

# Topographische und funktionelle Charakterisierung des putativen Chaperons fls485

Von der Medizinischen Fakultät  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin genehmigte  
Dissertation

vorgelegt von

**Verena Anna Sophia Simon**

aus

**Bocholt**

Berichter: Herr Universitätsprofessor Dr. med. Nikolaus Gäßler  
Herr Privatdozent Dr. med. Konrad Streetz

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2011

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

# Inhaltsverzeichnis

|          |                                                                                                                                                                                                                     |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>                                                                                                                                                                                                   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Aufbau und Funktion des menschlichen Dünndarms . . . . .                                                                                                                                                            | 1         |
| 1.1.1    | Die histologische Gliederung der Dünndarmschleimhaut . . . . .                                                                                                                                                      | 1         |
| 1.1.2    | Die Krypten-Zotten-Achse . . . . .                                                                                                                                                                                  | 2         |
| 1.1.3    | Die Genregulation und deren Einfluss auf die Liniendifferenzierung . .                                                                                                                                              | 4         |
| 1.2      | Chaperone - Struktur, Funktion und ihre Bedeutung für die Zelldifferenzierung                                                                                                                                       | 8         |
| 1.2.1    | Die Familie der Chaperone und ihre Funktionen im Zellstoffwechsel .                                                                                                                                                 | 9         |
| 1.2.2    | Die Struktur der Chaperone . . . . .                                                                                                                                                                                | 10        |
| 1.2.3    | Das putative Chaperon fls485 . . . . .                                                                                                                                                                              | 11        |
| 1.3      | Zielsetzung . . . . .                                                                                                                                                                                               | 12        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden</b>                                                                                                                                                                                        | <b>13</b> |
| 2.1      | Material . . . . .                                                                                                                                                                                                  | 13        |
| 2.1.1    | Geräte . . . . .                                                                                                                                                                                                    | 13        |
| 2.1.2    | Verbrauchsmaterialien und Glaswaren . . . . .                                                                                                                                                                       | 14        |
| 2.1.3    | Chemikalien und Lösungsmittel . . . . .                                                                                                                                                                             | 15        |
| 2.1.4    | Puffer und Lösungen . . . . .                                                                                                                                                                                       | 17        |
| 2.1.5    | Molekularbiologische Kits und Reagenzien . . . . .                                                                                                                                                                  | 23        |
| 2.1.6    | Primer . . . . .                                                                                                                                                                                                    | 25        |
| 2.1.7    | Antikörper . . . . .                                                                                                                                                                                                | 25        |
| 2.1.8    | Zellkulturmedien und Zusatzstoffe . . . . .                                                                                                                                                                         | 26        |
| 2.1.9    | Zelllinien und Gewebe . . . . .                                                                                                                                                                                     | 28        |
| 2.1.10   | Software . . . . .                                                                                                                                                                                                  | 30        |
| 2.2      | Zellbiologische und Biochemische Methoden . . . . .                                                                                                                                                                 | 31        |
| 2.2.1    | Kultivierung der murinen Fibroblastenzelllinie 3T3-NIH, der humanen Pankreaskarzinomzelllinie Capan-1, der humanen Colonkarzinomzelllinien CaCo2 und LoVo und der humanen Bronchialkarzinomzelllinie H446 . . . . . | 31        |
| 2.2.2    | Kryokonservierung und Rekultivierung von eingefrorenen Zellen . . .                                                                                                                                                 | 31        |
| 2.2.3    | Erzeugung von transienten und stabilen Transfektanten humaner Zelllinien . . . . .                                                                                                                                  | 32        |
| 2.2.4    | Zellzahlbestimmung mittels elektronischer Zählgeräte . . . . .                                                                                                                                                      | 33        |

|          |                                                                                                       |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.5    | Erstellung einer Wachstumskurve . . . . .                                                             | 33        |
| 2.2.6    | Apoptoseassay . . . . .                                                                               | 34        |
| 2.2.7    | Immunhistochemie . . . . .                                                                            | 35        |
| 2.2.8    | Immunfluoreszenz (Immunzytochemie) . . . . .                                                          | 36        |
| 2.2.9    | Elektronenmikroskopische Aufarbeitung und Immunogoldtechnik . . .                                     | 36        |
| 2.3      | Molekularbiologische Methoden . . . . .                                                               | 37        |
| 2.3.1    | RNA-Isolation aus Gewebe und Zellen mittels Tri-Reagenz . . . . .                                     | 37        |
| 2.3.2    | DNA-Isolation aus Zellen mittels Qiagen-Kit . . . . .                                                 | 38        |
| 2.3.3    | Photospektrometrische RNA- und DNA-Quantifizierung . . . . .                                          | 38        |
| 2.3.4    | Erststrang-cDNA-Synthese mittels reverser Transkription . . . . .                                     | 39        |
| 2.3.5    | RealTime-PCR mittels IQ5 . . . . .                                                                    | 39        |
| 2.3.6    | Klassische PCR zur Testung der Leertransfektanten . . . . .                                           | 40        |
| 2.3.7    | Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten im Agarose-Gel                                       | 40        |
| 2.4      | Proteinchemische Methoden . . . . .                                                                   | 41        |
| 2.4.1    | Proteinisolation aus Gewebe und Zellen mittels Tri-Reagenz . . . . .                                  | 41        |
| 2.4.2    | Herstellung von Zellkulturlysaten für den Western Blot mit Laemmli-Puffer . . . . .                   | 41        |
| 2.4.3    | Proteinquantifizierung mittels BioRad D <sub>C</sub> Protein-Assay (nach Lowri)                       | 42        |
| 2.4.4    | Immunpräzipitation mit Ni-NTA Säulen von Qiagen zur Proteinaufreinigung . . . . .                     | 42        |
| 2.4.5    | Diskontinuierliche SDS-PAA-Gelelektrophorese . . . . .                                                | 43        |
| 2.4.6    | Western Blot-Analyse und Chemilumineszenz-Detektion . . . . .                                         | 43        |
| 2.4.7    | 2D-Gelelektrophorese und Visualisierung mittels Syproruby . . . . .                                   | 44        |
| 2.5      | Statistische Berechnungen . . . . .                                                                   | 45        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b>                                                                                     | <b>46</b> |
| 3.1      | Charakterisierung von fls485 . . . . .                                                                | 46        |
| 3.1.1    | Validierung des fls485-Antikörpers #7/1 mittels 2D-Gelelektrophorese und Immunpräzipitation . . . . . | 46        |
| 3.1.2    | Immunhistochemische Färbungen an paraffinfixiertem Normalgewebe                                       | 47        |
| 3.1.3    | Immunhistochemische Färbungen an paraffinfixierten (neuro-) endokrinen Neoplasien . . . . .           | 48        |
| 3.1.4    | Semiquantitative Analyse der fls485-Expression an kryokonserviertem Gewebe . . . . .                  | 51        |
| 3.1.5    | Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von fls485 mittels Immunfluoreszenz . . . . .             | 52        |
| 3.1.6    | Elektronenmikroskopische Darstellung der subzellulären Verteilung von fls485 . . . . .                | 53        |

|          |                                                                                                                                                           |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2      | Forcierte fls485-Überexpression mittels stabiler Transfektion der Pankreaskarzinomzelllinie Capan-1 und der murinen Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 . . . . | 54        |
| 3.2.1    | Charakterisierung der 3T3- und Capan-1-Leerklone auf DNA-Ebene .                                                                                          | 55        |
| 3.2.2    | Charakterisierung der 3T3- und Capan-1-Vollklone auf RNA-Ebene .                                                                                          | 56        |
| 3.2.3    | Charakterisierung ausgewählter fls485-Voll- und Leervektortransfektanten auf Proteinebene mittels Westernblotanalyse und Immunfluoreszenz . . . . .       | 57        |
| 3.2.4    | Darstellung intrazellulärer Strukturen der Transfektanten mittels Elektronenmikroskopie . . . . .                                                         | 61        |
| 3.3      | Ergebnisse der funktionellen <i>in vitro</i> Experimente . . . . .                                                                                        | 62        |
| 3.3.1    | Wachstumsverhalten der stabilen Transfektanten . . . . .                                                                                                  | 62        |
| 3.3.2    | Apoptoseverhalten der stabilen Transfektanten . . . . .                                                                                                   | 63        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion</b>                                                                                                                                         | <b>65</b> |
| 4.1      | Aktueller Stand der Forschung . . . . .                                                                                                                   | 66        |
| 4.1.1    | Studienlage zum putativen Chaperon fls485 . . . . .                                                                                                       | 66        |
| 4.1.2    | Genomische Aberrationen in der Pathogenese neuroendokriner Tumoren                                                                                        | 67        |
| 4.2      | Untersuchungsergebnisse im Kontext der aktuellen Methodik zur Proteomanalyse . . . . .                                                                    | 69        |
| 4.2.1    | Antikörpervalidierung . . . . .                                                                                                                           | 69        |
| 4.2.2    | Topographische Analyse . . . . .                                                                                                                          | 72        |
| 4.2.3    | Transiente und stabile Transfektion als etablierte <i>in vitro</i> Modelle . .                                                                            | 75        |
| 4.2.4    | Funktionelle Analyse . . . . .                                                                                                                            | 77        |
| 4.3      | Ausblick . . . . .                                                                                                                                        | 78        |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung</b>                                                                                                                                    | <b>79</b> |
|          | <b>Literaturverzeichnis</b>                                                                                                                               | <b>81</b> |
|          | <b>Abkürzungsverzeichnis</b>                                                                                                                              | <b>87</b> |
|          | <b>Danksagung</b>                                                                                                                                         | <b>90</b> |
|          | <b>Erklärung Datenaufbewahrung</b>                                                                                                                        | <b>91</b> |



# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau und Funktion des menschlichen Dünndarms

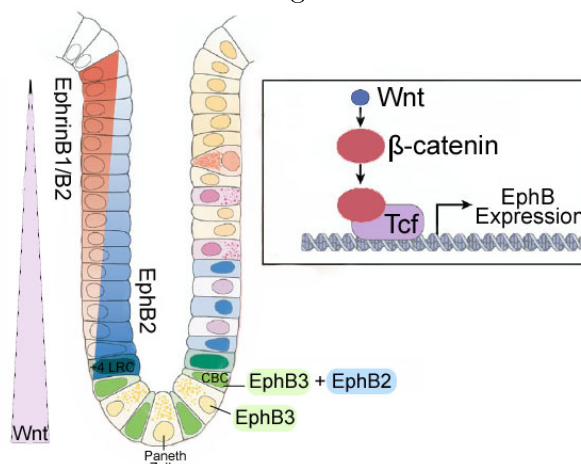
Der menschliche Dünndarm ist der flächenmäßig größte Teil des Gastro-Intestinalsystems. Seine drei Anteile, der Zwölffingerdarm (*Duodenum*), der Leerdarm (*Jejunum*) und der Krummdarm (*Ileum*), liegen überwiegend intraperitoneal und dienen der Verdauung und Resorption der über die Nahrung aufgenommenen Nährstoffe. Um diese Aufgabe den entsprechenden Bedürfnissen des Stoffwechsels anpassen zu können, ist eine maximale Vergrößerung der Resorptionsfläche nötig. Man schätzt, dass durch die Struktur der Dünndarmschleimhaut mit ihren Falten, Krypten, Zotten und Mikrovilli und der Gesamtlänge des Dünndarms von 3-6m eine Oberfläche von 100-200 m<sup>2</sup> erreicht werden. Zusätzlich erfüllt der Dünndarm eine wesentliche Aufgabe in der Immunabwehr, da bereits in den Lymphfollikeln der Dünndarmschleimhaut, den sogenannten Peyer'schen Plaques, eindringende Erreger eliminiert werden und das Immunsystem aktiviert wird [1].

