

**Expressionsanalyse und funktionelle  
Charakterisierung von zwei neuen  
Tumorsuppressorgen-Kandidaten  
des Mammakarzinoms**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Eva Kloppocki  
aus Wuppertal

Mai 2004

Erster Gutachter: Prof. Dr. Carsten Niemitz

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Reinhold Schäfer

Disputation am: 12.07. 2004

## **Meinen Eltern**

*„Every new beginning comes from some other beginning's end“*

## **Danksagung**

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer bei der metaGen Pharmaceuticals GmbH, Dr. Edgar Dahl für die interessante Themenstellung und die Anregungen und Diskussionen, die wesentlich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben. Prof. Dr. Carsten Niemitz und Prof. Dr. Reinhold Schäfer möchte ich für die Betreuung und Begutachtung meiner Dissertation von Seiten der Freien Universität Berlin bzw. der Charité Universitätsmedizin Berlin danken.

Bei allen Mitarbeitern und der Geschäftsführung der metaGen Pharmaceuticals GmbH und den Mitgliedern im GCC („gynecological cancer consortium“) möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung und Motivation während meiner Dissertation bedanken, ganz besonders bei meinen Laborkollegen Anke Vogel und Detlev Mennerich. Außerdem danke ich den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Molekulare Pathologie“ von Prof. Dr. Schäfer an der Charité, vor allem Jacqueline Hellwig und Anja Schramme, für die Einweisung in die Zellkultur und die Anleitung und Unterstützung bei den zellbiologischen Arbeiten.

Glen Kristiansen, Arndt Hartmann, Robert Stöhr und Peter-Johannes Wild haben durch die Bereitstellung von Gewebeproben und die gute Kooperation diese Arbeit besonders im Bereich der IHC- und TMA-Analysen unterstützt. Kerstin Lehmann und Esmeralda Heiden gaben mir eine Einweisung in die konfokale Mikroskopie. Vielen Dank an meine „Mitdoktoranden“ bei metaGen: Grit Kasper, Marina Himmelfarb, Simone Kaiser, Christoph Wissmann, Eike Staub, Rupi Kuner und Stefan Röpcke – ohne Euch hätte die Arbeit nicht so viel Spaß gemacht!

Last but not least danke ich meinen Eltern für ihre Unterstützung, ihr Vertrauen und ihr großes Interesse an meiner Arbeit. Der Abschluss meiner Dissertation ist mein Geschenk zu Eurem 40jährigen Hochzeitsjubiläum.

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Epidemiologie des Mammakarzinoms	1
1.2.	Tumorgenese	3
1.3.	Identifizierung von Kandidatengenomen durch <i>in silico</i> Methoden	7
1.4.	Strategie zur Validierung von Kandidatengenomen	8
1.5.	Zell-Matrix-Verbindungen	9
1.6.	Wnt-Signaltransduktionsweg	11
2.	Zielsetzung	14
3.	Material und Methoden	16
3.1.	Puffer und Lösungen	16
3.2.	Zelllinien	18
3.3.	Plasmid-Isolierung	18
3.4.	Sequenzierung	19
3.5.	LoH-Analyse	21
3.6.	Mutationsanalyse	21
3.6.1.	Primer-Design	22
3.6.2.	Gradienten-PCR	22
3.6.3.	Amplifikation von Tumor-DNA und Post-PCR-Markierung	23
3.6.4.	SSCP-Gel	24
3.6.5.	Datenanalyse mit GeneScan® Analysis Software	24
3.7.	Northern Hybridisierung	25
3.7.1.	Sondenherstellung	25
3.7.2.	Kontroll-Dot-Blot	25
3.7.3.	Sondenmarkierung und Aufreinigung	26
3.7.4.	Hybridisierung der Membranen	26
3.8.	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung	27
3.8.1.	Präparation der RNA-Sonden	28
3.8.2.	Hybridisierung der Paraffinschnitte	29
3.9.	Poly-A <sup>+</sup> -RNA Präparation	32
3.9.1.	RNA-Präparation aus Gewebeproben	32
3.9.2.	RNA-Präparation aus Zellen	33
3.10.	cDNA-Synthese	33
3.10.1.	Erststrangsynthese aus isolierter poly-A <sup>+</sup> -RNA	33
3.10.2.	cDNA Synthese für quantitative PCR (Taqman™)	34
3.10.3.	Zweitstrangsynthese	34
3.11.	Quantitative PCR (TaqMan™)	35
3.11.1.	Vergleichende C <sub>t</sub> -Methode	38
3.12.	DNA-Präparation aus Gewebeproben	38
3.13.	Proteinchemische Methoden	39
3.13.1.	Protein-Überexpression in <i>E.coli</i>	39
3.13.2.	Reinigung von rekombinanten Proteinen aus <i>E.coli</i> BL21(DE3)	42

