>	<b><math>GOI_{rE}</math></b>	<b><math>GOI_{rRE}</math></b>
1321N1-	19,79	19,84	1,00	1,00	1,00	1,00
1321N1+	22,53	22,78	0,14	0,44	0,32	0,32
1539-	-	-	-	1,00	-	-
1539+	35,97	-	1,00	0,69	-	-
2102-	24,82	25,03	1,00	1,00	1,00	1,00
2102+	28,42	28,87	0,08	0,67	0,11	0,11
2102KLE-	34,46	-	-	0,86	-	-
2102KLE+	-	-	-	1,00	-	-
A2780-	20,28	21,02	1,00	1,00	1,00	1,00
A2780+	21,92	22,1	0,39	0,54	0,72	0,72
A2780cis-	18,03	18,32	1,00	1,00	1,00	1,00
A2780cis+	19,17	19,72	1,00	0,65	1,54	1,54
Caco2-	32,51	-	1,00	1,00	1,00	1,00
Caco2+	32,7	32,47	0,95	0,47	2,03	2,03
Cal27-	29,92	30,33	1,00	1,00	1,00	1,00
Cal27+	32,6	33,19	0,15	0,54	0,27	0,27
Cal27res-	33,57	33,77	0,39	0,69	0,56	1,00
Cal27res+	31,73	32,86	1,00	0,91	1,10	1,95
DU145-	-	-	-	0,48	-	-
DU145+	-	-	-	1,00	-	-
Hek293-	30,65	31,58	0,25	0,82	0,31	1,00
Hek293+	29,31	28,94	1,00	1,00	1,00	3,25
HepG2-	-	-	-	1,00	-	-
HepG2+	-	-	-	0,59	-	-
HT29-	26,86	25,62	0,73	1,00	0,73	1,00
HT29+	25,66	25,92	1,00	0,81	1,21	1,65
K562-	23,38	23,89	0,89	1,00	0,89	1,00
K562+	23,44	23,5	1,00	0,32	3,12	3,5
Kyse510+	30,65	31,58	0,25	0,54	0,47	1,00
Kyse510-	29,31	28,94	1,00	1,00	1,00	2,13
MCF7-	33,65	34,01	1,00	1,00	1,00	1,00
MCF7+	34,12	33,7	0,95	0,68	1,39	1,39
T24-	-	-	-	0,60	-	-
T24+	-	-	-	1,00	-	-
U937-	-	-	-	0,10	-	-
U937+	-	-	-	1,00	-	-

## Fortsetzung Tab. 62

## PI15

Probe	CT1	CT2	Q <sub>GOI</sub>	NF	GOI <sub>rE</sub>	GOI <sub>rRE</sub>
1321N1-	26,16	25,88	1,00	1,00	1,00	1,00
1321N1+	28,31	28,46	0,19	0,44	0,45	0,45
1539-	36,00*	36,00*	0,01	1,00	0,01	1,00
1539+	28,65	28,76	1,00	0,69	1,44	227,31
2102-	25,30	25,19	1,00	1,00	1,00	1,00
2102+	26,41	26,00	0,51	0,67	0,76	0,76
2102KLE-	28,32	28,36	1,00	0,86	1,16	1,00
2102KLE+	-	30,39	0,24	1,00	0,24	0,21
A2780-	17,05	17,20	1,00	1,00	1,00	1,00
A2780+	18,45	18,37	0,41	0,54	0,76	0,76
A2780cis-	25,53	25,14	2,14	1,00	2,14	1,00
A2780cis+	26,68	26,18	1,00	0,65	1,54	0,72
Caco2-	30,65	29,93	0,28	1,00	0,28	1,00
Caco2+	28,47	28,45	1,00	0,47	2,15	7,66
Cal27-	35,29	35,79	0,21	1,00	0,21	1,00
Cal27+	33,20	33,37	1,00	0,54	1,86	8,88
Cal27res-	36,08	-	0,65	0,69	0,94	1,00
Cal27res+	36,24	34,68	1,00	0,91	1,10	1,16
DU145-	34,58	-	0,09	0,48	0,19	1,00
DU145+	30,69	31,66	1,00	1,00	1,00	5,14
Hek293-	24,70	24,84	1,00	0,82	1,21	1,00
Hek293+	24,75	24,86	0,97	1,00	0,97	0,80
HepG2-	32,31	33,33	0,96	1,00	0,96	1,00
HepG2+	32,77	-	1,00	0,59	1,69	1,75
HT29-	-	32,33	1,00	1,00	1,03	1,00
HT29+	31,73	33,06	0,96	0,60	0,96	0,93
K562-	27,36	27,50	1,00	1,00	1,00	1,00
K562+	27,85	28,16	0,67	0,32	2,10	2,10
Kyse510+	24,70	24,84	1,00	0,54	1,85	1,00
Kyse510-	24,75	24,86	0,97	1,00	0,97	0,53
MCF7-	27,24	26,95	1,00	1,00	1,00	1,00
MCF7+	27,27	27,42	0,84	0,68	1,23	1,23
T24-	-	-	-	0,60	-	-
T24+	35,14	32,68	1,00	1,00	1,00	-
U937-	34,00	-	0,23	0,10	2,27	1,00
U937+	31,62	32,17	1,00	1,00	1,00	0,44

\*: Es wurde nach 36 Zyklen kein Signal detektiert. Da die CT Werte der zu vergleichenden Probe unter 30 Zyklen lagen, wurde ein CT Wert von 36,00 in die Berechnung einbezogen.



