

3. Ergebnisse

3.1. Analyse der *H-REV107-2* Expression

3.1.1. *H-REV107-2* Expression in Ovarialepithel- und Ovarialkarzinom-Zelllinien

Um Erkenntnisse über die Expression von *H-REV107-2* auf mRNA-Ebene in humanen Ovarialepithel- und Ovarialkarzinom-Zelllinien zu gewinnen, wurde eine Northern Blot Analyse mit acht Zelllinien durchgeführt. Getestet wurden die Adenokarzinom-Zelllinien MDAH2774, OVCAR-3, CAOV-3 und SK-OV-3, die Teratokarzinom-Zelllinie PA-1, die Klarzellkarzinomlinie ES-2 und die Ovarialkarzinom-Zelllinie A27/80 (unbekannte Spezifizierung) sowie die humane Ovarialepithel-Zelllinie HOSE (human ovarian surface epithelium; Tsao *et al.*, 1995). Die HOSE-Zelllinie ist als nicht tumorigene, immortale Linie das

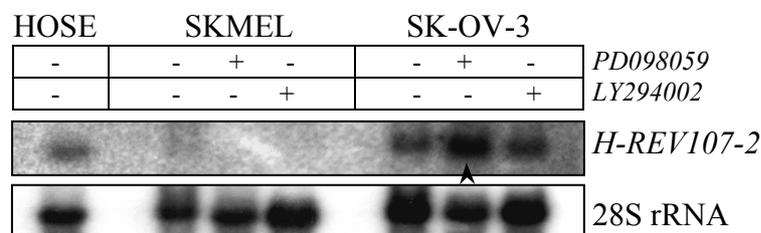
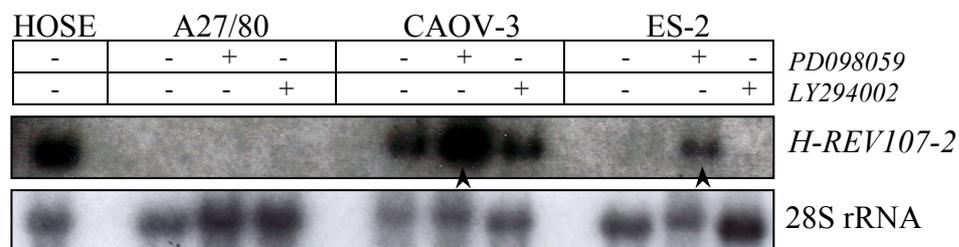
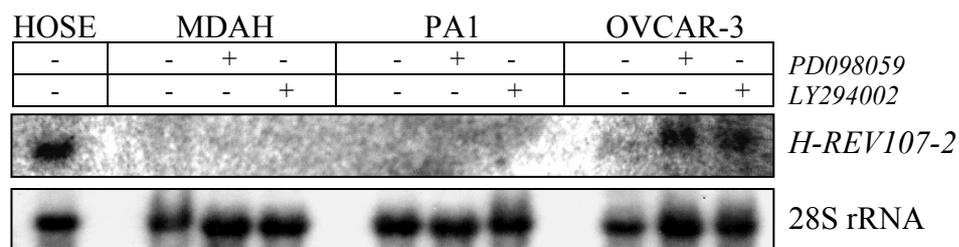


Abbildung 3: Northern Blot Hybridisierung von RNA aus einer immortalisierten humanen Ovarialepithel-Zelllinie (HOSE) und sieben Ovarialkarzinom-Zelllinien mit einer *H-REV107-2* cDNA-Probe. Die Zellen wurden mit PD098059 (50µM) oder LY294002 (10µM) für 48h behandelt. 28S rRNA = 28S ribosomale RNA als Ladungskontrolle. Die Pfeile signalisieren die verstärkte Genexpression in den Zelllinien nach Behandlung mit PD098059.

(fast) normale Pendant zu den Ovarialkarzinom-Zelllinien. Gleichzeitig sollte mit dieser Analyse eine mögliche Abhängigkeit der *H-REV107-2* Genexpression vom RAF/MEK/ERK- und PI-3-Kinase-Signalweg untersucht werden. Dazu wurden alle Zelllinien (mit Ausnahme der HOSE-Zelllinie) in der Zellkultur mit je einem Hemmstoff für einen der beiden Signalwege behandelt. Für den RAF/MEK/ERK-Signalweg war dies der MEK-Inhibitor PD098059 und für den PI-3-Kinase-Signalweg der PI-3-K-Inhibitor LY294002. Sowohl von den unbehandelten als auch von den behandelten Zelllinien wurde RNA isoliert. Nach Anfertigung der Northern Blots (siehe Punkt 2.3.) erfolgte die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten 0,7kb großen *H-REV107-2* cDNA-Probe.

Die Ovarialepithel-Zelllinie HOSE weist in allen drei Blots ein deutlich positives Signal für die 0,7kb große *H-REV107-2* mRNA auf. In den Zelllinien MDAH2774, PA-1, A27/80 und ES-2 lässt sich kein *H-REV107-2* Signal beobachten. In den Zelllinien OVCAR-3 wird eine schwache und in der Zelllinie SK-OV-3 und CAOV-3 eine deutliche Bande bei 0,7kb detektiert

Zelllinien	relative <i>H-REV107-2</i> Expression		
	unbehandelt	PD098059	LY294002
Ovarialepithel-Linie HOSE	+	n.d.	n.d.
Adenokarzinom-Linien MDAH 2774	-	-	-
OVCAR-3	(+)	+	(+)
CAOV-3	+	++	+
SK-OV-3	+	++	+
Teratokarzinom-Linie PA-1	-	-	-
Klarzellkarzinom-Linie ES-2	-	+	-
Ovarialkarzinom-Linie A 27/80	-	-	-

Tabelle 2: *H-REV107-2* Expression in einer Ovarialepithel- und sieben Ovarialkarzinom-Zelllinien verschiedenen Ursprungs. Die Intensität der Reaktionen wurden der Stärke nach unterteilt: - keine Reaktion; (+) schwach positiv; + positiv; ++ deutlich positiv; n.d.= nicht durchgeführt.

(siehe Abbildung 3 und Tabelle 2). Das in der Zelllinie OVCAR-3 beobachtete schwach positive *H-REVI07-2* Signal war in nachfolgenden Experimenten nicht mehr reproduzierbar (Lotz *et al.*, 2005). Für die Hemmung der RAF/MEK/ERK-Signalkaskade wurden alle sieben Ovarialkarzinom-Zelllinien mit dem MEK-Inhibitor PD098059 behandelt. Die Behandlung erfolgte für 48h mit einer Konzentration des Inhibitors von 50µM. In der Zelllinie OVCAR-3 war eine leichte Zunahme des Signals zu verzeichnen, die jedoch auf eine ungleichmäßige Beladung des Blots zurückzuführen ist. In den Linien CAOV-3, SK-OV-3 und ES-2 konnte hingegen eine deutliche Verstärkung des *H-REVI07-2* Signals beobachtet werden. Bei den übrigen Zelllinien (MDAH 2774, PA-1, A 27/80) zeigte sich dagegen keine Reaktion auf die Behandlung mit PD098059. Somit erfolgt in einem Teil der Ovarialkarzinom-Zelllinien die Suppression von *H-REVI07-2* über einen aktivierten RAF/MEK/ERK-Signalweg (siehe Abbildung 3 und Tabelle 2).