### 1.1.1 Die histologische Gliederung der Dünndarmschleimhaut

Die Dünndarmschleimhaut (*Mucosa*) stellt die innerste Lage der Wandschichtung dar. Durch eine *Submucosa* von den beiden Hauptmuskelschichten des Dünndarmes, der Ring- und Längsmuskelschicht, und dem den Darm umgebenden visceralen Peritoneum (*Serosa*), getrennt, ist sie wiederum in mehrere Schichten untergliedert, deren Aufbau zum Verständnis der folgenden Abschnitte kurz erläutert wird. Die innerste Schicht der Mucosa bildet das *Epithel*, welches im Dünndarm ein einschichtiges Zylinderepithel ist und durch seine Haftkomplexe (*tight junctions*) eine Barrierefunktion aufweist. Darauf folgt eine gut vaskularisierte und innervierte Bindegewebsschicht (*Lamina propria mucosae*), die neben Lymphkapillaren außerdem viele freie Zellen der Immunabwehr enthält. Die letzte Schicht der Mucosa ist eine glatte Muskelzellschicht (*Lamina muscularis mucosae*), die der Schleimhaut eine eigene Motilität verleiht. Die für den Dünndarm typischen Zotten (*Villi intestinales*) sind Erhebungen des Epithels und der Lamina propria der Mucosa, während die bis zur Lamina muscularis mucosae hineinragenden Krypten (*Glandulae intestinales*, *Lieberkühn Drüsen*) Einsenkungen des Epithels darstellen und ihre Mündungen an den Basen der Zotten haben. Im unteren Anteil der Krypten sind undifferenzierte Stammzellen anzutreffen, die den Ursprung der vielen unterschiedlichen Zelltypen in der Mucosa bilden [2].

### 1.1.2 Die Krypten-Zotten-Achse

Ein geläufiger Begriff bei der Beschreibung der Mucosadifferenzierung ist der der *Krypten-Zotten-Achse* (KZA). Damit ist gemeint, dass die Reifung, Funktionsausübung und letztlich die Apoptose der unterschiedlichen Zelltypen im Mucosaepithel entlang des Kryptengrundes bis zur Zottenspitze verläuft. Die undifferenzierten multipotenten Stammzellen im unteren Kryptenteil haben das Potential, sich zu jedem der verschiedenen Epithelzelltypen zu entwickeln. Dabei findet zunächst ein reger asymmetrischer Teilungsprozess der Stammzellen am Kryptengrund statt, bei dem man die Entstehung von zwei verschiedenen Vorläuferzellen, den sekretorischen und den absorptiven Progenitorzellen, unterscheidet. Aus den sekretorischen Zellen entwickeln sich *Becherzellen*, *enteroendokrinen Zellen* und *Paneth-Körnerzellen*, die absorptiven Zellen differenzieren zu *Enterozyten* [4]. Im Anschluss an die Mitosephase wandern die noch unreifen Zellen bis zur Kryptenmündung, wo sie ihre endgültige Spezifität erreichen. Unter Ausübung ihrer Funktion als ausdifferenzierte Zellen gelangen die nachfolgend beschriebenen Enterozyten, Becherzellen und enteroendokrinen Zellen innerhalb von 4-5 Tagen bis zur Zottenspitze und werden schließlich nach erfolgter Apoptose ins Darmlumen abgeworfen. Die Paneth-Körnerzellen wandern zum Kryptengrund und



**Abbildung 1.1:** Gradient des Wnt-Signalweg entlang der KZA (modifiziert nach [3])

üben dort über einen Zeitraum von etwa 3 Wochen ihre Funktion aus [4]. Dieser Prozess wird zum Großteil über den  $\beta$ -catenin/T-cell factor (TCF) abhängigen Wnt-Signalweg gesteuert, der neben Differenzierung und Proliferation der heranreifenden Zellen auch deren Lokalisation innerhalb der Krypten-Zotten-Achse beeinflusst. Anhand der Grafik 1.1 lässt sich nachvollziehen, dass die Aktivierung über den Wnt-Signalweg eine vermehrte Ephrin B-Rezeptor-Expression bewirkt. Isoformen des Ephrin B und der Ephrin B-Rezeptoren weisen daher ebenfalls wie die Aktivität des Wnt-Signalwegs einen Gradienten entlang der Krypten-Zotten-Achse auf. Je weiter Enterozyten, Becherzellen und enteroendokrine Zellen von der Krypte entfernt sind, desto geringer ist die Aktivität des Wnt-Signalwegs und damit die Expression des Ephrin-B2-Rezeptors. Hierdurch steigt reflektorisches die Konzentration der Ephrin-B-Rezeptor-Liganden Ephrin B1 und B2, wodurch sichergestellt wird, dass diese Zellen entlang des Gradienten zur Zotte aufwärts wandern. Die Paneth-Körnerzellen hingegen exprimieren nur Ephrin B3 und verbleiben daher am Grund der Krypte [3, 5].

Ein Faktor, der an der Apoptose der entdifferenzierten Zellen an der Zottenspitze beteiligt ist, ist das TRAIL/TRAIL-Rezeptor-System im Zusammenspiel mit einem zunehmenden

Ein Faktor, der an der Apoptose der entdifferenzierten Zellen an der Zottenspitze beteiligt ist, ist das TRAIL/TRAIL-Rezeptor-System im Zusammenspiel mit einem zunehmenden

Gradienten der *Acyl-Coenzym A Synthetase 5 (ACSL5-fl)* und deren Splicevariante *ACSL5-Δ20* (ACSL5-fl/ACSL5-Δ20). TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) gehört zur Familie der Tumor-Nekrosefaktor (TNF) Zytokine und ist in der Lage, vor allem über den TRAIL-Rezeptor-1 die Apoptose der ausdifferenzierten Zellen zu induzieren. Nachweisen ließ sich dies einerseits anhand einer zunehmenden TRAIL-Expression mit fortschreiten der Differenzierung der Zellen, weshalb TRAIL auch als Differenzierungsmarker der Darmmukosa betrachtet wird [6]. Andererseits konnte ein ansteigender ACSL5-fl/ACSL5-Δ20-Gradient entlang der Krypten-Zotten-Achse nachgewiesen werden, der eine Sensibilisierung von ACSL5-fl-dominierten ACSL5-Δ20 exprimierenden Enterozyten für das TRAIL/TRAIL-Rezeptor-1-System bewirkt und somit zur Apoptoseinduktion beiträgt [7].

Zu den Funktionen der ausdifferenzierten Zellen der Darmschleimhaut zählen schließlich die letzten Schritte der Verdauung und Resorption der Nährstoffe durch spezielle Transportsysteme der Enterozyten, deren Oberfläche am apikalen Pol durch *Mikrovilli* vergrößert ist, die Sekretion von Muzinen durch die Becherzellen und die enzymatische Spaltung von Bakterienzellwänden durch Lysozym der azidophilen Granula von Paneth-Körnerzellen. Daneben erfüllen die enteroendokrinen Zellen eine Vielzahl von Aufgaben über parakrine und endokrine Hormonsekretion, welche im folgenden Abschnitt beschrieben werden. Die enteroendokrinen Zellen sind außerdem Bestandteil des Gastro-entero-pankreatischen-(GEP-)endokrinen Systems und machen mit mindestens 15 verschiedenen Zelltypen ca. 1% aller Zellen im Dünndarmepithel aus [3, 4].

### Disseminierte endokrine Zellen

Das GEP-System beschreibt eine Subpopulation der disseminierten endokrinen Zellen, welche einzeln oder in kleinen Gruppen in vielen Organsystemen des Körpers vorkommen und je nach Lokalisation und Funktion unterschiedlich benannt werden. Eine Gemeinsamkeit dieser hormonproduzierenden Zellklasse ist ihre Fähigkeit, biogene Amine wie Serotonin, Histamin oder Gastrin aufzunehmen und weiter zu verarbeiten, weshalb man auch den Überbegriff *APUD-System* (*amine precursor uptake and decarboxylation*) verwendet. Aufgrund der Vermutung, dass viele dieser Zellen ihren Ursprung im Ektoderm haben, und der Tatsache, dass einige der von ihnen sezernierten Hormone auch als Botenstoffe im ZNS fungieren (*Neuropeptide*) ist auch die Bezeichnung des *Diffusen neuroendokrinen System (DNES)* gebräuchlich. Die Hypothese der ektodermalen Herkunft wurde aber bereits wieder verlassen und man geht davon aus, dass die enteroendokrinen Zellen sich ebenfalls aus den intestinalen Stammzellen der Krypten entwickeln [8]. Nichtsdestotrotz sezernieren disseminierte endokrine Zellen Neuron-spezifische Proteine wie Chromogranin A, Synaptophysin oder Neuronenspezifischer Enolase (NSE), welche zum Beispiel zum immunhistochemischen Nachweis dieser Zellen genutzt werden. Tumoren, die aus diesen Zellen entstehen und in dieser Arbeit näher untersucht werden, werden nach ihrer Differenzierung unterschiedlich benannt [2, 9]. Die TNM-/UICC-Nomenklatur von 2010 verwendet als Oberbegriff den des *neuroendokri-*

*nen Tumors*. Hierunter fallen drei Kategorien: Der gut differenzierte neuroendokrine Tumor oder auch *Karzinoid*, das gut differenzierte neuroendokrine Karzinom oder auch *atypisches Karzinoid* und das schlecht differenzierte neuroendokrine Karzinom, welches je nach Lokalisation klassifiziert wird (z.B. auch Insulinom, Gastrinom)[10]. Die neue WHO-Klassifikation gastrointestinaler Tumoren bezeichnet neuroendokrine Läsionen aufgrund ihrer Differenzierung als neuroendokrine Tumoren (gut bis mittelgradig differenziert (G1, bzw. G2)) oder als neuroendokrine Karzinome (schlecht differenziert (G3)). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das UICC-System favorisiert, da die WHO 2010 lediglich preliminär die Nomenklatur für den Gastrointestinaltrakt festlegt. Für diese Arbeit von Bedeutung sind vor allem einige Zellen des GEP-endokrinen Systems, welche in nachfolgender Tabelle zusammengefasst werden.

**Tabelle 1.1:** Zellen des GEP-endokrinen Systems [2]

| ZELL<br>TYP      | LOKALISATION                            | HORMON            | WIRKUNG                                                  |
|------------------|-----------------------------------------|-------------------|----------------------------------------------------------|
| A                | Inselorgan des Pankreas                 | Glucagon          | Blutzuckerspiegel ↑                                      |
| B                | Inselorgan des Pankreas                 | Insulin           | Blutzuckerspiegel ↓                                      |
| D                | Inselorgan des Pankreas,<br>Magen, Darm | Somato-<br>statin | Hemmung endokriner Zellen                                |
| EC <sup>1</sup>  | Inselorgan des Pankreas,<br>Magen, Darm | Serotonin         | Darmpmotilität ↑                                         |
| ECL <sup>2</sup> | Magen                                   | Histamin          | Magensäureproduktion ↑                                   |
| G                | Magen, Darm                             | Gastrin           | ECL-Zell-Stimulation                                     |
| I                | Darm                                    | CCK <sup>3</sup>  | Gallenblasenkontraktion ↑, Pankreas-<br>enzymsekretion ↑ |
| K                | Darm                                    | GIP <sup>4</sup>  | Magensäureproduktion ↓, Insulinfrei-<br>setzung ↑        |
| L                | Darm                                    | GLP <sup>5</sup>  | Insulinfreisetzung ↑                                     |
| S                | Darm                                    | Sekretin          | Gallen- und Bikarbonatsekretion ↑                        |

<sup>1</sup>Enterochromaffin, <sup>2</sup>Enterochromaffin-like, <sup>3</sup>Cholezystokinin, <sup>4</sup>Gastric inhibitory peptide,

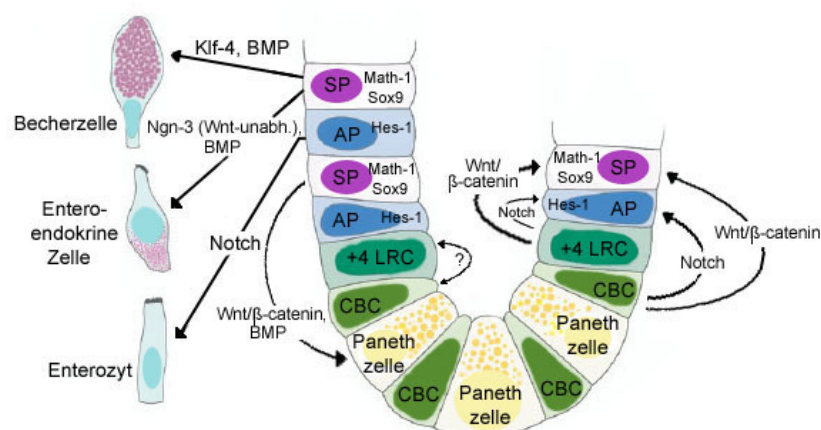
<sup>5</sup>Glucagon-like peptide

### 1.1.3 Die Genregulation und deren Einfluss auf die Liniendifferenzierung

Bei der Betrachtung der vielen verschiedenen Zelltypen im Dünndarmepithel stellt sich die Frage, wie genau die Steuerung der Entwicklung von der undifferenzierten Stammzelle zur hochspezialisierten Epithelzelle vonstatten geht. Wie in der Zellbiologie seit langem bekannt ist, werden diese Prozesse in den Organsystemen unseres Körpers durch eine differentielle

Genregulation gesteuert, die sowohl von intrinsischen als auch von extrinsischen Signalen abhängt [11, 12]. Die Forschung ist auf dem Gebiet der intestinalen Epitheldifferenzierung augenblicklich sehr aktiv, da immer noch viele Abläufe ungeklärt sind. Eine neuere Erkenntnis ist, dass das Genexpressionsprofil nicht nur in den verschiedenen Progenitorzellen der Darmschleimhaut Unterschiede aufweist und so deren Differenzierung steuert. Auch entlang der Krypten-Zotten-Achse wurde festgestellt, dass Gene, die einen Einfluss auf die Zellzyklus-Progression, die RNA-Prozessierung und die Proteinbiosynthese haben, vor allem in den kryptennahen Regionen nachweisbar sind, während Gene, die den Aufbau des Zytoskeletts und die Expression von verschiedenen Transportsystemen steuern, gehäuft in den Zellen der Zottenregion anzutreffen sind [13, 14]. Daher können repräsentativ für das dadurch jeweils veränderte Proteom Differenzierungsmarker wie die *alkalische Phosphatase* und der Lipid- und Fettsäuretransporter *LFABP* vermehrt in der Zottenspitze, und Proliferationsmarker wie *Sox-9*, *Hes-1* und *PCNA* (*proliferating cell nuclear antigen*) vor allem im Kryptengrund nachgewiesen werden [13, 15]. So scheint die komplexe Funktionsweise der Dünndarmschleimhaut vor allem über Transkriptionsprozesse gelenkt zu werden.