## Fortsetzung Tab. 62

## DDX21

Probe	CT1	CT2	Q <sub>GOI</sub>	NF	GOI <sub>rE</sub>	GOI <sub>rrE</sub>
1321N1-	20,95	21,21	0,65	1,00	0,65	1,00
1321N1+	20,49	20,43	1,00	0,44	2,30	3,53
1539-	24,58	25,23	1,00	1,00	1,00	1,00
1539+	26,10	26,12	0,43	0,69	0,63	0,63
2102-	21,89	21,19	1,00	1,00	1,00	1,00
2102+	21,45	21,89	0,91	0,67	1,36	1,36
2102KLE-	25,64	25,61	1,00	0,86	1,16	1,00
2102KLE+	26,03	26,07	0,74	1,00	0,74	0,64
A2780-	21,80	21,51	1,00	1,00	1,00	1,00
A2780+	21,76	21,64	0,97	0,54	1,78	1,78
A2780cis-	21,80	21,54	1,00	1,00	1,00	1,00
A2780cis+	22,24	22,31	0,66	0,65	1,01	1,01
Caco2-	20,12	20,28	1,00	1,00	1,00	1,00
Caco2+	21,84	22,14	0,29	0,47	0,62	0,62
Cal27-	27,44	27,74	0,46	1,00	0,46	1,00
Cal27+	26,31	26,61	1,00	0,54	1,86	4,07
Cal27res-	27,64	27,02	0,72	0,69	1,05	1,00
Cal27res+	27,03	26,69	1,00	0,91	1,10	1,05
DU145-	29,08	29,85	0,41	0,48	0,84	1,00
DU145+	28,18	28,14	1,00	1,00	1,00	1,19
Hek293-	19,69	20,08	0,74	0,82	0,89	1,00
Hek293+	19,71	19,19	1,00	1,00	1,00	1,12
HepG2-	20,59	20,47	1,00	1,00	1,00	1,00
HepG2+	22,11	22,18	0,33	0,59	0,55	0,55
HT29-	21,21	21,20	0,53	0,55	0,53	1,00
HT29+	20,25	20,34	1,00	1,00	1,38	2,60
K562-	22,26	22,25	1,00	1,00	1,00	1,00
K562+	24,07	24,04	0,29	0,32	0,90	0,90
Kyse510+	19,69	20,08	0,74	0,54	1,36	1,00
Kyse510-	19,71	19,19	1,00	1,00	1,00	0,73
MCF7-	22,68	22,25	1,00	1,00	1,00	1,00
MCF7+	23,07	23,03	0,67	0,68	0,97	0,97
T24-	27,19	26,72	0,29	0,60	0,48	1,00
T24+	25,18	25,14	1,00	1,00	1,00	2,10
U937-	28,12	28,33	0,65	0,10	6,36	1,00
U937+	27,69	27,52	1,00	1,00	1,00	0,16

## Fortsetzung Tab. 62

**EMP1**

<b>Probe</b>	<b>CT1</b>	<b>CT2</b>	<b>Q<sub>GOI</sub></b>	<b>NF</b>	<b>GOI<sub>rE</sub></b>	<b>GOI<sub>rrE</sub></b>
1321N1-	24,05	24,26	1,00	1,00	1,00	1,00
1321N1+	25,42	25,94	0,35	0,44	0,80	0,80
1539-	27,13	27,31	1,00	1,00	1,00	1,00
1539+	28,02	27,69	0,64	0,69	0,93	0,93
2102-	27,78	28,15	0,07	1,00	0,07	1,00
2102+	24,20	24,05	1,00	0,67	1,49	21,30
2102KLE-	35,58	34,43	0,00	0,86	0,00	1,00
2102KLE+	26,54	26,81	1,00	1,00	1,00	277,16
A2780-	22,41	22,32	0,37	1,00	0,37	1,00
A2780+	20,64	21,19	1,00	0,54	1,84	5,02
A2780cis-	24,30	24,49	1,00	1,00	1,00	1,00
A2780cis+	24,58	24,93	0,78	0,65	1,21	1,21
Caco2-	31,50	32,04	0,15	1,00	0,15	1,00
Caco2+	28,82	29,27	1,00	0,47	2,15	14,18
Cal27-	31,79	32,23	0,26	1,00	0,26	1,00
Cal27+	30,01	30,08	1,00	0,54	1,86	7,27
Cal27res-	31,51	31,05	0,84	0,69	1,22	1,00
Cal27res+	30,74	31,32	1,00	0,91	1,10	0,90
DU145-	35,16	35,21	0,61	0,48	1,26	1,00
DU145+	34,76	34,19	1,00	1,00	1,00	0,79
Hek293-	27,29	27,24	0,80	0,82	0,97	1,00
Hek293+	27,04	26,86	1,00	1,00	1,00	1,03
HepG2-	34,20	32,87	1,00	1,00	1,00	1,00
HepG2+	-	35,83	0,20	0,59	0,34	0,34
HT29-	26,15	26,27	0,15	0,15	0,15	1,00
HT29+	23,44	23,58	1,00	1,00	1,80	11,70
K562-	32,07	31,28	1,00	1,00	1,00	1,00
K562+	34,42	33,22	0,23	0,32	0,70	0,70
Kyse510+	27,29	27,24	0,80	0,54	1,49	1,00
Kyse510-	27,04	26,86	1,00	1,00	1,00	0,67
MCF7-	-	-	-	1,00	-	-
MCF7+	-	-	-	0,68	-	-
T24-	32,53	32,02	0,26	0,60	0,42	1,00
T24+	30,53	30,10	1,00	1,00	1,00	2,36
U937-	-	-	-	0,10	-	-
U937+	34,95	34,55	1,00	1,00	-	-