Der PI-3-K-Inhibitor LY294002 kam zum Einsatz, um den PI-3-Kinase-Signalweg zu unterbrechen. Es wurden ebenfalls alle sieben Ovarialkarzinom-Zelllinien in der Zellkultur für 48h mit diesem Inhibitor in einer Konzentration von 10µM behandelt. Die Hybridisierung zeigte in allen Zelllinien, mit Ausnahme von OVCAR-3, das gleiche Signal wie in den unbehandelten Linien. Der PI-3-Kinase-Signalweg hat somit keinen Einfluss auf die *H-REVI07-2* mRNA Expression. Bei OVCAR-3 handelt es sich vermutlich ebenfalls um das oben beschriebene Beladungsproblem des Northern Blots.

3.1.2. *H-REVI07-2* Expression in Ovarialkarzinomen

Das Genexpressionsmuster in der Zellkultur kann mitunter erheblich von dem im Gewebe abweichen. Die Zellen einer Zelllinie sind genetisch identisch. Man untersucht also nur das Genom einer einzigen Zelle. Ein Tumor hingegen ist heterogen. Er besteht nicht nur aus den Tumorzellen, sondern enthält auch Zellen anderer Gewebe wie z.B. Bindegewebszellen, Zellen des Gefäßsystems und Entzündungszellen. Diese werden bei Analysen von nicht-mikrodisseziertem Material natürlich mit untersucht. Zusätzlich besteht eine Heterogenität innerhalb einer Patientengruppe. Will man eine Aussage über die Expression eines Gens in einem bestimmten Tumor machen, ist es nötig, Gewebeproben möglichst vieler verschiedener Patienten zu untersuchen. Wichtig ist auch, die Expression zwischen normalem und Tumorgewebe jedes einzelnen Patienten zu vergleichen, um eine Überexpression oder Suppression beurteilen zu können. Eine Möglichkeit, diese Bedingungen in einem Experiment zu erfüllen, ist die Hybridisierung eines so genannten Matched Tumor/Normal Expression Arrays bzw. eines

Cancer Profiling Arrays (Clontech). Auf diesen Microarrays ist cDNA von unterschiedlichen Tumoren und ihrem korrespondierenden normalen Gewebe paarweise aufgebracht. Auf einem solchen Array befinden sich cDNA-Paare von vielen verschiedenen Patienten.

Ein Matched Tumor/Normal (MTN) Array mit 68 cDNA-Paaren, von denen 3 Paare aus dem Ovar stammen, wurde mit der *H-REV107-2* cDNA hybridisiert. Ein zweiter größerer Cancer Profiling (CP) Array wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Bakhyt Zhumabayeva (Clontech, Palo Alto, USA) ebenfalls mit der *H-REV107-2* cDNA hybridisiert. Dieser Array bestand aus insgesamt 241 cDNA-Paaren, davon 14 Paare aus dem Ovar. Jedes einzelne cDNA-Paar beider

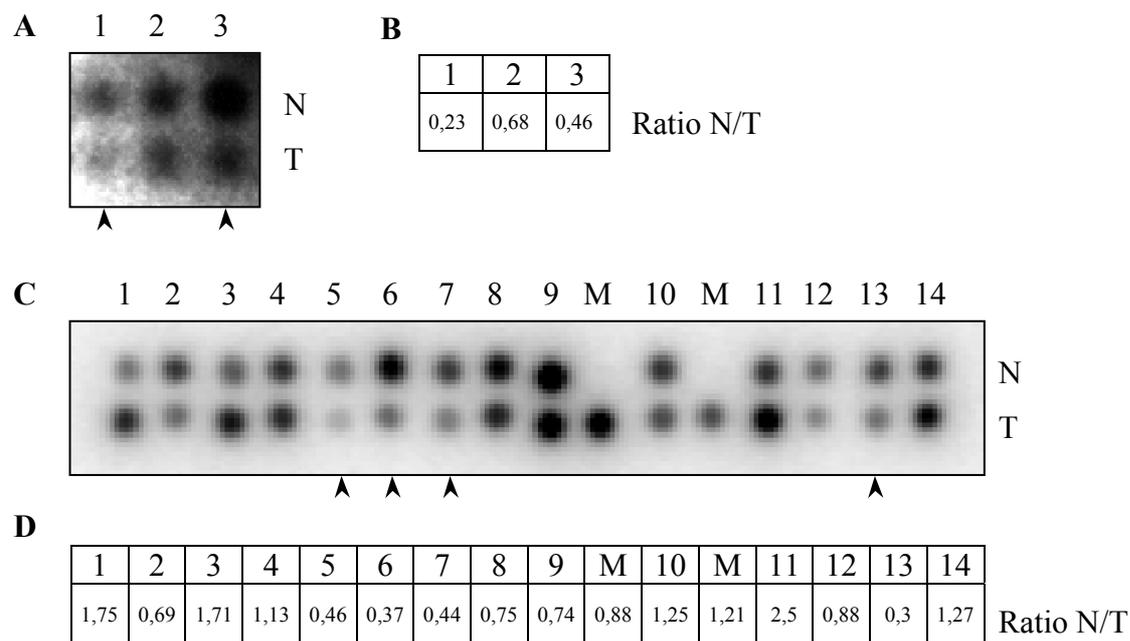


Abbildung 4: **A)** Matched Tumor/Normal Expression Array und **C)** Cancer Profiling Array hybridisiert mit der *H-REV107-2* cDNA-Probe. Die mit N markierten Reihen entsprechen der cDNA aus Normalgewebe, die mit T markierten Reihen der cDNA aus Tumorgewebe. Je ein Spot aus der N-Reihe und der darunter liegende Spot aus der T-Reihe bilden das cDNA-Paar einer Patientin. M = Metastase des vorhergehenden Tumors; Pfeil = verminderte *H-REV107-2* Expression im Ovarialtumor. **B)** und **D)** Auswertung der Arrays mit dem Phosphoimager durch Dr. Artur Gontarewicz (Labor für molekulare Tumorpathologie, Charité Berlin). Ratio N/T = relative *H-REV107-2* Expression in normalem Ovarialepithel und Ovarialtumoren (Hintergrund subtrahiert). Werte unter 0,5 gelten als signifikant verminderte *H-REV107-2* Expression im Ovarialtumor.

Arrays wurde vor dem Auftragen auf die Membran mit Hilfe der drei Housekeeping-Gene UBI (ubiquitin), RPS9 (ribosomal protein S9) und 23kDa (23kDa highly basic protein) normalisiert, so dass vergleichbare Mengen cDNA je Paar aufgetragen werden konnten (Zhumabayeva *et al.*, 2001). Nach Hybridisierung des MTN und des CP Arrays mit der *H-REV107-2* cDNA-Probe erfolgte die Auswertung mit dem Phosphoimager durch Dr. Artur Gontarewicz (Labor für

molekulare Tumorpathologie, Institut für Pathologie, Charité Berlin), der uns die Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat.

Des Weiteren wurde ein „Ovarian Tumor Blot“ (Invitrogen) mit *H-REV107-2* hybridisiert. Auf diesem Blot befinden sich nebeneinander gleiche Mengen RNA (20µg) aus Ovarialtumoren und korrespondierendem Normalgewebe von vier verschiedenen Patientinnen.

Die Hybridisierung des MTN Arrays zeigt bei den cDNA-Paaren 1 und 3 eine um mehr als das Zweifache verminderte *H-REV107-2* Expression im Ovarialtumor im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe (siehe Abbildung 4 A und B). Die cDNA-Paare 5, 6, 7 und 13 des CP Arrays weisen ebenfalls eine um mehr als das zweifache verminderte *H-REV107-2* Expression im Tumor auf (siehe Abbildung 4 C und D). Somit ist in sechs der insgesamt 17 mit den MTN und CP Arrays getesteten Ovarialkarzinome die *H-REV107-2* Expression um mehr als das zweifache supprimiert. Ein Rückschluss auf die Abhängigkeit der Genexpression von der Art der Tumoren ist aus diesen Experimenten jedoch nicht möglich, da über den Differenzierungs- und Malignitätsgrad der Tumoren, aus denen die untersuchten cDNA-Proben stammen, nicht ausreichend Informationen vorliegen.