Ein weiterer Fortschritt der letzten Jahre ist die Identifizierung einiger Signaltransduktionswege und Moleküle, die entscheidenden Einfluss auf die endgültige Differenzierung der verschiedenen Zelltypen zu nehmen scheinen. So wurde z.B. erkannt, dass neben dem Wnt-Signalweg die Signaltransduktion des Zelloberflächenproteins Notch und der BMP-Signalweg eine entscheidende Rolle in der endokrinen Differenzierung gastrointestinaler Stammzellen spielen [11]. Ein weiterer bekannter Regulator der intestinalen Entwicklung ist das Homeobox-Genprodukt *Cdx2*. *Cdx2* steuert als Transkriptionsfaktor die Expression von *Sucrase-Isomaltase*, deren Konzentrationsspiegel mit zunehmender Reifung des Darmepithels ansteigt und demnach als ein direkter Parameter für die intestinale Differenzierung anerkannt ist [16, 17].



**Abbildung 1.2:** Signaltransduktionswege in der KZA. Aus den putativen intestinalen Stammzellen +4 LRC (*label-retaining cell*) & CBC (*cryptbase columnar cell*) differenzieren sich über verschiedene Signalwege sekretorische (SP) und absorptive (AP) Progenitorzellen (modifiziert nach [3]).

Grafik 1.2 gibt einen Überblick darüber, welche Signalwege und deren Effektormoleküle Auswirkungen auf die Differenzierung der vier verschiedenen Zelltypen haben. Der  $\beta$ -catenin/T-cell factor (TCF) abhängige Wnt-Signalweg bewirkt neben der Kompartimentalisation der intestinalen Zellen (vgl. Grafik 1.1) eine Differenzierung von intestinalen Stammzellen zu den tripotenten sekretorischen Progenitorzellen. Diese sind wiederum in der Lage, sich zu Paneth-Körnerzellen, enteroendokrinen Zellen oder Becherzellen zu differenzieren. In Vorläuferzellen, die sich zu enteroendokrinen Zellen entwickeln, ist der Notch-Signalweg inaktiv, wodurch die Expression von proendokrinen basic helix-loop-helix (bHLH) Proteinen wie Math1, Neurogenin-3 (Ngn-3) und BETA-2 möglich wird. Dieser erste Schritt in der Differenzierung zur enteroendokrinen Zelle führt wiederum über bislang noch ungeklärte Weise zu einer Aktivierung des Notch-Signalweges in den benachbarten Zellpopulationen, wie zum Beispiel den absorptiven Progenitorzellen (AP), wodurch über das Effektormolekül *Hes-1* eine endokrine Entwicklung dieser Zellen gehemmt wird und das typische disseminierte Verteilungsmuster der endokrinen Zellen im Gastrointestinaltrakt entsteht [11]. Das Math1- und Wnt-Zielmolekül *Sox-9* hingegen, welches in sekretorischen Vorläuferzellen vorliegt, spielt über den BMP- und den  $\beta$ -catenin/TCF abhängigen Wnt-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung zu Paneth-Körnerzellen. So scheint es für jede sekretorische Zelllinie einen spezifischen Transkriptionsfaktor zu geben: *Klf-4* induziert die Differenzierung zur Becherzelle, *Neurogenin-3* führt zur Entwicklung von enteroendokrinen Zellen und *Sox-9* und  $\beta$ -catenin lassen Paneth-Körnerzellen entstehen. Die Differenzierung zum Enterozyten erfolgt hauptsächlich über einen negativen Regulationsmechanismus: Durch die Expression von *Hes-1* im aktiven Notch-Signalweg wird Math1 inhibiert und somit die Entstehung einer absorptiven Progenitorzelle induziert, welche sich schließlich zu einem reifen Enterozyten differenziert [8].

### Das Genexpressionsprofil der Zellen des GEP-endokrinen Systems

Die bislang bekannten Vorgänge der komplexen Differenzierungsabläufe in der Dünndarmschleimhaut machen deutlich, dass es wahrscheinlich noch viele unerkannte Mechanismen gibt, die diese Abläufe regulieren. Betrachtet man allein die Population der ca. 15 verschiedenen gastro-entero-pankreatischen-endokrinen Zelltypen, stellt sich die Frage, wie die Proliferation und Differenzierung dieser Zellklasse gesteuert wird. Dabei ist zu beachten, dass diese Zellen ein für jeden Zelltypen charakteristisches Verteilungs- und Sekretionsmuster nicht nur entlang der Krypten-Zotten-Achse, sondern auch entlang der proximal-distalen Darmachse von oral nach anal aufweisen [13]. Hieraus wird deutlich, dass die Genexpressionsprofile sich über den Differenzierungsprozess hinweg ändern müssen, um dieser Aufgabe nachkommen zu können. Durch Studien in transgenen Mäusen wurde erkannt, dass es dabei Zellpopulationen gibt, die bis zu einem gewissen Reifungsstadium ein gemeinsames Genexpressionsprofil aufweisen [9]. So konnte zum Beispiel das Hormon *Peptid YY* als einer der ersten Marker neuroendokriner Differenzierung in Inselzellen des Pankreas, ebenso wie der

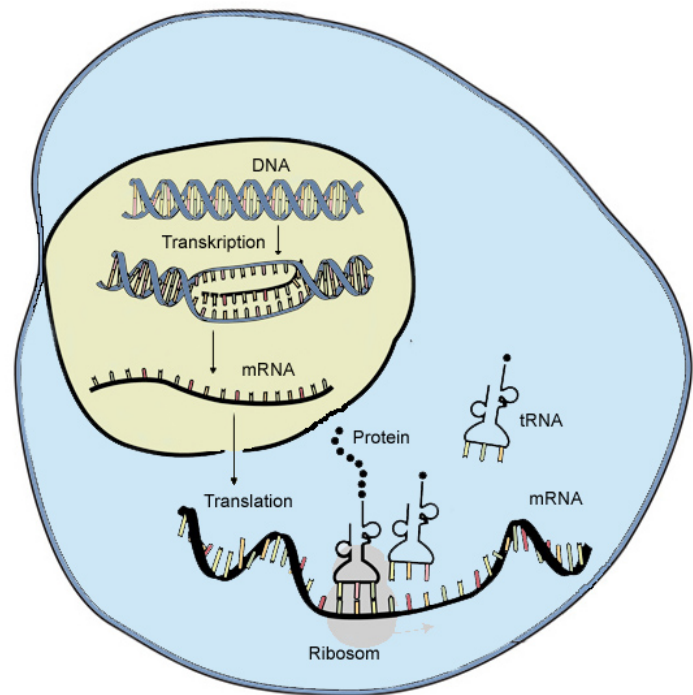
Transkriptionsfaktorenkomplex *BETA2/NeuroD* in Vorläuferzellen der S- und I-Zellen im Dünndarm nachgewiesen werden [18]. Doch scheint die gemeinsame Steuerung der Genregulation bereits in einem viel früheren Stadium zu beginnen: In der fetalen Entwicklung der Pankreas- und Duodenalanlage konnte in Mäusen durch ein gezieltes Ausschalten des Homeoboxgens *pdx1* gezeigt werden, dass die für den Gendefekt homozygoten Nachkommen kein Pankreas und ein nur unterentwickeltes Duodenum mit rarifizierten enteroendokrinen Zellen aufwiesen [9]. Hieraus wird zum einen ersichtlich, dass *pdx1* eines von vielen regulierenden Genen der endokrinen Differenzierung zu sein scheint, zum anderen stellt sich die Frage, inwiefern sich die einzelnen Zelltypen des GEP-endokrinen Systems aus gemeinsamen Vorläuferzellen entwickeln. Bei den enteroendokrinen Zellen ist bereits bekannt, dass man zwei Vorläuferzelltypen unterscheiden muss: Die eine Gruppe produziert in einem frühen Entwicklungsstadium sowohl Peptid YY, Neurotensin, Glucagon als auch Cholezystokinin, während die andere Gruppe Serotonin und Substanz P sezerniert. Ebenfalls wurde beobachtet, dass es serotonerge Zellen (EC-Zellen) gibt, die bis zu einem bestimmten Zeitpunkt ihrer Differenzierung und abhängig von ihrer Lokalisation über den *BETA2/NeuroD*-Signalweg das Hormon Sekretin coexprimieren. Erst ab einem gewissen Entwicklungsstadium lassen sich dann die verschiedenen Zelltypen (vgl. Absatz 1.1.2) anhand ihrer entgeltigen Hormonsekretion unterscheiden [9]. Doch das Genexpressionsprofil enteroendokriner Zellen ist nicht nur abhängig von deren Lokalisation und Differenzierungsgrad, sondern auch von externen Bedingungen wie der Nahrungszusammensetzung oder chronischen Darmerkrankungen wie Zöliakie, M. Crohn oder Colitis ulcerosa [9, 19]. Eine interessante Beobachtung dabei ist, dass die Anzahl enteroendokriner Zellen in Dünndarmgewebe mit diesen Erkrankungen erhöht ist, wobei je nach Erkrankung verschiedene Zelltypen gehäuft anzutreffen sind. Eine Gemeinsamkeit hierbei ist jedoch die gesteigerte Expression von *pS2* durch die endokrinen Zellen. *pS2* ist ein Peptid der trefoil factor Familie (TFF), welches normalerweise in intestinalen Becherzellen und Magenschleimhautzellen exprimiert wird und in Ratten Potential zum Schutz und zur Heilung von verletzter Darmmukosa zeigt [20, 21]. Diese Anpassung der Genexpression an die pathologischen Bedingungen scheint ein Kompensationsmechanismus auf die gestörte Redoxaktivität der Darmmukosa, speziell bei der Zöliakie, und der damit verbundenen Überproduktion freier Radikale zu sein [22].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Genexpressionsprofile der GEP-endokrinen Zellen zu verschiedenen Zeiten der Differenzierung Ähnlichkeiten ausweisen, welche für eine Entwicklung aus gemeinsamen Progenitorzellen sprechen. Ebenfalls ist die Genexpression abhängig von der Lokalisation der Zelle, da zum Beispiel ausdifferenzierte Zellen der gleichen Progenitorzellen im Ileum andere Gene transkribieren als diejenigen des Pankreas [9]. Daneben spielen auch pathologische Prozesse der Darmmukosa wie Zöliakie oder CED (chronisch entzündliche Darmerkrankungen) und nutritive Faktoren eine wichtige Rolle bei der Dynamik der Genregulation [9, 19].