3.13.3.	<i>In vitro</i> Translation (IVT)	43
3.13.4.	Herstellung von polyklonalen Peptidantikörpern	45
3.13.5.	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
3.13.6.	Western-Hybridisierung	46
3.13.7.	Immunzytochemie	47
3.13.8.	Immunhistochemie an Paraffin-Schnitten	48
3.13.9.	Immunfluoreszenz-Färbung	48
3.13.10.	„Tissue Microarrays“ (TMAs)	50
3.14.	Zellbiologische Methoden	51
3.14.1.	Zellzahl-Bestimmung	51
3.14.2.	Mycoplasmen-Test	51
3.14.3.	Proteinüberexpression in humanen Zelllinien	51
3.14.4.	Transfektion	53
3.14.5.	Stabile Transfektion	53
3.14.6.	Herstellung von Zell-Lysaten	54
3.14.7.	Proliferations-Assay	54
3.14.8.	Poly-HEMA-Assay	55
3.14.9.	Adhäsions-Assay	56
3.14.10.	Invasions-Assay	57
3.15.	Statistische Methoden	58
4.	Ergebnisse	59
4.1.	Auswahl und Bestätigung der differentiellen Expression der Kandidatengene auf RNA-Ebene	59
4.1.1.	Reduzierte Tensin-Expression in Brusttumoren	62
4.1.1.1.	Lokalisation von Tensin in Epithel- und Endothelzellen des Brustgewebes	64
4.1.2.	<i>Tensin</i> -Expression in Normalgeweben	66
4.1.3.	Mutationsanalyse von Tensin in Mammakarzinomen	68
4.1.4.	Verlust der <i>SFRP1</i> Expression in soliden Karzinomen	69
4.2.	Prognostische Relevanz von SFRP1	71
4.2.1.	Charakterisierung eines SFRP1-spezifischen Antikörpers	71
4.2.2.	Korrelation von SFRP1-Expression und klinischen Parametern	76
4.3.	Funktionelle Analyse von SFRP1	83
4.3.1.	Einfluss von SFRP1-Überexpression auf das Proliferationsverhalten von Mammakarzinom-Zelllinien	83
4.3.2.	Adhäsionsverhalten von SFRP1-transfizierten Mammakarzinom-Zelllinien	86
4.3.3.	Einfluss von SFRP1 auf die Invasivität von Mammakarzinom-Zelllinien	87
5.	Diskussion	90
5.1.	Tensin	90
5.2.	Secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1)	95
6.	Zusammenfassung	108
7.	Summary	110
8.	Literaturverzeichnis	112

9.	Abbildungsverzeichnis	124
10.	Tabellenverzeichnis	125
11.	Lebenslauf	126
12.	Publikationsliste	127
13.	Anhang	129
13.1.	Abkürzungsverzeichnis	129
13.2.	Histologie und klinisch-pathologische Eigenschaften der verwendeten Gewebeprobe	131
13.3.	Primer für die Mutationsanalyse	132
13.3.1.	Secreted Frizzled-related Protein 1	132
13.3.2.	Tensin	133
13.4.	Erklärung	135