Die Hybridisierung des Ovarian Tumor Blots mit *H-REV107-2* ergab ebenfalls ein sehr interessantes Expressionsmuster (siehe Abbildung 5). Probe 1 stammt von einem schlecht differenzierten mesodermalen Karzinom, Probe 2 von einem schlecht differenzierten Adenokarzinom und Probe 3 von einem schlecht differenzierten Klarzellkarzinom. Diese Tumoren weisen einen niedrigen Differenzierungsgrad auf, sind also hoch maligne Tumoren. In allen drei Tumorproben lässt sich kein *H-REV107-2* Signal erkennen. Im korrespondierenden

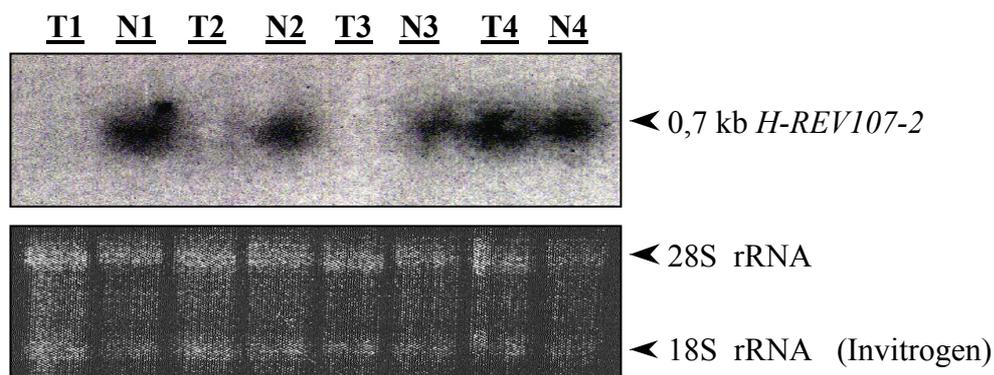


Abbildung 5: Ovarian Tumor Blot hybridisiert mit der *H-REV107-2* cDNA-Probe. T = gesamt RNA aus Ovarialtumor; N = gesamt RNA aus korrespondierendem Normalgewebe. Die paarweise angeordneten Proben stammen jeweils von einer Patientin. T1 = schlecht differenziertes mesodermales Karzinom; T2 = schlecht differenziertes Adenokarzinom; T3 = schlecht differenziertes Klarzellkarzinom; T4 = papillär seröses Zystadenom vom Borderline-Typ

Normalgewebe hingegen gibt es ein deutliches Signal. Die Probe 4 stammt von einem papillär serösen Zystadenom vom Borderline-Typ. Hierbei handelt es sich um einen Tumor von niedriger Malignität. Hier zeigt sich sowohl im Tumor als auch im Normalgewebe ein etwa gleich starkes *H-REVI07-2* Signal. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die *H-REVI07-2* Expression im Zusammenhang mit der Malignität eines Ovarialtumors steht. In undifferenzierten hoch malignen Tumoren geht die Expression verloren, in niedrig malignen Tumoren scheinbar nicht.

3.2. Analyse der *MUC18* Expression

3.2.1. *MUC18* Expression in Ovarialepithel- und Ovarialkarzinom-Zelllinien

Immunhistochemische Studien konnten eine *MUC18* Expression vorwiegend in Endothelien, Epithelien und in der glatten Muskulatur zeigen (siehe Punkt 1.4.2.). Viele Tumoren weisen eine konstante bzw. verstärkte *MUC18* Expression auf, dagegen lässt sich in einem weiten Spektrum von Tumoren immunhistochemisch keine *MUC18* Expression nachweisen. Zu diesen gehören Tumoren von Kolon, Ösophagus, Pankreas, Niere, Prostata, Cervix und Endometrium (Shih *et al.*, 1999). Zwischen der Stärke der *MUC18* Expression und der Eindringtiefe bzw. dem Metastasierungspotenzial maligner Melanome besteht eine direkte Korrelation (Lehmann *et al.*, 1989; Luca *et al.*, 1993). In Mammakarzinomen dagegen wurde ein Verlust der *MUC18* Expression gefunden (Shih *et al.*, 1997; siehe Punkt 1.4.2.).

Um die Analysen der *MUC18* Expression auf Ovarialgewebe zu erweitern, wurde die RNA aus den unter Punkt 3.1.1. genannten Ovarialepithel- und Ovarialkarzinom-Zelllinien auch mit einer 1014bp langen *MUC18* cDNA-Probe hybridisiert. Als Positiv-Kontrolle für eine *MUC18* Expression diente die RNA der Melanom-Zelllinie SKMEL 28. Diese exprimiert *MUC18* überdurchschnittlich stark. Die mögliche Abhängigkeit der Genexpression vom RAF/MEK/ERK- bzw. PI-3-Kinase-Signalweg wurde ebenfalls parallel dazu untersucht (siehe Tabelle 3). Die Melanom-Zelllinie SKMEL 28 zeigt wie erwartet ein deutliches *MUC18* Signal bei 3.5kb. Die Ovarialepithel-Zelllinie HOSE zeigt in allen drei Blots ebenfalls eine positive *MUC18* Reaktion. Diese erscheint jedoch relativ schwach. Die Zelllinien MDAH 2774, SK-OV-3, ES-2 und A27/80 weisen kein *MUC18* Signal auf. Eine positive Reaktion zeigt sich nur bei den Linien CAOV-3 und PA-1. Hier scheint es sogar im Vergleich zur HOSE-Zelllinie zu einer Verstärkung des *MUC18* Signals zu kommen. OVCAR-3 weist eine schwach positive Reaktion auf (siehe Abbildung 6 und Tabelle 3).