## 1.2 Chaperone - Struktur, Funktion und ihre Bedeutung für die Zelldifferenzierung

Jeder Reifungs- und Differenzierungsprozess in eukaryotischen Zellen basiert auf Steuerungsmechanismen, die über verschiedene Mediatormoleküle eine veränderte Expression von Genen und deren Produkten bewirken [23]. Nachdem in den vorherigen Abschnitten auf einige der verschiedenen Signalwege und deren Moleküle im Hinblick auf die Differenzierung der intestinalen Mukosazellen eingegangen wurde, soll nun, nach einem kurzen Überblick über die generellen Abläufe in der Zelle während dieser Prozesse, auf eine bestimmte Stoffklasse, die *Chaperone*, und ihre Rolle in dieser Arbeit eingegangen werden.

Um ein bestimmtes Effektormolekül, zum Beispiel ein Enzym wie die ACSL5 (vgl. Abschnitt 1.1.2), in der Zelle synthetisieren zu können, muss zunächst die DNA desjenigen Gens, welches für die ACSL5 codiert, im Zellkern vom entsprechenden Chromosomenabschnitt abgelesen oder auch *transkribiert* werden. Die Transkription selbst wird über verschiedene Transkriptionsfaktoren initiiert, welche an der *Promotorregion* des abzulesenden Gens binden und so die Transkription starten. Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel der T-Zell-abhängige Faktor (TCF) im Wnt-Signalweg (vgl. Abschnitt 1.1.2) werden über eine komplexe Signaltransduktionskaskade aktiviert, die ihren Aus-



**Abbildung 1.3:** Transkription und Translation in der eukaryoten Zelle (modifiziert nach [24])

gangspunkt meist in einer Liganden-Rezeptor-Interaktion an der Zelloberfläche hat. Das Transkriptionsprodukt, die *messenger RNA (mRNA)*, wird nun nach einigen Stabilisierungsvorgängen aus dem Zellkern heraustransportiert und kann dann an den Ribosomen des Zytoplasmas *translatiert* werden. Bei der Translation werden jeweils 3 der von der DNA transkribierten komplementären Basen (*Basentriplett*) abgelesen und von der sogenannten *transfer RNA (tRNA)* erkannt. Die tRNA ist an die entsprechende Aminosäure gekoppelt, für die das jeweilig von der mRNA abgelesene Basentriplett codiert. Wird die mRNA nun Schritt für Schritt abgelesen, entsteht nach und nach eine Aminosäurekette, die *Primärsequenz* des Proteins, welches im Endzustand als Effektormolekül fungiert, zum Beispiel als

Enzym (ACSL5) (vgl. Grafik 1.3).

Bis dahin müssen allerdings noch einige Prozesse ablaufen, um eine intakte Funktionsweise des Proteins sicherzustellen. Diese *posttranslationalen Modifikationen* umfassen zum einen die exakte Faltung des Proteins in seine Tertiärstruktur und eventuelle Konjugationen mit anderen Substanzen wie zum Beispiel Zucker, zum anderen die Versendung an seinen Bestimmungsort innerhalb oder außerhalb der Zelle. An dieser Stelle haben nun die Chaperone eine wichtige Bedeutung für den geregelten Ablauf des Zellstoffwechsels.

### 1.2.1 Die Familie der Chaperone und ihre Funktionen im Zellstoffwechsel

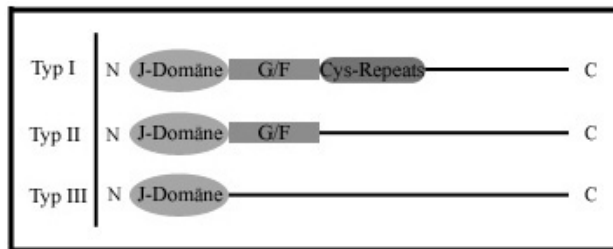
Es gibt mehrere Chaperon-Familien, von denen die größte die *DnaJ/Hsp40-Familie* mit 41 (putativen) Mitgliedern ist [25]. Daneben gibt es die *DnaK/Hsp70-Familie*, deren Funktion eng mit der der DnaJ/Hsp40-Familie verknüpft ist [26]. Ursprünglich erforscht wurden Chaperone an dem Bakterium *E. coli* und an verschiedenen Hefepilzen, daher ist die Nomenklatur mit Entdeckung der humanen Homologe etwas kompliziert geworden. Das humane Äquivalent des Chaperons DnaJ, das unter anderem in Bakterien entdeckt wurde, ist das *heat shock protein 40 (Hsp40)* oder auch *humanes DnaJ-Homolog 1 (Hdj1)*. Ebenso ist DnaK prokaryotischen Ursprungs, und sein humanes Homolog wird als *heat shock protein 70 (Hsp70)* bezeichnet. Wie die Namen der humanen Chaperone Hsp40 und Hsp70 vermuten lassen, kann die Biosynthese von Chaperonen neben den konstitutiv in der Zelle vorhandenen Chaperonen auch durch äußere Einflüsse wie Hitzestress induziert werden [27, 28].

Diese Erkenntnis ist konkordant mit den Aufgaben dieser Stoffklasse, da sie für die korrekte Proteinfaltung, -transport und -degradierung in der Zelle verantwortlich sind. Bei Zellstress durch Hitze, Bestrahlung, Erkrankungen oder auch Medikamente kommt es zum einen zu einer gesteigerten Proteinsynthese im Rahmen der Regeneration, zum anderen fallen vermehrt pathologisch veränderte Proteine in der Zelle an, die nun abgebaut werden müssen. Funktioniert dieser Abbauprozess nicht mehr, kommt es zu Ablagerungen der defekten Proteine in der Zelle, wie zum Beispiel das  $\beta$ -Amyloid ( $\tau$ -Protein) bei Morbus Alzheimer. Ebenso ist eine korrekte Faltung der Proteine nach ihrer Synthese am Ribosom essentiell, da nicht nur die primäre Aminosäuresequenz der Proteine entscheidend für ihre spätere Funktionsweise ist, sondern auch ihre Sekundär- (u.a.  $\beta$ -Faltblatt oder  $\alpha$ -Helices) und Tertiärstruktur [26]. Nach der von den Chaperonen unterstützten Faltung müssen die Proteine schließlich noch an ihre Ziellokalisation gelangen. Handelt es sich um ein zytosolisches Effektormolekül, wird das Protein primär an freien Ribosomen des Zytoplasmas synthetisiert und auch direkt hier freigegeben. Soll das Protein hingegen in Vesikeln verpackt zur Zelloberfläche transportiert oder als hydrolytisches Protein im Lysosom gespeichert werden, geschieht die Proteinbiosynthese durch Ribosomen, die am *endoplasmatischen Retikulum (ER)* gebunden vorliegen und ihr Protein direkt in das ER hinein synthetisieren. Dadurch erscheint das ER

in der elektronenmikroskopischen Ansicht höckerig oder auch rau, weshalb es als *raues ER* (*rER*) bezeichnet wird (vgl. Abbildung 3.22). Desweiteren lässt sich daraus ableiten, dass Chaperone in vielen verschiedenen Zellkompartimenten wie dem Zellkern, dem rER und dem Zytoplasma vorliegen müssen, um überall Proteinsynthese, -transport und -abbau steuern zu können [25, 26]. Neben der Verteilung der Chaperone in der Zelle ist für einige Vertreter unter ihnen auch beschrieben worden, dass ihre Aktivität durch den Redox-Status der Zelle bedingt wird. Das *heat shock protein 33* (*Hsp33*), welches bislang nur in Prokaryoten und einzelligen Eukaryoten nachgewiesen werden konnte, kann über einen Redoxsensor am C-terminalen Ende Veränderungen des Redoxstatus der Zelle wahrnehmen und durch eine Konformationsänderung seine Aktivität und Stabilität den Gegebenheiten anpassen [29, 30].

### 1.2.2 Die Struktur der Chaperone

Da die DnaJ/Hsp40-Familie die größte Familie der Chaperone darstellt, sollen nun anhand deren Struktur die Charakteristika und Funktionsweise der Chaperone erläutert werden. Die DnaJ/Hsp40-Chaperone werden abhängig von ihren Domänen unterteilt in 3 verschiedene Typen: Typ I, der die gesamte *J-Domäne* mit der Glycin-/Phenylalanin-reichen Region, *G/F-Domäne*, und der distal davon ge-



**Abbildung 1.4:** Typen der DnaJ-Chaperone

da sie die Bindung und Regulation anderer Chaperone, den Isoformen des DnaK/Hsp70, ermöglichen. Daher soll kurz auf die Ultrastruktur dieser Domänen eingegangen werden:

Die **Cystein-reiche Region** enthält viermal das *-CXXCXGXG-Motiv* und kann ihre Tertiärstruktur nur über die Bindung von zwei Zinkionen einnehmen. Dadurch entstehen zwei Zinkfinger-Motive, die eine Tasche mit einem hydrophoben Kern formen. Diese Tasche fungiert als Proteinbindungsdomäne bei der Interaktion zwischen Hsp40 und Hsp70. Ebenso wird das enthaltene *-CXXC-Motiv* als ein spezifisches Motiv für Mitglieder der Thiol-Disulfid Oxidoreduktasen angesehen, was neben der Chaperonfunktion für eine enzymatische Aktivität der DnaJ/Hsp40-Chaperone spricht [31, 32].

Die **J-Domäne** am N-terminalen Ende des Proteins besteht aus 70 Aminosäuren und zählt zu den am höchsten konservierten Domänen der DnaJ/Hsp40-Chaperone, weshalb die Zugehörigkeit eines Proteins zu dieser Familie auch über das Vorhandensein der J-Domäne definiert ist. Die Domäne selbst besteht aus 4  $\alpha$ -Helices, deren antiparallele Helices II und III eine Fingerstruktur bilden. Diese Fingerstruktur enthält das *HPD-Motiv*,

eine Aminosäuresequenz aus Histidin, Prolin und Aspartat. Nach Bindung von Hsp70 an Hsp40 über die Cystein-reiche Region induziert das HPD-Motiv von Hsp40 die Adenosin-Triphosphatase(ATPase)-Aktivität von Hsp70. Durch Hydrolyse des Adenosintriphosphats entsteht Adenosindiphosphat, welches eine Transformationsänderung des Hsp70 von der offenen zur geschlossenen Struktur bewirkt. Dadurch wird das von Hsp70 gebundene Substrat, i.e. das zu faltende Protein, fester an Hsp70 gebunden und kann so korrekt gefaltet werden. Demnach sind die DnaJ/Hsp40-Chaperone funktionell als Co-Chaperone der DnaK/Hsp70-Chaperone anzusehen [25].

Die **G/F-Region** besteht aus 30-40 Aminosäuren mit gehäuftem Vorkommen von Glycin und Phenylalanin. Ihre Funktion scheint die Unterstützung der Proteinbindung an Hsp70 zu sein, wobei die G/F-Region dafür nur nötig ist, wenn Hsp70 kein Substrat gebunden hat [33]. Das C-terminale Ende der DnaJ/Hsp40-Chaperone ist in dieser Familie nur halb so stark konserviert wie der N-Terminus und daher noch nicht so gut untersucht [26].

### 1.2.3 Das putative Chaperon fls485

Ein im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführter Genchip-Array aus mikrodisezierten Enterozyten der Krypten-Zotten-Achse konnte das Gen *fls485* als eines der 415 vornehmlich in den oberen Abschnitten der KZA exprimierten Gene nachweisen [22]. Davor war fls485 erstmals in einer cDNA-Sammlung beschrieben worden, die aus mRNA von fetalem Lebergewebe gewonnen worden war [22, 34]. Das Gen fls485 (LOC51006; C3orf32) ist auf Chromosom 3p25.3 lokalisiert und enthält mindestens drei offene Leserahmen. Daher wird angenommen, dass es verschiedene Translationsprodukte mit unterschiedlichen Funktionen geben könnte, wobei der Schwerpunkt auf ein Produkt von ca. 39kDa Größe gelegt wird [22]. Aufgrund der engen Beziehung des Gens fls485 zum Genlocus des *uveal melanoma susceptibility locus (UVM2)* auf Chromosom 3p25 wurde fls485 auch als mögliches Tumorsuppressorgen im Kontext mit Aderhautmelanomen diskutiert [34].

Weshalb fls485 in diesem Zusammenhang relevant wurde, ergibt sich aus der Sequenzanalyse des humanen fls485-Proteins: Das Protein fls485 enthält einige der oben beschriebenen chaperonspezifischen Domänen, die eine nähere Untersuchung des Proteins hinsichtlich seiner Funktion und Lokalisation in der Krypten-Zotten-Achse interessant werden lassen.