**Tab. 63: Auswertung der Ergebnisse der qRT-PCR Analyse für die Zelllinien A2780 und A2780cis der SSH Kandidaten-Gene (HF1, PI15, DDX21 und EMP1). Es wurde jeweils die Expression der unbehandelten bzw. behandelten Proben beider Zelllinien aufeinander bezogen. Gezeigt sind die CT Werte der Duplikate (CT1; CT2), die sich daraus ergebenden Quantities ( $Q_{GOI}$ ), die mit den HKGs ermittelten Normalisierungsfaktoren (NF), die sich aus  $Q_{GOI}$  und NF errechnende „relative Expression“ ( $GOI_{rE}$ ) und die auf die Zelllinie A2780cis bezogene „reskalierte relative Expression“ ( $GOI_{rrE}$ ).**

<b>Gen</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>CT1</b>	<b>CT2</b>	<b><math>Q_{GOI}</math></b>	<b>NF</b>	<b><math>GOI_{rE}</math></b>	<b><math>GOI_{rrE}</math></b>
PI15	A2780cis	25.5	25.1	0.1	1.0	0.0	1.0
	A2780	17.0	17.2	37.8	1.0	1.0	308.1
HF1	A2780cis	18.0	18.3	1.0	1.0	1.0	1.0
	A2780	20.3	21.0	2.0	1.0	0.2	2.1
EMP1	A2780cis	24.3	24.5	0.2	1.0	0.2	1.0
	A2780	22.4	22.3	1.0	1.0	1.0	4.3
DDX21	A2780cis	21.8	21.5	1.0	1.0	1.0	1.0
	A2780	21.8	21.5	1.0	1.0	1.0	1.1
<b>Gen</b>	<b>behandelt</b>	<b>CT1</b>	<b>CT2</b>	<b><math>Q_{GOI}</math></b>	<b>NF</b>	<b><math>GOI_{rE}</math></b>	<b><math>GOI_{rrE}</math></b>
PI15	A2780cis	26.7	26.2	0.0	1.0	0.0	1.0
	A2780	18.5	18.4	1.0	0.7	1.5	381.1
HF1	A2780cis	19.2	19.7	1.0	1.0	1.0	1.0
	A2780	21.9	22.1	0.2	0.7	0.2	0.2
EMP1	A2780cis	24.6	24.9	0.1	1.0	0.1	1.0
	A2780	20.6	21.2	1.0	0.7	1.5	21.0
DDX21	A2780cis	22.2	22.3	0.7	1.0	0.7	1.0
	A2780	21.8	21.6	1.0	0.7	1.5	2.2



## 12 PUBLIKATIONEN

### **Extended Abstracts**

Gosepath EM, Weykam S, Wiese M, Kassack MU. Identification of new genes involved in cisplatin resistance and their expression profile in 18 human tumor cell lines. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2005; 43(12):579-580.

Gosepath EM, Weykam S, Gruenewald E, Ko Y, Wiese M, Kassack MU. Differential gene expression studies in cisplatin-sensitive versus cisplatin-resistant human cancer cell lines. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004; 42(11):637-639.

Zisowsky J, Becker A, Weykam S, Kassack M, Jaehde U. Assessment of platinum sensitivity in human tumor cells. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2003; 41(12):612-613.

### **POSTERPRÄSENTATIONEN**

Weykam S, Wiese M, Kassack, M U. Differential gene expression study of cisplatin-resistance-related genes in several human cancer cell lines. Symposium of Central European Society of Anticancer Drug Research (CESAR), 2005, Wien

Weykam S, Grünewald E, Ko Y, Wiese M, Kassack, M U. Differentielle Genexpressionsanalyse der Cisplatin-resistenten und Cisplatin-sensitiven Ovariakarzinom Zelllinien A2780cis und A2780. Jahrestagung der Central European Society of Anticancer Drug Research (CESAR), 2004, Rostock