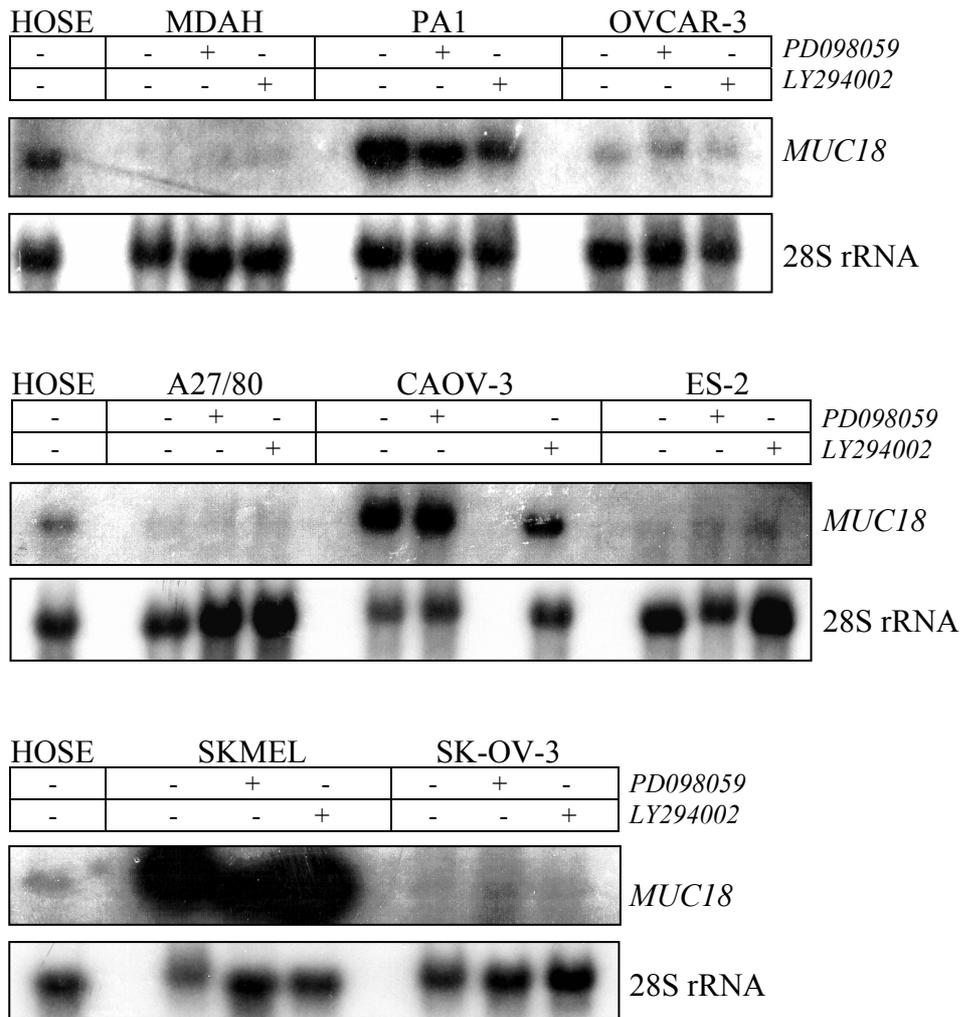


Abbildung 6: Northern Blot Hybridisierung von RNA aus einer immortalisierten humanen Ovarialepithel-Zelllinie (HOSE) und sieben Ovarialkarzinom-Zelllinien mit dem 1014bp PvuII-PvuII *MUC18* cDNA-Fragment. Die Zellen wurden mit PD098059 (50µM) oder LY294002 (10µM) für 48h behandelt. 28S rRNA = 28S ribosomale RNA als Ladungskontrolle. Sowohl PD098059 als auch LY294002 haben keinen Einfluss auf die *MUC18* Expression.

Alle sieben Ovarialkarzinom-Zelllinien sowie die Melanom-Zelllinie wurden in der Zellkultur mit dem MEK-Inhibitor PD098059 und dem PI-3-K-Inhibitor LY294002 für je 48h behandelt, um die entsprechenden Signalwege zu blockieren. Sowohl die Behandlung mit PD098059 als auch die Behandlung mit LY294002 führten zu keinerlei Veränderung der *MUC18* Genexpression in den Ovarialkarzinom-Zelllinien. In der Zelllinie ES-2 scheint es durch die Behandlung mit LY294002 zu einer Verstärkung des *MUC18* Signals zu kommen. Hierbei handelt es sich jedoch um ein Artefakt der Bildbearbeitung.

Zelllinien	relative <i>MUC18</i> Expression		
	unbehandelt	PD098059	LY294002
Ovariälepithel-Linie HOSE	+	n.d.	n.d.
Melanom-Linie SKMEL 28	++	++	++
Adenokarzinom-Linien MDAH 2774	-	-	-
OVCAR-3	(+)	(+)	(+)
CAOV-3	+	+	+
SK-OV-3	-	-	-
Teratokarzinom-Linie PA-1	+	+	+
Klarzellkarzinom-Linie ES-2	-	-	-
Ovarialkarzinom-Linie A 27/80	-	-	-

Tabelle 3: *MUC18* Expression in einer Ovariälepithel-, einer Melanom- und sieben Ovarialkarzinom-Zelllinien verschiedenen Ursprungs. Die Intensität der Reaktionen wurde der Stärke nach unterteilt: - keine Reaktion; (+) schwach positiv; + positiv; ++ deutlich positiv; n.d. = nicht durchgeführt.

3.2.2. *MUC18* Expression in Ovarialkarzinomen

Eine Untersuchung der *MUC18* Expression auf RNA-Ebene in Ovarialkarzinomen wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht durchgeführt. Solche Analysen beschränkten sich vorwiegend auf Tumor-Zelllinien anderer Gewebe, insbesondere Melanom-Zelllinien (Lehmann *et al.*, 1989; Sers *et al.*, 1993; Luca *et al.*, 1993) und auf die Untersuchung einiger normaler humaner Gewebe (Sers *et al.*, 1994).

Um Erkenntnisse über die *MUC18* Expression in Ovarialtumoren zu gewinnen, wurde ein 68 cDNA-Paare umfassender Matched Tumor/Normal Expression Array mit dem 1014bp PvuII-PvuII *MUC18* cDNA-Fragment hybridisiert. Eine Auswertung mit dem Phosphoimager war nicht möglich. Der hybridisierte Array wies dafür einen zu hohen Hintergrund auf. Die

Beurteilung des Arrays erfolgte visuell. Auf dem MTN Array befinden sich 3 cDNA-Paare aus dem Ovar. Die Hybridisierung des Arrays zeigt bei den Spots der cDNA-Paare 1 und 3 in der mit T markierten Reihe eine deutlich schwächere Reaktion als die zugehörigen Spots der N-Reihe. In

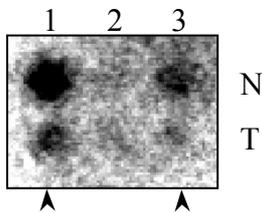


Abbildung 7: A) Matched Tumor/Normal Expression Array hybridisiert mit dem 1014bp PvuII-PvuII *MUC18* cDNA-Fragment. Die mit N markierte Reihe entspricht der cDNA aus Normalgewebe, die mit T markierte Reihe der cDNA aus Tumorgewebe. Je ein Spot aus der N-Reihe und der darunter liegende Spot aus der T-Reihe bilden das cDNA-Paar einer Patientin. Pfeil = verminderte *MUC18* Expression im Ovarialtumor.

diesen beiden Fällen ist die *MUC18* Expression im Tumor gegenüber dem Normalgewebe vermindert (siehe Abbildung 7). Somit ist in zwei von drei getesteten Ovarialkarzinomen die *MUC18* Expression auf RNA-Ebene vermindert. Da es sich um den gleichen MTN Array wie aus dem Experiment mit *H-REV107-2* handelt, ist auch hier eine Aussage über die Abhängigkeit der *MUC18* Expression vom Differenzierungs- bzw. Malignitätsgrad der Tumoren nicht möglich. Da der Focus der vorliegenden Arbeit auf *H-REV107-2* liegt, wurde die Hybridisierung des Cancer Profiling Array (Clontech) und des Ovarian Tumor Blot (Invitrogen) mit *MUC18* nicht weiter verfolgt.

3.3. Koloniewachstums-Assay

Die Tatsache, dass in der Northern Blot Analyse fünf der sieben Ovarialkarzinom-Zelllinien für *H-REV107-2* sowie vier der sieben Zelllinien für *MUC18* negativ waren und die Ergebnisse der MTN bzw. CP Arrays lassen zwar vermuten, dass beide Gene als Tumor-Suppressoren im Ovarialkarzinom fungieren können, sind aber kein Nachweis einer solchen Funktion. Um eine genauere Aussage machen zu können, sollte der Einfluss einer *H-REV107-2* bzw. *MUC18* Überexpression in negativen Ovarialkarzinom-Zelllinien untersucht werden.