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 136 | Met | Phe | Gln | Glu | Asp | Thr | Arg | Lys | Phe | Gln | Val | Pro | His | Ser | Ser | 150 |
| 151 | Leu | Val | Lys | Glu | Cys | His | Lys | Cys | His | Gly | Arg | Gly | Arg | Tyr | Lys | 165 |
| 166 | Cys | Ser | Gly | Cys | His | Gly | Ala | Gly | Thr | Val | Arg | Cys | Pro | Ser | Cys | 180 |
| 181 | Cys | Gly | Ala | Lys | Arg | Lys | Ala | Lys | Gln | Ser | Arg | Arg | Cys | Gln | Leu | 195 |
| 196 | Cys | Ala | Gly | Ser | Gly | Arg | Arg | Arg | Cys | Ser | Thr | Cys | Ser | Gly | Arg | 210 |
| 211 | Gly | Asn | Lys | Thr | Cys | Ala | Thr | Cys | Lys | Gly | Glu | Lys | Lys | Leu | Leu | 225 |
| 226 | His | Phe | Ile | Gln | Leu | Val | Ile | Met | Trp | Lys | Asn | Ser | Leu | Phe | Glu | 240 |

**Abbildung 1.5:** Auszug aus der AS-Sequenz des putativen Chaperons fls485 (NP\_057015)

In Grafik 1.5 ist ein Ausschnitt der Aminosäuresequenz des 353 Aminosäuren langen Proteins

fls485 dargestellt. Die gezeigte Sequenz umfasst die 4 chaperonspezifischen -CXXCXGXG-Motive, die von den Exonen 4, 5 und 6 codiert und auch als *zinc finger-like Domänen* bezeichnet werden. Das für DnaJ/Hsp40-Chaperone charakteristische HPD-Motiv der J-Domäne konnte nicht erfasst werden, weshalb fls485 per definitionem nicht zu dieser Chaperonfamilie zählen kann (vgl. Abschnitt 1.2.2). Nichtsdestotrotz gibt die Aminosäuresequenz Anhaltspunkte für eine putative Aktivität von fls485 als Chaperon und möglicherweise auch auf eine Zugehörigkeit zur Thiol-Disulfid Oxidoreduktase-Familie.

## 1.3 Zielsetzung

Die Steuerung von Differenzierungsprozessen in der Krypten-Zotten-Achse des menschlichen Dünndarms und die Auswirkungen von Fehlfunktionen innerhalb diesen Systems sind bislang nur zu kleinen Teilen bekannt. Neben vielen exogenen Faktoren spielen vor allem die beteiligten Signaltransduktionswege (vgl. Abschnitt 1.1.3) und ihre fehlerfreie Ausführung in der Zelle eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung zur gesunden Darmschleimhaut, aber auch bei der Entstehung von tumorösen und entzündlichen Veränderungen. Wichtig für die korrekte Ausführung sind hierbei u.a. die Mitglieder der Chaperon-Familien, die für die Synthese und den Transport funktionsfähiger Effektormoleküle und auch deren Abbau mitverantwortlich sind. Da Chaperone über bestimmte Domänen innerhalb ihrer Aminosäuresequenz charakterisiert sind und das in dieser Arbeit untersuchte Protein fls485 einige dieser Domänen aufweist, stellt sich die Frage, welche Funktion fls485 in der Zelle ausübt, wo genau es lokalisiert ist und ob es zu den Differenzierungsprozessen der Krypten-Zotten-Achse beiträgt.

Fls485 wurde bislang erst in zwei Publikationen beschrieben: Zum einen als potentielles Tumorsuppressorgen bei der Entstehung von Aderhautmelanomen [34], zum anderen hinsichtlich seiner Expression in der Krypten-Zotten-Achse und der Beteiligung an der Pathogenese von Zöliakie [22]. Die Datenlage zur exakten Gewebe-, bzw. Zellspezifität und zur Funktion von fls485 ist also noch sehr lückenhaft und soll durch diese Arbeit um neue Erkenntnisse diese Aspekte betreffend ergänzt werden.

Die Charakterisierung des putativen Chaperons fls485 wurde über zwei Ansätze vorgenommen: Auf der einen Seite sollte die topographische Verteilung untersucht, d.h. nach Auffälligkeiten in der Gewebespezifität und der subzellulären Lokalisation von fls485 gesucht werden, um darüber gegebenenfalls erste Rückschlüsse auf die mögliche Funktion von fls485 ziehen zu können. Auf der anderen Seite sollten erste funktionelle Untersuchungen vorgenommen werden, die weitere Anhaltspunkte über die Aufgabe von fls485 ergeben könnten. Hierfür sollten nicht nur *in vitro* Experimente an nativen Zelllinien, die molekularbiologisch eine fls485-Expression zeigten, durchgeführt, sondern stabile fls485-Transfektanten erzeugt werden, die eine dauerhafte Überexpression von fls485 zeigen und daher als passendes Modell für funktionelle Analysen verwendet werden können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

| GERÄT                                                        | FIRMA                       |
|--------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Autoklav (Fedegari AutoclaviSPA)                             | Biomedis, (D)               |
| Blotkammer                                                   | CTI GmbH, (D)               |
| Brutschrank (20% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> , 37°C) | Heraeus/Kendro, Düsseldorf  |
| Casy 1                                                       | Schärfe System, Reutlingen  |
| Entwässerungsautomat Path Center                             | Thermo Electron, (D)        |
| Feinwaage                                                    | Sartorius, (D)              |
| Fluoreszenzmikroskop                                         | Typhoon, (D)                |
| Fluoreszenzscanner                                           | Typhoon, (D)                |
| Gewebemixer Ultra Turrax                                     | IKA Labortechnik, (D)       |
| Geldokumentationsgerät                                       | Roth, Karlsruhe             |
| Gelgießstation (PAA-Gele)                                    | BioRad, München             |
| Heizplatte                                                   | IKA Labortechnik, (D)       |
| Horizontale Elektrophorese-Apparatur                         | Serva, Heidelberg           |
| IQ5 (RealTimePCR-Gerät)                                      | BioRad, München             |
| Kryokonservierungsgerät (Nicoool LM 10)                      | Air Liquide, (F)            |
| Megafuge 1.0 (Rotor: BS4402/A)                               | Heraeus/Kendro, Düsseldorf  |
| NanoPhotometer                                               | IMPLEN, (D)                 |
| Optimax Röntgenfilmentwickler                                | Protec Medizintechnik, (D)  |
| pH-Meter                                                     | Schott Instruments, (D)     |
| Pipettus-akku                                                | Hirschmann Laborgeräte, (D) |
| Pipetten (10µl, 100µl, 200µl, 1000µl)                        | Eppendorf, Hamburg          |
| Reinraumwerkbank Hera Safe                                   | Heraeus/Kendro, Düsseldorf  |
| Rotationsmikrotom                                            | Leica, (D)                  |
| Spannungsgeber für Polyacrylamidgele                         | BioRad, München             |

|                                               |                          |
|-----------------------------------------------|--------------------------|
| Spannungsgeber für Agarosegele                | Serva, Heidelberg        |
| Stickstofftank                                | Air Liquide, (F)         |
| Taumelschüttler (silent rocker)               | CTI GmbH, (D)            |
| Thermomixer compact                           | Roth, Karlsruhe          |
| Ultraschallhomogenisator (Sonoplus)           | Bandelin electronic, (D) |
| Vertikale Elektrophorese-Apparatur            | BioRad, München          |
| Vortex                                        | Heidolph, (D)            |
| Wärmeschrank                                  | Heraeus, Düsseldorf      |
| Wasserbad                                     | GFL, Burgwedel           |
| Zentrifuge (hochtourig, bis 25000rpm)         | Kendro, Düsseldorf       |
| Zentrifuge ohne Kühlung (für Eppendorfgefäße) | Heraeus, Düsseldorf      |
| Zentrifuge mit Kühlung (für Eppendorfgefäße)  | Eppendorf, Hamburg       |

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Glaswaren

| MATERIAL                                             | FIRMA                       |
|------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Deckgläser                                           | Langenbrinck, Emmendingen   |
| Einbettkassetten                                     | Roth, Karlsruhe             |
| Einmal-Spritze 2ml                                   | Becton Dickinson, Karlsruhe |
| Erlenmeyerkolben                                     | Schott, Mainz               |
| Falconröhrchen 15ml, 50ml                            | Becton Dickinson, Karlsruhe |
| Gel Blotting-Papier                                  | Whatman, (D)                |
| Gewebekulturflaschen (T75, T25)                      | Greiner bio-one, (F)        |
| Gewebepetrischalen ( $10\text{cm}^2$ )               | Becton Dickinson, Karlsruhe |
| Glasplatten dünn (7,5 x 10cm)                        | BioRad, München             |
| Glasplatten (mit 1.0mm Spacer, 8,3 x 10cm)           | BioRad, München             |
| Glockenfilter $0,2\mu\text{m}$                       | Sartorius, (D)              |
| Handschuhe (powder-free)                             | SemperMed, (D)              |
| Immobilon-P Transfer Membranen                       | Millipore GmbH, (D)         |
| Kanülen BD Microlance 27G 19mm                       | Becton Dickinson, Karlsruhe |
| Kodak BioMax Light Film                              | Sigma-Aldrich, Steinheim    |
| Kryoröhrchen, 2ml                                    | Roth, Karlsruhe             |
| Multiwell-Platten Flachboden (6er, 12er, 24er, 96er) | Becton Dickinson, Karlsruhe |

|                                                         |                             |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Multiwell-Platten Rundboden (96er)                      | Becton Dickinson, Karlsruhe |
| Multiwell-Platten high profile (96er) für IQ5           | BioRad, München             |
| Objektträger                                            | Langenbrinck, Emmendingen   |
| Pasteurpipetten                                         | Brand, Wertheim             |
| Perfusorspritze, 50ml                                   | Braun, (D)                  |
| Pipetten, 10ml, 25ml                                    | Costar, (D)                 |
| Pipettenspitzen (10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l) | NerbePlus, (D)              |
| Probenbecher für Casy 1                                 | Schärfe System, Reutlingen  |
| Reaktionsgefäß (1,5ml, 2ml)                             | Eppendorf, Hamburg          |
| Skalpell zum Einmalgebrauch                             | PFM, Köln                   |

### 2.1.3 Chemikalien und Lösungsmittel

| CHEMIKALIE, LÖSUNGSMITTEL          | FIRMA                  |
|------------------------------------|------------------------|
| 6-Aminohexansäure                  | Roth, Karlsruhe        |
| Aceton                             | Apotheke des UK Aachen |
| Ammoniumpersulfat                  | Roth, Karlsruhe        |
| Aqua ad injectabile                | Delta Select, (D)      |
| $\beta$ -Mercaptoethanol           | Merck, Darmstadt       |
| Bleicitrat (Ultrastain II)         | Laurylab, (F)          |
| Borsäure                           | Roth, Karlsruhe        |
| Bromphenolblau                     | Sigma, Steinheim       |
| BSA                                | Sigma, Steinheim       |
| Chloroform, minimum 99%            | Sigma, Steinheim       |
| Coomassie Brilliant Blue-R250      | Sigma, Steinheim       |
| DAB                                | Sigma, Steinheim       |
| Dinatriumhydrogenphosphat          | Roth, Karlsruhe        |
| DTT                                | Sigma, Steinheim       |
| EDTA                               | Serva, Heidelberg      |
| Entwickler G153 für Cunix 60 Gerät | AGFA, (D)              |
| Ethanol (vergällt)                 | KMF Otichem, (D)       |
| Ethanol (p.a.)                     | Roth, Karlsruhe        |
| Fixierer G354                      | AGFA, (D)              |
| Formaldehyd (Formalin)             | Roth, Karlsruhe        |
| Glutaraldehyd 25%                  | Agar scientific, (UK)  |
| Glycerinatingelatine (Kaiser´s)    | Sigma, Steinheim       |

|                                       |                             |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| Glycin                                | Roth, Karlsruhe             |
| Guanidin-Hydrochlorid                 | Roth, Karlsruhe             |
| Hämalaun                              | Roth, Karlsruhe             |
| HBSS                                  | PAA, Cölbe                  |
| HCl                                   | Roth, Karlsruhe             |
| HEPES                                 | Sigma, Steinheim            |
| Isopropanol (vergällt)                | KMF Otichem, (D)            |
| Isopropanol, p.a.                     | Sigma, Steinheim            |
| Kaliumchloride                        | Merck, Darmstadt            |
| Kaliumdihydrogenphosphat              | Roth, Karlsruhe             |
| Leupeptin                             | Sigma, Steinheim            |
| L-Glutamine/Penstrep                  | PAA, Cölbe                  |
| Methanol                              | Apotheke des UK Aachen      |
| Milchpulver                           | Roth, Karlsruhe             |
| NaOH                                  | Roth, Karlsruhe             |
| Natriumazid reinst                    | Serva, Heidelberg           |
| NaCl                                  | Merck, Darmstadt            |
| Normal horse serum                    | Sigma, Steinheim            |
| PBS-Tablette                          | Gibco BRL, (UK)             |
| Penicillin/Streptomycin (100x)        | PAA, Cölbe                  |
| PMSF                                  | Sigma, Steinheim            |
| Propylenoxid                          | Serva, Heidelberg           |
| Protease Inhibitor Cocktail Tabletten | Roche, Mannheim             |
| Rotiphorese Gel 30                    | Roth, Karlsruhe             |
| Samplebuffer Laemmli 2x conc.         | Sigma, Steinheim            |
| SDS                                   | Serva, Heidelberg           |
| Sucrose                               | Sigma, Steinheim            |
| Temed                                 | Roth, Karlsruhe             |
| Thiourea                              | Sigma, Steinheim            |
| Tri Reagent (Triton X 100)            | Sigma, Steinheim            |
| Tris                                  | Roth, Karlsruhe             |
| Trypsin 2,5%                          | Gibco/Invitrogen, Karlsruhe |
| Tween 20                              | Serva, Heidelberg           |
| Uranylacetat (Ultrostain I)           | Laurylab, (F)               |
| Urea                                  | Roth, Karlsruhe             |

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

Nicht aufgeführte Puffer und Lösungen werden entsprechend im Methodenteil beschrieben.

#### Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie

**Tabelle 2.1:** Citratpuffer pH 6 (AG-Retrieval)

| KOMPONENTE                | VOLUMEN/MENGE |
|---------------------------|---------------|
| Citronensäure-Monohydrat  | 0,378g        |
| Trinatriumcitrat-Dihydrat | 2,41g         |
| A.bidest                  | 1000ml        |

**Tabelle 2.2:** TBS, Waschpuffer pH 7,5

| KOMPONENTE | VOLUMEN/MENGE |
|------------|---------------|
| 1M Tris    | 20ml          |
| 5M NaCl    | 30ml          |
| A.bidest   | 950ml         |

**Tabelle 2.3:** Blockinglösung (Endogene Peroxidase)

| KOMPONENTE               | VOLUMEN/MENGE |
|--------------------------|---------------|
| Wasserstoffperoxid (30%) | 7ml           |
| A.dest.                  | 63ml          |

**Tabelle 2.4:** Blockinglösung (Serumblock)

| KOMPONENTE               | VOLUMEN/MENGE |
|--------------------------|---------------|
| TBS                      | 10ml          |
| Milchpulver              | 0,1g          |
| Normal Horse Serum (NHS) | 1ml           |

**Tabelle 2.5:** ABC-Lösung

| KOMPONENTE | VOLUMEN/MENGE |
|------------|---------------|
| TBS        | 5ml           |
| Lösung A   | 90 $\mu$ l    |
| Lösung B   | 90 $\mu$ l    |

**Tabelle 2.6:** DAB-Lösung

| KOMPONENTE                           | VOLUMEN/MENGE |
|--------------------------------------|---------------|
| Tris-Aminomethan                     | 0,3g          |
| A.bidest                             | 50ml          |
| Rühren, auf pH 7,6 einstellen        |               |
| DAB                                  | 3 Tabletten   |
| 30min lichtgeschützt rühren, filtern |               |
| Wasserstoffperoxid (30%)             | 15 $\mu$ l    |

**Tabelle 2.7:** Häkalaun-Färbelösung

| KOMPONENTE                      | VOLUMEN/MENGE |
|---------------------------------|---------------|
| Hämatoxilin                     | 1g            |
| In 1l A.dest auflösen           |               |
| Natriumjodat                    | 0,2g          |
| Aluminiumkaliumsulfat           | 50g           |
| Zugeben und gut auflösen        |               |
| Chloraldehyd                    | 50g           |
| Citronensäure                   | 1g            |
| Gut lösen und Lösung filtrieren |               |

## Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenz

**Tabelle 2.8:** PBS

| KOMPONENTE                                           | VOLUMEN/MENGE |
|------------------------------------------------------|---------------|
| KCl                                                  | 2,24g         |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 2,04g         |
| NaCl                                                 | 80,06g        |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O | 11,57g        |
| A.bidest                                             | 1000ml        |

## Puffer und Lösungen für die Proteinisolation

**Tabelle 2.9:** 0,3mM Guanidin-Hydrochlorid in 95% EtOH

| KOMPONENTE            | VOLUMEN/MENGE |
|-----------------------|---------------|
| Guanidin-Hydrochlorid | 5,73g         |
| 100% (v/v) EtOH       | 190ml         |
| A.bidest              | 10ml          |

**Tabelle 2.10:** 7,5M Urea/1,8mM DTT

| KOMPONENTE                                              | VOLUMEN/MENGE |
|---------------------------------------------------------|---------------|
| Urea                                                    | 30g           |
| DTT                                                     | 0,385g        |
| A.bidest                                                | 50ml          |
| Kurz vor Gebrauch mit Protease-Inhibitor (7x) versetzen |               |

## Puffer und Lösungen für PAGE und Westernblot Analyse

**Tabelle 2.11:** 2xLSB

| KOMPONENTE               | VOLUMEN/MENGE |
|--------------------------|---------------|
| 86% (v/v) Glycerin       | 5,81ml        |
| SDS                      | 1,5g          |
| 4x Upper Tris            | 6,25ml        |
| $\beta$ -Mercaptoethanol | 2,5ml         |
| 100mM PMSF               | 0,5ml         |
| Bromphenolblau           | 1ml           |
| A.bidest                 | 8,94ml        |

**Tabelle 2.12:** 4x Upper Tris Buffer (für PAA-Gele)

| KOMPONENTE                                              | VOLUMEN/MENGE |
|---------------------------------------------------------|---------------|
| Tris                                                    | 60,57g        |
| A.bidest                                                | 1l            |
| 10% (w/v) SDS                                           | 40ml          |
| Vor Zugabe von SDS pH 6,8 mit rauchender HCl einstellen |               |

**Tabelle 2.13:** 4x Lower Tris Buffer (für PAA-Gele)

| KOMPONENTE                                             | VOLUMEN/MENGE |
|--------------------------------------------------------|---------------|
| Tris                                                   | 181,71g       |
| A.bidest                                               | 1l            |
| 10% (w/v) SDS                                          | 40ml          |
| Vor Zugabe von SDS pH 8,8 mit HCl oder NaOH einstellen |               |

**Tabelle 2.14:** Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels (PAA)

| KOMPONENTE          | TRENNGEL     |              | SAMMELGEL  |
|---------------------|--------------|--------------|------------|
|                     | 7,5%         | 10%          | 4,6%       |
| A.bidest            | 9,9ml        | 8,2ml        | 8,7ml      |
| 4x LT               | 5,0ml        | 5,0ml        | -          |
| 4x UT               | -            | -            | 3,8ml      |
| Rotiphorese-Gel PAA | 5,0ml        | 6,6ml        | 2,3ml      |
| TEMED               | 25,2 $\mu$ l | 25,2 $\mu$ l | 60 $\mu$ l |
| 10% (w/v) APS       | 90 $\mu$ l   | 120 $\mu$ l  | 90 $\mu$ l |

**Tabelle 2.15:** 10x LE-Puffer (Laufpuffer)

| KOMPONENTE                 | VOLUMEN/MENGE |
|----------------------------|---------------|
| Tris                       | 30,2g         |
| Glycin                     | 144g          |
| A.bidest                   | 1l            |
| pH 8,8 mit NaOH einstellen |               |

**Tabelle 2.16:** Anodenpuffer I (Western Blot)

| KOMPONENTE | VOLUMEN/MENGE |
|------------|---------------|
| Tris       | 36,5g         |
| A.bidest   | 1l            |

**Tabelle 2.17:** Anodenpuffer II (Western Blot)

| KOMPONENTE | VOLUMEN/MENGE |
|------------|---------------|
| Tris       | 365g          |
| A.bidest   | 1l            |

**Tabelle 2.18:** Kathodenpuffer (Western Blot)

| KOMPONENTE        | VOLUMEN/MENGE |
|-------------------|---------------|
| Tris              | 30,2g         |
| 6-Aminohexansäure | 50,25g        |
| A.bidest          | 1l            |

**Tabelle 2.19:** Blockingpuffer (Western Blot)

| KOMPONENTE  | VOLUMEN/MENGE |
|-------------|---------------|
| Milchpulver | 5g            |
| TBST        | 100ml         |

**Tabelle 2.20:** TBST (Waschpuffer)

| KOMPONENTE                    | VOLUMEN/MENGE |
|-------------------------------|---------------|
| 1M Tris                       | 100ml         |
| 5M NaCl                       | 150ml         |
| Tween 20                      | 2,5ml         |
| Mit A.bidest auf 1l auffüllen |               |

**Tabelle 2.21:** Stripping-Puffer (Western Blot)

| KOMPONENTE               | VOLUMEN/MENGE |
|--------------------------|---------------|
| PBS                      | 30ml          |
| 5% (w/v) SDS             | 20ml          |
| $\beta$ -Mercaptoethanol | 348 $\mu$ l   |

## Puffer und Lösungen zur Visualisierung von Proteinen mittels Coomassie

**Tabelle 2.22:** Coomassie-Färbelösung für PVDF-Membranen

| KOMPONENTE               | VOLUMEN/MENGE |
|--------------------------|---------------|
| Coomassie Brilliant Blue | 0,2g          |
| Methanol                 | 40ml          |
| Eisessig                 | 2ml           |
| A.bidest                 | 58ml          |

**Tabelle 2.23:** Entfärbelösung für gefärbte PVDF-Membranen

| KOMPONENTE | VOLUMEN/MENGE |
|------------|---------------|
| Methanol   | 500ml         |
| Eisessig   | 10ml          |
| A.bidest   | 490ml         |

### Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

**Tabelle 2.24:** 50x TBE

| KOMPONENTE                            | VOLUMEN/MENGE |
|---------------------------------------|---------------|
| Tris                                  | 108g          |
| Borsäure                              | 55g           |
| EDTA (0,5M, pH 8)                     | 40ml          |
| 1l A.bidest zufügen und autoklavieren |               |

### Puffer und Lösungen für die 2D-Gelelektrophorese

**Tabelle 2.25:** Rehydrierungspuffer (Dige 2x Sample Buffer)

| KOMPONENTE                     | VOLUMEN/MENGE |
|--------------------------------|---------------|
| Urea                           | 7M            |
| Thiourea                       | 2M            |
| Chaps                          | 2%            |
| frisch vor Gebrauch hinzufügen |               |
| DTT                            | 7mg           |
| Pharmalytes                    | 50 $\mu$ l    |
| Bromphenolblau                 | 2,5 $\mu$ l   |

**Tabelle 2.26:** Equilibrierungspuffer

| KOMPONENTE                    | VOLUMEN/MENGE |
|-------------------------------|---------------|
| 0,5M Tris-HCL ph 6,8          | 50ml          |
| Urea                          | 360g          |
| Glycerin                      | 306ml         |
| 20% SDS                       | 100ml         |
| mit A.bidest auf 1l auffüllen |               |

**Tabelle 2.27:** Elektrophoresepuffer (10x)

| KOMPONENTE                    | VOLUMEN/MENGE |
|-------------------------------|---------------|
| 20% SDS                       | 250ml         |
| Tris                          | 150g          |
| Glycin                        | 720g          |
| mit A.bidest auf 5l auffüllen |               |

**Tabelle 2.28:** Gradientengele

| KOMPONENTE          | VOLUMEN/MENGE<br>FÜR 9% | VOLUMEN/MENGE<br>FÜR 18% |
|---------------------|-------------------------|--------------------------|
| 1,5M Tris-HCL pH8,8 | 119ml                   | 119ml                    |
| 20% SDS             | 2,4ml                   | 2,4ml                    |
| 30% PAA             | 145ml                   | 290ml                    |
| A.bidest            | 207ml                   | 62ml                     |
| TEMED               | 241 $\mu$ l             | -                        |
| 10% APS             | 1212 $\mu$ l            | 606 $\mu$ l              |

**Tabelle 2.29:** Syproruby-Färbelösung

| KOMPONENTE | VOLUMEN/MENGE |
|------------|---------------|
| Methanol   | 10ml          |
| Essigsäure | 10ml          |
| Syproruby  | 80ml          |

### 2.1.5 Molekularbiologische Kits und Reagenzien

#### Reagenzien für die cDNA-Synthese, RealTime-PCR und Gelelektrophorese

| REAGENZ, KIT                         | FIRMA                    |
|--------------------------------------|--------------------------|
| SuperScriptIII Reverse Transcriptase | Invitrogen, Karlsruhe    |
| Oligo-(dT)20-Primer                  | Invitrogen, Karlsruhe    |
| dNTP-Mix (10mM)                      | Fermentas, (D)           |
| Protector RNase Inhibitor            | Roche, Mannheim          |
| IQ5 SYBR-Green Mastermix             | BioRad, München          |
| Lox molecular weight DNA Ladder      | New England Biolabs, USA |
| Loading Dye 6x                       | New England Biolabs, USA |

## Reagenzien zur Messung der Proteinkonzentration, für PAGE, Western Blot und 2D-Gelelektrophorese

| REAGENZ, KIT                            | FIRMA                   |
|-----------------------------------------|-------------------------|
| BioRad Dc Protein Assay Reagent A       | BioRad, München         |
| BioRad Dc Protein Assay Reagent B       | BioRad, München         |
| BioRad Dc Protein Assay Reagent S       | BioRad, München         |
| Rainbow molecular weight marker RPN 800 | Amersham Bioscience, UK |
| Pierce ECL Western Blotting Substrate   | PIERCE, Bonn            |
| Syproruby                               | BioRad, München         |

## Reagenzien für das Apoptose-Assay

| REAGENZ, KIT                         | FIRMA            |
|--------------------------------------|------------------|
| Apo-One Homogenous Caspase-3/7 Assay | Promega, (D)     |
| Staurosporine Ready Made Solution    | Sigma, Steinheim |

## Sonstige Reagenzien

| REAGENZ, KIT                    | FIRMA           |
|---------------------------------|-----------------|
| Fugene 6 (Transfektionsreagenz) | Roche, Mannheim |
| LR-White Einbettmedium für EM   | Pelco, USA      |

### 2.1.6 Primer

| SPEZIFISCHES GEN                                  | PRIMER-BEZEICHNUNG        | NUKLEOTID-SEQUENZ                                                                 | PRODUKT LÄNGE |
|---------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| fls485EX1-EX3                                     | FLSKUEx1s-<br>FLSKUEx3as  | sense: 5'GAGACCTCGTCAT-<br>CCAGGAG'3<br>anti-sense: 5'TTGACCAGT-<br>GACGAGTGAGG'3 | 229bp         |
| $\beta$ -Actin                                    | $\beta$ -Actin<br>for/rev | sense: 5'GGACGACATGGA-<br>GAAAATC'3<br>anti-sense: 5'ATAGCA-<br>CAGCCTGGATAGC'3   | 353bp         |
| CMV bzw.<br>CamRev des<br>pcDNAdest40-<br>Vektors | CMV/CamR                  | sense: 5'AAATGGGCGG-<br>TAGGCGTG'3<br>anti-sense: 5'GGTAATATC-<br>CAGCTGAACGGTC'3 | 487bp         |

### 2.1.7 Antikörper

#### Antikörper für die Immunhistochemie

**Tabelle 2.30:** Primärantikörper

| NAME               | ART | HOST | HERKUNFT             |
|--------------------|-----|------|----------------------|
| #7/1 (anti-fls485) | mAb | Maus | Gassler et al., 2004 |

**Tabelle 2.31:** Sekundärantikörper

| NAME      | ART                     | HOST  | HERKUNFT       |
|-----------|-------------------------|-------|----------------|
| anti-Maus | biotinyliert polyclonal | Ziege | DAKO, Dänemark |

#### Antikörper für die Westernblotanalyse

**Tabelle 2.32:** Primärantikörper

| NAME                    | ART | HOST | HERKUNFT             |
|-------------------------|-----|------|----------------------|
| #7/1 (anti-fls485)      | mAb | Maus | Gassler et al., 2004 |
| $\alpha$ -Poly-Histidin | mAb | Maus | R&D, (D)             |
| Anti-CK18               | mAb | Maus | Sigma, Steinheim     |

**Tabelle 2.33:** Sekundärantikörper

| NAME      | ART     | HOST  | HERKUNFT                             |
|-----------|---------|-------|--------------------------------------|
| anti-Maus | IgG HRP | Ziege | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |

### Antikörper und Reagenzien für die Immunfluoreszenz

**Tabelle 2.34:** Antikörper

| NAME              | ART                                         | HOST         | HERKUNFT                                                |
|-------------------|---------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------------------|
| #7/1<br>anti-Maus | mAb, Erst-AK<br>IgG, FITC-konj.<br>Zweit-AK | Maus<br>Esel | Gassler et al., 2004<br>Jackson Immuno Research,<br>USA |

**Tabelle 2.35:** Reagenzien

| NAME                    | FIRMA                 |
|-------------------------|-----------------------|
| Mitotracker Red CMX Ros | Molecular Probes, USA |
| Vectashield with DAPI   | Vysis Inc., USA       |

### 2.1.8 Zellkulturmedien und Zusatzstoffe

Kulturmedien für murine Fibroblasten, Pankreaskarzinom-Zellen, Colonkarzinom-Zellen, kleinzellige Bronchialkarzinomzellen und colorektale Adenokarzinomzellen

**Tabelle 2.36:** Zellkulturmedium für 3T3-NIH (murine Fibroblasten)

| KOMPONENTE           | FIRMA               |
|----------------------|---------------------|
| DMEM 4,5g/l Glucose  | Gibco BRL, UK       |
| 10% (v/v) FCS        | PAN Biotech, Bayern |
| 1,6mM L-Glutamin     | PAA, Cölbe          |
| 40000U/ml Penicillin | PAA, Cölbe          |
| 40mg Streptomycin    | PAA, Cölbe          |

**Tabelle 2.37:** Zellkulturmedium für Capan-1 (Pankreaskarzinomzellen)

| KOMPONENTE            | FIRMA               |
|-----------------------|---------------------|
| RPMI1640 1g/l Glucose | Gibco BRL, UK       |
| 10% (v/v) FCS         | PAN Biotech, Bayern |
| 1,6mM L-Glutamin      | PAA, Cölbe          |
| 40000U/ml Penicillin  | PAA, Cölbe          |
| 40mg Streptomycin     | PAA, Cölbe          |
| 11mM Natrium-Pyruvat  | Gibco BRL, UK       |

**Tabelle 2.38:** Zellkulturmedium für CaCo2 (Colonkarzinomzellen)

| KOMPONENTE                   | FIRMA               |
|------------------------------|---------------------|
| EMEM 1g/l Glucose            | Lonza, Basel        |
| 15% (v/v) FCS                | PAN Biotech, Bayern |
| 1,6mM L-Glutamin             | PAA, Cölbe          |
| 40000U/ml Penicillin         | PAA, Cölbe          |
| 40mg Streptomycin            | PAA, Cölbe          |
| 5mM non-essential Aminoacids | Gibco BRL, UK       |
| 5mM Natrium-Pyruvat          | Gibco BRL, UK       |

**Tabelle 2.39:** Zellkulturmedium für H446 (kleinzellige Bronchialkarzinomzellen)

| KOMPONENTE            | FIRMA               |
|-----------------------|---------------------|
| RPMI1640 1g/l Glucose | Gibco BRL, UK       |
| 10% (v/v) FCS         | PAN Biotech, Bayern |
| 1,6mM L-Glutamin      | PAA, Cölbe          |
| 40000U/ml Penicillin  | PAA, Cölbe          |
| 40mg Streptomycin     | PAA, Cölbe          |

**Tabelle 2.40:** Zellkulturmedium für LoVo (Adenokarzinomzellen)

| KOMPONENTE               | FIRMA               |
|--------------------------|---------------------|
| DMEM/F-12 3,1g/l Glucose | Gibco BRL, UK       |
| 10% (v/v) FCS            | PAN Biotech, Bayern |
| 1,6mM L-Glutamin         | PAA, Cölbe          |
| 40000U/ml Penicillin     | PAA, Cölbe          |
| 40mg Streptomycin        | PAA, Cölbe          |

Zur Kultivierung der 3T3- und Capan-1 - Transfektanten wurde das Medium zusätzlich mit 1mg/ml, bzw. 0,5mg/ml Geneticin G-418 Sulphate (Gibco BRL, Schottland) als Selektionsmarker versetzt.

**Tabelle 2.41:** 0,25%ige Trypsin/EDTA-Lösung zum Splitting der Zellen

| KOMPONENTE   | VOLUMEN/MENGE |
|--------------|---------------|
| 2,5% Trypsin | 20ml          |
| EDTA         | 20ml          |
| A. adinject. | 160ml         |

### **Einfriermedien für murine Fibroblasten, Pankreaskarzinom-Zellen, Colonkarzinom-Zellen, kleinzellige Bronchialkarzinomzellen und colorektale Adenokarzinomzellen**

Zum Kultivierungsmedium werden 10% (v/v) FCS und 8% (v/v) DMSO zugegeben.

#### **2.1.9 Zelllinien und Gewebe**

**Caco2** (ATCC-Nr. HTB-37, Institut für Pathologie, UK Aachen) Die Zelllinie CaCo2 ist eine adhärent wachsende, immortalisierte, mäßig differenzierte humane Colonkarzinomzelllinie, isoliert aus dem colorektalen Adenokarzinom eines 72-jährigen männlichen Patienten.

**3T3-NIH** (ATCC-Nr. CRL-1658, Institut für Pathologie, UK Aachen) Die Zelllinie 3T3-NIH ist eine adhärent wachsende, immortalisierte, gut differenzierte murine Fibroblastenzelllinie, isoliert aus einem murinen Embryo.

**Capan-1** (ATCC-Nr. HTB-79, ) Die Zelllinie Capan-1 ist eine adhärent wachsende, immortalisierte, mäßig differenzierte humane Pankreaskarzinomzelllinie, isoliert aus dem Pankreasadenokarzinom eines 40-jährigen männlichen Patienten.

**NCI-H446** (ATCC-Nr. HTB-171, ) Die Zelllinie NCI-H446 ist eine adhärent wachsende, immortalisierte, mäßig differenzierte humane Bronchialkarzinomzelllinie, isoliert aus dem kleinzelligen Bronchialkarzinom eines 61-jährigen männlichen Patienten.

**LoVo** (ATCC-Nr. CCL-229, Institut für Pathologie, UK Aachen) Die Zelllinie LoVo ist eine adhärent wachsende, immortalisierte, mäßig differenzierte humane Adenokarzinomzelllinie, isoliert aus der supraklavikulären Metastase eines colorektalen Adenokarzinom eines 56-jährigen männlichen Patienten.

**3T3 VF8 2** (stabil-transfizierte 3T3-Zelllinie mit pcDNAdest 40 fls485, Institut für Pathologie, UK Aachen)

**Capan-1 VF9 4** (stabil-transfizierte Capan-1 Zelllinie mit pcDNAdest 40 fls485, Institut für Pathologie, UK Aachen)

**HepG2 B12** (stabil-transfizierte HepG2-Zelllinie mit pcDNAdest 40 ACS5b-fl, Institut für Pathologie, UK Aachen) Die Zelllinie HepG2 ist eine adhärent wachsende, immortalisierte, mäßig differenzierte humane Hepatomzelllinie, isoliert aus dem hepatozellulären Karzinom eines 15-jährigen männlichen Patienten.

**Tabelle 2.42:** Kryokonserviertes Gewebe

| LAUFENDE<br>RUNGSNUMMER | ARCHIVIE- | GEWEBEART UND PATIENTENALTER                            |
|-------------------------|-----------|---------------------------------------------------------|
| NG 211                  |           | Gastrinom (55a)                                         |
| NG 210                  |           | jejunales hochdifferenziertes endokrines Karzinom (55a) |
| NG 209                  |           | Franztumor (50a)                                        |
| NG 203                  |           | normale Dünndarmschleimhaut (79a)                       |
| NG 203                  |           | normale Dickdarmschleimhaut (79a)                       |
| NG 203                  |           | colorektales Adenokarzinom (79a)                        |
| NG 196                  |           | normale Magenschleimhaut (49a)                          |
| NG 148                  |           | neuroendokrines Karzinom (61a)                          |
| NG 121                  |           | normale Nierenrinde und -mark (30a)                     |
| NG 121                  |           | neuroendokrines Karzinom der Niere (30a)                |
| NG 120                  |           | chronische Pankreatitis (53a)                           |

Bei den humanen Gewebeproben handelt es sich um vollständig anonymisiertes Archivmaterial, das nicht mehr für diagnostische Fragestellungen verwendet werden kann und im Rahmen des Tunorbanking/Biobanking archiviert wurde. Es wurde zur allgemeinen klinischen Diagnostik gewonnen und entsprechend der Richtlinien histopathologisch im Institut für Pathologie aufgearbeitet, befundet und archiviert. Die Nutzung der Gewebe für wissenschaftliche Zwecke erfolgt in Übereinstimmung mit den Inhalten der Deklaration von Helsinki und bei Befürwortung durch die zuständige lokale Ethikkommission (EK 019/06).