Für diese Untersuchung stand das *H-REV107-2* Gen im Expressionsvektor pcDNA3 (*pcH-REV107-2*) bereits zur Verfügung (Husmann *et al.*, 1998). Ein geeigneter Expressionsvektor für das *MUC18* Gen musste hergestellt werden. Dazu war es notwendig, die 3,58kb *MUC18* cDNA in pcDNA3 zu klonieren. Der Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI linearisiert und die 5' Plasmid DNA-Enden dephosphoryliert. Die *MUC18* cDNA-Probe wurde ebenfalls mit

EcoRI (siehe Punkt 2.4.1.) aus PUC18 ausgeschnitten und besaß dadurch an beiden Enden eine EcoRI Schnittstelle. So war eine Ligation dieser cDNA-Probe mit dem Plasmid pcDNA3 ohne weitere Umstände möglich (siehe Karte der Vektoren, Punkt 2.5. Abbildung 2). Nach der Transformation der *pcH-REV107-2* und *pcMUC18* Plasmide in kompetente E. Coli Bakterien und ihrer Isolierung mittels Plasmid-Mini- bzw. -Maxi-Präparation nach Anzüchtung wurde ein

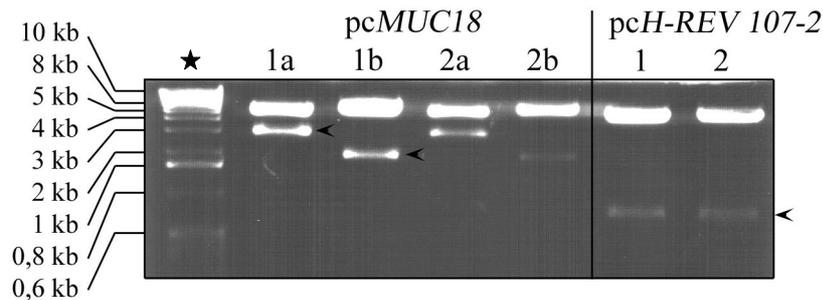


Abbildung 8: Kontrollverdau von je zwei unabhängigen Plasmid-Maxi-Präparationen der Vektoren *pcMUC18* und *pcH-REV107-2*. ★ = 10kb Smart Ladder. Die mit 1 und 2 gekennzeichneten Banden entsprechen je einer Plasmid-Maxi-Präparation. a = Verdau *pcMUC18* mit EcoRI; b = Verdau *pcMUC18* mit EcoRV; *pcH-REV107-2* wurde gleichzeitig mit EcoRI und Xho I verdaut. Die Pfeile markieren die erwarteten cDNA-Fragmente. Die Trennung zwischen dem 5,4 kb Fragment (Bande 1a) und dem 6,4 kb Fragment (Bande 1b) ist nur für das erfahrene Auge sichtbar.

Kontrollverdau durchgeführt. Der Kontrollverdau des Vektors *pcDNA3/MUC18* (*pcMUC18*) erfolgte einmal mit dem Enzym EcoRI und einmal mit EcoRV. Bei korrekter Orientierung des Gens im Vektor war beim Verdau mit EcoRI ein 5,4kb Fragment und ein 3,58kb Fragment, beim Verdau mit EcoRV ein 6,4kb Fragment sowie ein 2,5kb Fragment zu erwarten. Der Kontrollverdau des Vektors *pcH-REV107-2* mit den Enzymen EcoRI und Xho I sollte bei fehlender Verunreinigung ein 5,4kb Fragment und ein 0,73kb Fragment ergeben. Anhand des Restriktionsmusters konnte die richtige Orientierung von *MUC18* im Vektor *pcDNA3* bestätigt und eine Kontamination beider Vektoren ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 8 und 9).

Der Vektor *pcDNA3/EGFP* (Enhanced Green Fluorescent Protein; *pcEGFP*) wurde für die Kontrolltransfektion verwendet. Da die Zelllinie A27/80 in der Northern Blot Analyse keine Expression von *H-REV107-2* und *MUC18* aufwies, wurde sie für die stabilen Transfektionen mit *pcH-REV107-2*, *pcMUC18* und *pcEGFP* und den Koloniewachstums-Assay ausgewählt. Zusätzlich wurde die Zelllinie OVCAR-3 mit *pcH-REV107-2* und *pcEGFP* im Rahmen dieser Untersuchung transfiziert. Für diese Experimente wurden je zehn Ansätze mit 1×10^5 Zellen der Linie A27/80 mit *pcH-REV107-2* bzw. *pcMUC18* und parallel dazu jeweils zehn Ansätze mit

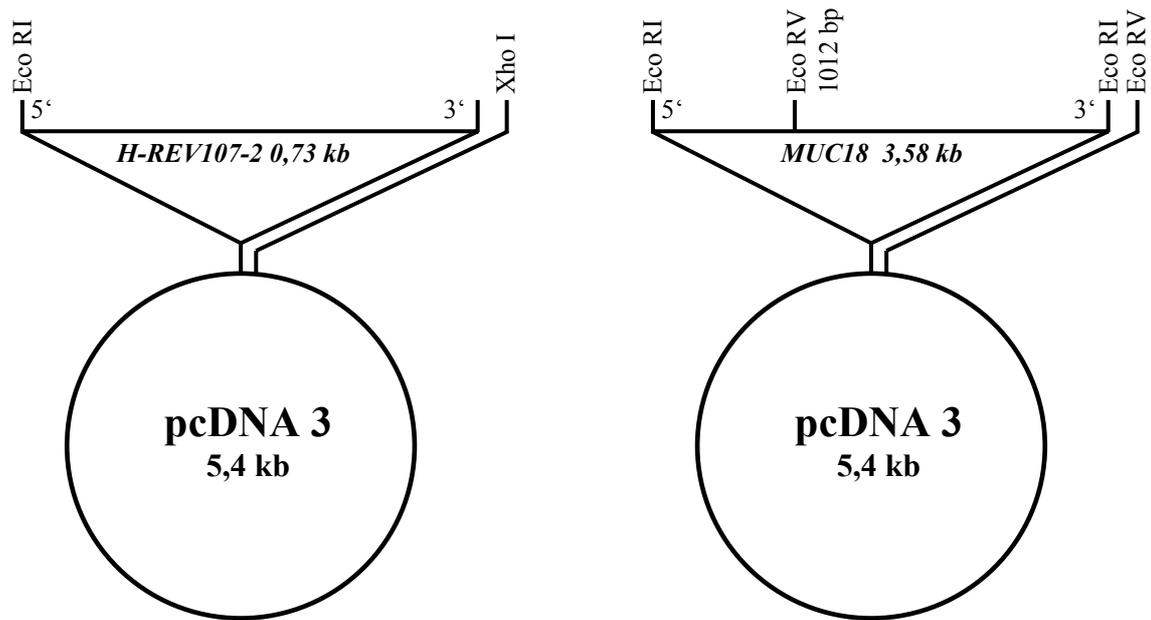


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Restriktionkarte der verwendeten Expressionsvektoren *pcH-REV107-2* und *pcMUC18*. Enthalten sind nur die Schnittstellen der Enzyme die für den Kontrollverdau verwendet wurden.

pcEGFP zur Kontrolle transfiziert. Weiterhin wurden jeweils zwei unabhängige Plasmid-DNA-Maxi-Präparationen verwendet, so dass je fünf Transfektionen mit der einen und je fünf Transfektionen mit der anderen Präparation durchgeführt wurden. Nach dem gleichen Prinzip wurde mit der Zelllinie OVCAR-3 und den Vektoren *pcH-REV107-2* und *pcEGFP* verfahren. Das verwendete Plasmid *pcDNA3* (Invitrogen) besitzt neben einem CMV-Promotor für das Testgen auch einen SV40-Promotor für das Neomycin-Transferase-Gen. G418 wurde 48h nach der Transfektion zur Selektion eingesetzt. Es war nur den Zellen möglich zu überleben, die den Expressionsvektor in ihr eigenes Genom integrierten, somit die Neomycin-Transferase exprimierten und dadurch resistent gegen G418 waren. Die Transfektion mit dem Vektor *pcEGFP* führt zur Expression des unter Blaulicht fluoreszierenden Proteins EGFP. So war es möglich, 24h bzw. 48h nach der Transfektion die Transfektionseffizienz unter dem Mikroskop zu überprüfen. Unterschiede im Zellwachstum zwischen *pcEGFP* und *pcDNA3* transfizierten A27/80 Zellen wurden nicht festgestellt (Daten nicht gezeigt).

3.3.1. Einfluss einer *H-REV107-2* Überexpression auf die Zellproliferation

Die Wirkung einer *H-REV107-2* Überexpression auf die Zellproliferation ist bereits von DiSepio *et al.* für zwei Zelllinien beschrieben worden. Die Mammakarzinom-Zelllinie T47D und die Zelllinie CHO (Chinese hamster ovary) wurden beide mit *pcH-REV107-2* (sense), *pcDNA3* und

pcH-REV107-2 (antisense) transfiziert. So konnte gezeigt werden, dass eine *H-REV107-2* Überexpression zu einer Hemmung der Zellproliferation um 60–70% in beiden Zelllinien führt. Um nun den Effekt einer *H-REV107-2* Überexpression in Ovarialkarzinom-Zelllinien zu untersuchen, wurden die Linien A27/80 und OVCAR-3 mit *pcH-REV107-2* und *pcEGFP* transfiziert (siehe Punkt 2.7.1.). Die Transfektionsansätze wurden nach 48h 1:10 verdünnt und die Selektion durch G418 begonnen. Die Selektionsdauer betrug für die Transfektion der

Zelllinie	Transfizierte cDNA	Zahl (Mittelwert ± Standardabweichung) der G418 resistenten Kolonien ≥ 1mm (1,5µg Plasmid DNA / 1x10 ⁵ Zellen, 1:10 verdünnt)	Prozent
A 27/80	<i>pcH-REV107-2</i>	8,78 ± 3,42	39,7
A 27/80	<i>pcEGFP</i>	22,11 ± 2,89	100
OVCAR-3	<i>pcH-REV107-2</i>	9,33 ± 4,3	190,8
OVCAR-3	<i>pcEGFP</i>	4,89 ± 2,89	100

Tabelle 4: Koloniausbeute der Zellen nach Transfektion mit dem Expressionsvektor *pcH-REV107-2* und dem Kontrollplasmid *pcEGFP* (je neun Transfektionen). Das Wachstum der mit *pcEGFP* transfizierten Zellen wurde gleich 100% gesetzt.

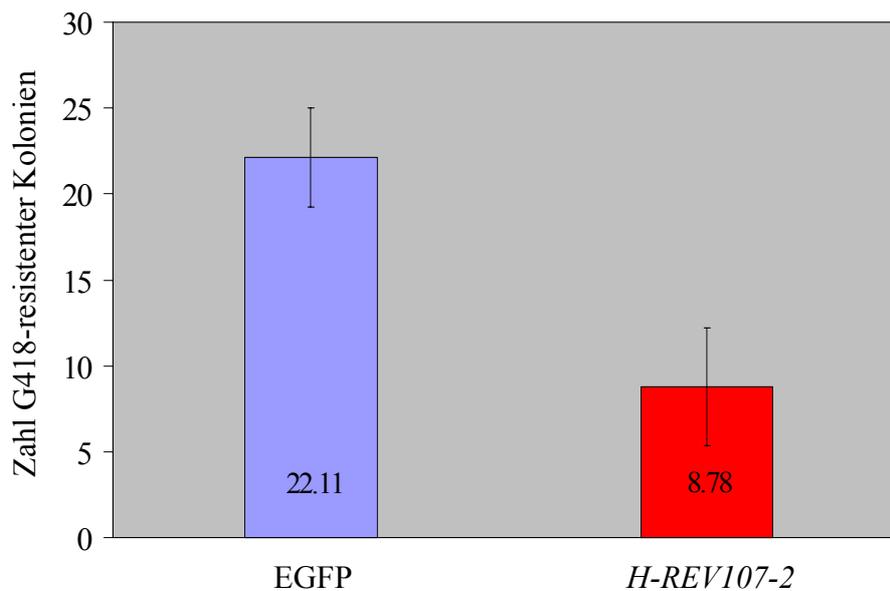


Abbildung 10: Graphische Darstellung des Einflusses einer *H-REV107-2* Überexpression in A27/80 Ovarialkarzinom-Zellen (Mittelwert aus neun Transfektionen). Es handelt sich hier um eine signifikante *H-REV107-2* vermittelte Suppression des Koloniewachstums ($P < 0,0001$).

Zelllinie A27/80 mit pc*H-REV107-2* und pcEGFP elf Tage und für die Transfektion der Zelllinie OVCAR-3 mit pc*H-REV107-2* und pcEGFP fünf Tage länger. Die Selektion mit 600µg/ml G418 führt innerhalb einer Woche zum völligen Absterben der nicht transfizierten Zellen. Nach Beendigung der Selektion wurden die entstandenen Kolonien gefärbt, ausgezählt und ausgewertet (siehe Punkt 2.7.3.). Bei beiden Zelllinien konnten jedoch nur neun Transfektionen zur Auswertung herangezogen werden. Fehlerhafte Verdünnung führte bei einer der Transfektionen und der zugehörigen Kontrolle der Linie OVCAR-3 zu falsch erhöhten Werten. Eine Transfektion der Linie A27/80 wurde zur Erzeugung stabil *H-REV107-2* exprimierender Klone herangezogen und konnte so nicht mit in die Auswertung einfließen. Nach Berechnung der Standardabweichung ergab sich folgendes Bild (siehe Tabelle 4): Die Transfektion der Zelllinie A27/80 mit pc*H-REV107-2* führte zu einer deutlichen Reduktion der Zahl G418-resistenter Kolonien im Vergleich zur Transfektion dieser Zellen mit pcEGFP (siehe Abbildung 10). Im Durchschnitt betrug die Zahl der Kolonien ($\geq 1\text{mm}$) in den Transfektionen mit pcEGFP 22,11 je Kulturflasche. Die Transfektionen mit pc*H-REV107-2* führten im Schnitt jedoch nur zu einer Zahl von 8,78 Kolonien ($\geq 1\text{mm}$) pro Kulturflasche. Da das Kontrollplasmid pcEGFP keinen Effekt auf die Zellproliferation hat (siehe Punkt 3.3.), lässt sich das Wachstum der mit ihm transfizierten Zellen mit 100% ansetzen. Davon ausgehend hat die Transfektion von A27/80 Zellen mit pc*H-REV107-2* zu einer Reduktion des Koloniewachstums um 60,2% geführt. Die

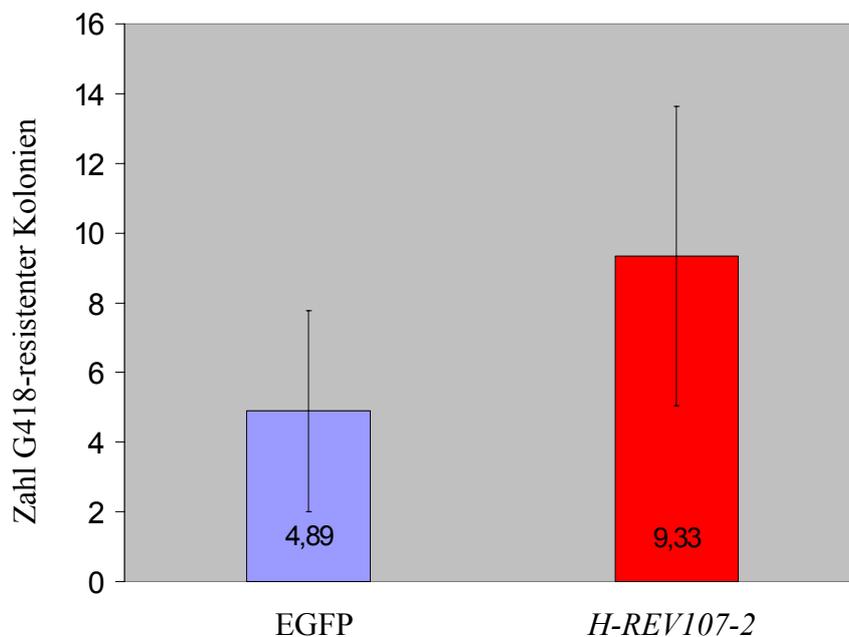


Abbildung 11: Graphische Darstellung des Einflusses einer *H-REV107-2* Überexpression in OVCAR-3 Ovarialkarzinom-Zellen (Mittelwert aus neun Transfektionen). *H-REV107-2* hat hier keinen Einfluss auf das Koloniewachstum.

geringe Standardabweichung zeigt darüber hinaus eine weitgehend konstante Transfektions- und Selektionseffizienz an. Es handelt sich hier um eine signifikante *H-REV107-2* vermittelte Suppression des Koloniewachstums der Ovarialkarzinom-Zelllinie A27/80 ($P < 0,0001$).

Die Transfektion der Zelllinie OVCAR-3 mit *pcH-REV107-2* und *pcEGFP* führte zu einem anderen Ergebnis. Es scheint auf den ersten Blick zu einer Steigerung der Zellproliferation in den mit *pcH-REV107-2* transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrolltransfektionen zu kommen (siehe Tabelle 4 und Abbildung 11). Die Transfektion der Zellen mit *pcEGFP* führte im Durchschnitt zu einer Zahl von 4,89 Kolonien ($\geq 1\text{mm}$) je Kulturflasche. Dagegen erhielt man nach Transfektion der OVCAR-3 Zellen mit *pcH-REV107-2* durchschnittlich 9,33 Kolonien ($\geq 1\text{mm}$) je Kulturflasche. Das Wachstum der mit *pcEGFP* transfizierten Zellen wird wieder mit 100% angesetzt. So führt die Transfektion von OVCAR-3 Zellen mit *pcH-REV107-2* scheinbar zu einer Steigerung des Koloniewachstums um 90,8%. Dieses Ergebnis relativiert sich jedoch nach Berechnung der Standardabweichung. Sie beträgt für Transfektionen mit *pcEGFP* $\pm 2,89$. Dies entspricht 59,1% des Mittelwertes. Für Transfektionen mit *pcH-REV107-2* beträgt sie $\pm 4,3$. Dies entspricht 46,1% des Mittelwertes. Die Standardabweichungen überlappen sich in großen Bereichen (siehe Abbildung 11). Auf Grund dieser hohen Streubreite der Werte wurde keine statistische Signifikanz erreicht. Man kann davon ausgehen, dass eine *H-REV107-2* Überexpression in der Ovarialkarzinom-Zelllinie OVCAR-3 keinen signifikanten Einfluss auf die Zellproliferation hat.

Obwohl die Zelllinien A27/80 und OVCAR-3 gleich behandelt wurden, ist die Variation in der Transfektion und Selektion bei OVCAR-3 wesentlich größer. Der Grund für die hohe Variabilität bleibt unklar.

3.3.2. Einfluss einer *MUC18* Überexpression auf die Zellproliferation

Die Expression des *MUC18* Gens geht in Mammakarzinomen verloren. Dies könnte zur Entstehung von Mammakarzinomen beitragen. *MUC18*-positive MCF-7 Mammakarzinom-Zellen führten im Tierexperiment zu kleineren, stärker kohäsiven und weniger infiltrierend wachsenden Mammatumoren als *MUC18*-negative MCF-7 Zellen (Shih *et al.*, 1997). Koloniewachstums-Assays wurden mit *MUC18* bisher noch nicht durchgeführt.

Die Beeinflussung der Zellproliferation durch eine *MUC18* Überexpression wurde an der Ovarialkarzinom-Zelllinie A27/80 untersucht. Die Transfektion erfolgte mit *pcMUC18* und *pcEGFP* (siehe Punkt 2.7.1.). Nach 48h wurden die Ansätze im Verhältnis 1:10 verdünnt und die Selektion mit G418 begonnen. Auch hier führte die Selektion mit 600 $\mu\text{g/ml}$ G418 innerhalb

einer Woche zum völligen Absterben der nicht transfizierten Zellen. Die Selektionsdauer für diese Transfektionen betrug dreizehn Tage. Die entstandenen Kolonien wurden anschließend gefärbt ausgezählt und ausgewertet (siehe Punkt 2.7.3.). Für die Auswertung konnten nur acht der jeweils zehn Transfektionen herangezogen werden. Eine Transfektion mit pc*MUC18* und der zugehörigen Kontrolle wurde genutzt, um stabil *MUC18* exprimierende Klone herzustellen. Bei einer zweiten Transfektion führte die fehlerhafte Verdünnung zu falsch erhöhten Werten, so dass eine Nutzung für die Auswertung nicht möglich war. Nach Berechnung der Standardabweichung

Zelllinie	transfizierte cDNA	Zahl (Mittelwert \pm Standardabweichung) der G418 resistenten Kolonien $\geq 1\text{mm}$ (1,5 μg Plasmid DNA / 1×10^5 Zellen, 1:10 verdünnt)	Prozent
A27/80	pc <i>MUC18</i>	19 \pm 4,69	55,5
A27/80	pcEGFP	34,25 \pm 3,62	100

Tabelle 5: Koloniausbeute der Zellen nach Transfektion mit dem Expressionsvektor pc*MUC18* und dem Kontrollplasmid pcEGFP (je acht Transfektionen). Das Wachstum der mit pcEGFP transfizierten Zellen wurde gleich 100% gesetzt.

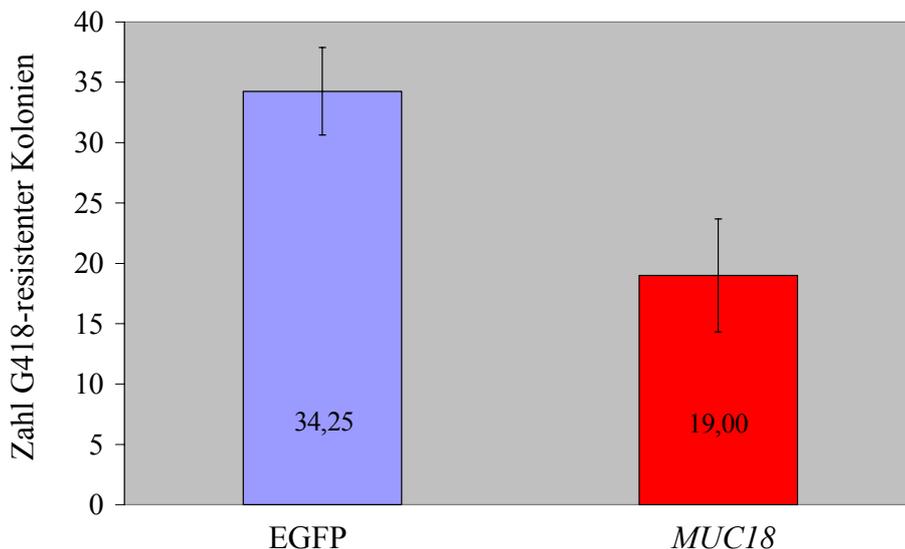


Abbildung 12: Graphische Darstellung des Einflusses einer *MUC18* Überexpression in A27/80 Ovarialkarzinom-Zellen (Mittelwert aus acht Transfektionen). Es handelt sich hier um eine signifikante *MUC18* vermittelte Suppression des Koloniewachstums ($P < 0,0004$).

zeigte sich folgendes Bild (siehe Tabelle 5): Die Transfektion der Ovarialkarzinom-Zelllinie A27/80 mit *pcMUC18* führt zu einer deutlichen Reduktion der Bildung G418-resistenter Kolonien im Vergleich zu den Transfektionen mit dem Kontrollplasmid (siehe Abbildung 12). Eine durchschnittliche Zahl von 34,25 Kolonien ($\geq 1\text{mm}$) je Kulturflasche war bei Transfektionen mit *pcEGFP* zu beobachten. Dagegen führten die Transfektionen von A27/80 Zellen mit *pcMUC18* im Schnitt nur zu 19,0 Kolonien ($\geq 1\text{mm}$) je Kulturflasche. Das Wachstum der mit *pcEGFP* transfizierten Zellen wurde wieder mit 100% angesetzt. Daraus resultiert eine Verminderung des Koloniewachstums um 44,5% durch eine Transfektion mit *pcMUC18*. Die berechnete Standardabweichung beträgt für *pcEGFP* $\pm 3,62$ und für *pcMUC18* $\pm 4,69$. Es handelt sich hier um eine signifikante *MUC18* vermittelte Suppression des Koloniewachstums in der Ovarialkarzinom-Zelllinie A27/80 ($P < 0,0004$).

3.4. Herstellung stabil exprimierender Klone

Die Rolle von *H-REV107-2* und *MUC18* im Ovarialkarzinom soll über die hier vorliegende Arbeit hinaus weiter untersucht werden. Die Ovarialkarzinom-Zelllinie A27/80 exprimiert auf RNA-Ebene keines der beiden Gene, die Überexpression führte zu einer Suppression des Koloniewachstums. Aus diesem Grund bestand der letzte Schritt dieser Arbeit in dem Versuch, stabil *H-REV107-2* und stabil *MUC18* exprimierende Klone der Zelllinie A27/80 herzustellen. Dazu wurden A27/80 Zellen mit *pcH-REV107-2*, *pcMUC18* und mit *pcEGFP* als Negativ-Kontrolle transfiziert (siehe Punkt 2.7.1.). Von den mit *pcH-REV107-2* und *pcMUC18* transfizierten Zellen wurden je zehn Kolonien, von der Negativ-Kontrolle *pcEGFP* fünf Kolonien isoliert (siehe Punkt 2.8.) und expandiert (siehe Punkt 2.1.). Von den *H-REV107-2*

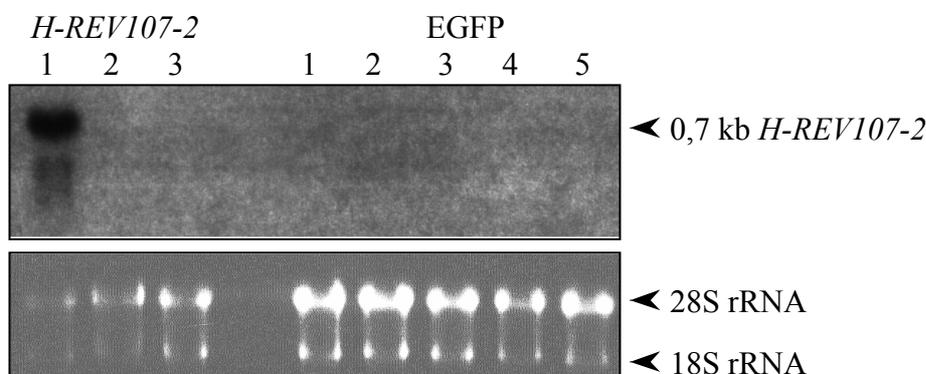


Abbildung 13: Northern Blot Hybridisierung der RNA aus selektionierten *H-REV107-2* bzw. EGFP exprimierenden A27/80 Klone mit einer *H-REV107-2* cDNA-Probe. Nur in einem Klon konnte eine *H-REV107-2* Expression auf RNA- Ebene nachgewiesen werden. 28S bzw. 18S rRNA = 28S bzw. 18S ribosomale RNA als Ladungskontrolle.

Klonen gelang die Expansion bei drei der zehn Ansätze. Die Zellen der restlichen sieben Ansätze haben das Wachstum eingestellt. Ihre Zellzahl war zu gering um Gesamt-RNA zu isolieren. Bei den *MUC18* Klonen gelang die Expansion von vier Ansätzen. Die restlichen sechs Ansätze haben ebenfalls das Wachstum eingestellt. Die Anzucht und Expansion der jeweils zugehörigen fünf EGFP Klone war problemlos möglich. Nach Anzucht der Zellen in ausreichender Menge wurde ein Teil davon in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus dem restlichen Zellmaterial wurde Gesamt-RNA isoliert, Northern Blots angefertigt (siehe Punkt 2.3.) und die Blots anschließend mit der *H-REV107-2* oder der *MUC18* Sonde hybridisiert (siehe Punkt 2.4.4.). Nur im ersten der drei *H-REV107-2* Klone konnte eine *H-REV107-2* Expression auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Die Klone 2 und 3 waren negativ. In den EGFP Klonen 1–5 zeigte sich erwartungsgemäß keine *H-REV107-2* Expression (siehe Abbildung 13). In den vier *MUC18*

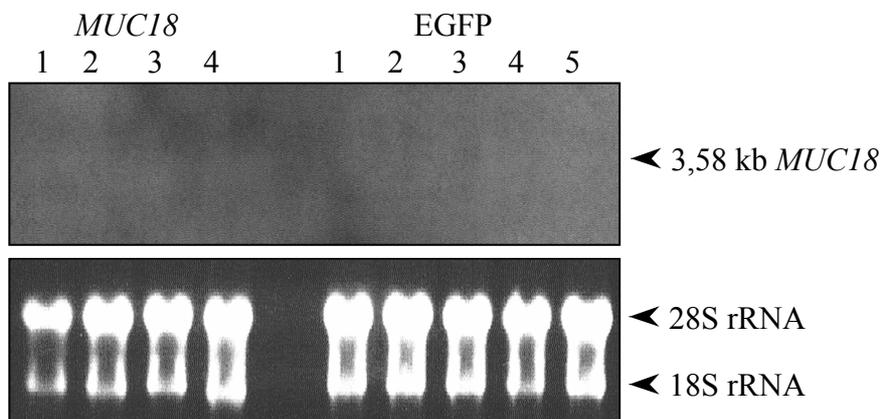


Abbildung 14: Northern Blot Hybridisierung der RNA aus selektionierten *MUC18* bzw. EGFP exprimierenden A27/80 Klone mit dem 1014bp PvuII-PvuII *MUC18* cDNA-Fragment. In keinem der erzeugten Klone konnte eine *MUC18* Expression auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. 28S bzw. 18S rRNA = 28S bzw. 18S ribosomale RNA als Ladungskontrolle.

Klonen war es nicht möglich, eine *MUC18* Expression auf mRNA-Ebene nachzuweisen. Wie im vorhergehenden Versuch waren die EGFP Klone erwartungsgemäß negativ für eine *MUC18* Expression (siehe Abbildung 14). In diesem Experiment ist es nicht gelungen, stabile, *MUC18* exprimierende Klone der Ovarialkarzinom-Zelllinie A27/80 zu erzeugen.