### 2.1.10 Software

| SFTWARE                     | FIRMA                                            |
|-----------------------------|--------------------------------------------------|
| Adobe Photoshop             | Adobe - Software, (D)                            |
| BioRad IQ5-Standard Edition | BioRad, München                                  |
| BMG Optima                  | BMG Labtech, Offenburg                           |
| ImageJ 1.32j                | Wayne Rasband, National Institute of Health, USA |
| Microsoft Excel 2002        | Microsoft Corporation, USA                       |
| NanoPhotometer Software     | IMPLEN, (D)                                      |
| Origin Pro 8G SR4           | OriginLab Corporation, USA                       |
| SOFTmax 1.2.0 für ELISA     | Molecular Devices, München                       |
| Vector NTI                  | Invitrogen, Karlsruhe                            |

## 2.2 Zellbiologische und Biochemische Methoden

Zu den zellbiologischen und biochemischen Methoden zählen die Experimente an Zelllinien, wie deren Anzucht und Handhabung, aber auch die gentechnischen Veränderungen mittels Transfektion sowie die funktionellen Experimente, und die Versuche zur topographischen Analyse an Zellen und Geweben.

### 2.2.1 Kultivierung der murinen Fibroblastenzelllinie 3T3-NIH, der humanen Pankreaskarzinomzelllinie Capan-1, der humanen Colonkarzinomzelllinien CaCo2 und LoVo und der humanen Bronchialkarzinomzelllinie H446

Die Kultivierung erfolgte jeweils unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit vertikaler Luftströmung. Alle benötigten Medien und Lösungen wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt und die verwendeten Materialien zuvor sterilisiert. Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen oder bei Bedarf in Petrischalen (10 cm Durchmesser) als Monolayer bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit dem jeweils oben genannten Medium kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 Tage, wobei 10 ml Medium pro Kulturflasche verwendet wurden. Die Passagierung der Zellen erfolgte je nach Bedarf, spätestens aber nach 5 Tagen, folgendermaßen: Die konfluenten Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch Zugabe und Inkubation einer 0,25%igen Trypsin/EDTA-Lösung (vgl. Abschnitt 2.1.8, 2-3 min bei 37°C) von dem Flaschenboden abgelöst. Bei vollständiger Ablösung der Zellen vom Untergrund wurde die Protease Trypsin durch die Zugabe von serumhaltigem Medium abgestoppt, die Suspension in ein 50 ml-Falcon überführt und 5 min bei 1200 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Zellen mit 10ml frischem Medium resuspendiert. Diese wurden nun im Verhältnis 1:10, bzw. 1:50 auf neue T75-Zellkulturflaschen überführt und erneut bis zum konfluenten Wachstum kultiviert. Zur Kultivierung des transfizierten Zelllinienklons VF8 2 wurden 100µl, zum Klon VF9 4 wurden 50µl einer 100mg/ml Konzentration des Selektionsmarkers G418 zu 10ml Medium hinzugegeben (Endkonzentration 1mg/ml, bzw. 0,5mg/ml).

### 2.2.2 Kryokonservierung und Rekultivierung von eingefrorenen Zellen

Zur Kryokonservierung der jeweiligen Zelllinie, bzw. eines Zellklons, wurde eine 90-100% konfluente T75-Zellkulturflasche wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben passagiert, der Überstand nach der Zentrifugation verworfen und das Zellpellet in 3ml vorgekühltem Einfriermedium (vgl. Abschnitt 2.1.8) resuspendiert. Die gewonnene Suspension wurde auf drei beschriftete Kryotubes verteilt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Schnellstmöglich

wurden die Proben nun im Kryokonservierungsgerät für eine Stunde vorgefroren und anschliessend in der gasförmigen Phase eines Stickstofftanks bis zum nächsten Gebrauch verwahrt.

### **2.2.3 Erzeugung von transienten und stabilen Transfektanten humaner Zelllinien**

#### **Austestung der G418-Antibiotikateranz**

Der Einsatz des Selektivums Geneticin 418, kurz G418, ist ein wesentlicher Schritt in der Erzeugung stabiler Transfektanten. Hierzu muss zunächst getestet werden, ab welcher G418-Konzentration im Kulturmedium die Wildtyp-Zellen nicht mehr teilungsfähig sind und absterben, da die erfolgreich transfizierten Zellen ein Antibiotikaresistenzgen im Rahmen der Transfektion erhalten und dementsprechend unempfindlich gegenüber G418 werden. Eine Verdünnungsreihe mit ansteigender G418-Konzentration lässt diejenige Verdünnung erkennen, bei der die Zellen gerade noch gut wachsen können, ohne durch den toxischen Zusatz abzusterben. Dementsprechend wurden je zwei 6-Well-Platten mit der gleichen Zellanzahl pro Well für 3T3- und für Capan-1-Wildtyp-Zellen ausgesät und bis zur 60-70%igen Konfluenz kultiviert. Eine vollständige Konfluenz liesse nicht mehr die Unterscheidung zu, ob die Zellen aufgrund des G418-Zusatzes oder aufgrund von Platzmangel absterben. Nachfolgend wurde das Kulturmedium mit ansteigenden Konzentrationen von G418 versetzt (0, 100, 200, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400  $\mu\text{g/ml}$ ) und die Zellen unter regelmässigem Medienwechsel und Selektivumzusatz für eine weitere Woche bebrütet. Danach liess sich deutlich anhand des mikroskopischen Bildes erkennen, dass 3T3-Zellen bei höheren G418-Konzentrationen als 1000  $\mu\text{g/ml}$  und Capan-1-Zellen bei höheren G418-Konzentrationen als 500  $\mu\text{g/ml}$  nicht mehr wachsen konnten. Diese Selektivumkonzentrationen wurden dann für die spätere stabile Transfektion eingesetzt (vgl. Abschnitt 2.2.3).

#### **Durchführung der transienten Transfektion**

Bevor eine stabile Transfektion erfolgen konnte, musste zunächst in einem Vorversuch das Transfektionsverhalten der verschiedenen Zelllinien untersucht werden. Daher wurden sowohl mit 3T3 und Capan-1, als auch mit CaCo2 und H446 Zellen eine transiente Transfektion durchgeführt. Nach Aussaat von 150.000 Zellen pro Well auf jeweils eine 6-Well-Platte und Wachstum über Nacht wurde eine Verdünnung der zu transfizierenden Plasmid-DNA mit Serum-freien Medium auf 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  hergestellt. Als Transfektionsreagenz diente sowohl für die transiente als auch für die stabile Transfektion Fugene 6 von Roche. Dieses wurde im Verhältnis 3:2 nach Herstellerangaben mit der Plasmid-DNA Verdünnung gemischt und 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend erfolgte die Zugabe dieser Reagenzien in die einzelnen Wells, wobei mindestens ein Well pro Zelllinie unbehandelt blieb und als Negativkontrolle diente. Nach einer Wachstumszeit von 6, 24, 48 und 72h wurden die Zellen

mittels Aufnahme in Laemmli-Puffer (vgl. Abschnitt 2.4.2) geerntet und im Western Blot ausgewertet (vgl. Abschnitte 2.4.5 und 2.4.6).

### **Durchführung der stabilen Transfektion**

Die stabile Transfektion wurde mit einer Zelllinie mesenchymalen Ursprungs, den 3T3-Zellen, und einer Zelllinie epithelialen Ursprungs, den Capan-1-Zellen, durchgeführt. Das anfängliche Vorgehen erfolgte wie bei der transienten Transfektion, wobei zusätzlich je eine 6-Well-Platte pro Zelllinie mit einem Leervektor-Plasmid transfiziert wurde. Nach 24h Inkubation wurden die Zellen aus den 6-Well-Platten durch abtrypsinieren, sedimentieren und resuspendieren in normalem Medium mit den Verdünnungen 1:2, 1:4, 1:10, 1:20 und 1:50 auf Petrischalen ausgesät und für weitere 24h bei 37° Celsius bebrütet. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und zum Aufbau des Selektionsdruckes das Selektivum G418 in der vorher ermittelten Konzentration (vgl. Abschnitt 2.2.3) zugegeben. Nachdem der Selektionsdruck für 1-2 Wochen aufrecht erhalten worden war, konnten die einzelnen Klonkolonien sowohl lichtmikroskopisch als auch makroskopisch identifiziert und markiert werden. Durch Aufbringen eines sterilen Ringes auf die einzelnen Kolonien wurden diese einzeln abtrypsiniert und in die verschiedenen Wells einer 96er- Well-Platte verteilt und weiter angezüchtet. Ab diesem Zeitpunkt wurde für die weitere Zellvermehrung ausschliesslich Medium mit G418-Zusatz verwendet. Nach Erlangen eines ausreichenden Zellvolumens konnten die einzelnen Klone auf RNA- und Proteinebene (bei den Volltransfektanten), bzw. DNA-Ebene (bei den Leertransfektanten) mittels (RealTime-)PCR und Western Blot getestet werden.

### **2.2.4 Zellzahlbestimmung mittels elektronischer Zählgeräte**

Zur objektiven Erfassung des Zellgehalts einer Zellsuspension wurde in jedem beschriebenen Experiment eine Zellzahlbestimmung mittels Casy 1 durchgeführt, welcher nach dem Prinzip der Widerstandsmessung und der Pulsflächenanalyse misst. Hierzu wurden aus einem geeichten Dispenser genau 9,9ml der Casy 1 isotonen Kochsalzlösung steril entnommen und mit 100µl der zu untersuchenden Zellsuspension gemischt, die zuvor wie oben beschrieben durch Trypsinierung, Sedimentierung und Resuspension gewonnen worden war. Nach dreimaliger Messung durch das Gerät konnte der Bereich der vitalen Zellen anhand eines Größe-Anzahl-Diagrammes festgelegt und der Mittelwert der Zellanzahl pro Milliliter Suspension ermittelt werden.

### **2.2.5 Erstellung einer Wachstumskurve**

Das Erstellen einer Wachstumskurve ist neben der Durchführung eines Proliferationsassays eine zuverlässige Methode, Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit der transfizierten fls485-Klone im Gegensatz zu den Wildtypzellen zu ermitteln. Dafür wurden im dreifachen

Ansatz und jeweilig dreifacher Bestimmung sowohl Wildtyp-, als auch Leerklon- und Vollklonzellen auf 6-Well-Platten mit einer Dichte von 100.000 Zellen/Well ausgesät und nach eintägigem Wachstum an zwölf aufeinander folgenden Tagen gezählt. Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 500 $\mu$ l Trypsin/EDTA-Lösung pro Well abgelöst und die Reaktion mit 500 $\mu$ l Medium abgestoppt. Von dieser Suspension wurden nun jeweils 100 $\mu$ l wie in 2.2.4 beschrieben in sterile Casy 1 Lösung überführt und der Zellgehalt bestimmt. Der Mittelwert der identisch behandelten Proben ergab den Datenpunkt im Wachstumsdiagramm (siehe Abschnitt 3.3.1).

## 2.2.6 Apoptoseassay

Neben der Untersuchung der eventuell veränderten Wachstumsgeschwindigkeit der transfizierten Zellen erfolgte ebenso eine erste orientierende Untersuchung bezüglich der Apoptoseneigung der genetisch veränderten Zellen. Hierbei wurden jeweils die Wildtypzellen, ein Leer- und ein Volltransfektant untersucht, um Unterschiede zwischen eventuell durch den Prozess der Transfektion selbst bedingte Veränderungen und die durch die vermehrte fls485-Expression bedingten Veränderungen sichtbar zu machen.

Der Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay besteht im Wesentlichen aus zwei Komponenten: Dem profluoreszierende Substrat, Rhodamin 110 bis-N-CBZ-L-Aspartyl-L-Glutamyl-L-Valyl-Aspartatamid (Z-DEVD-R110), der Caspase-3/7 und einem Puffer, der die Zellyse und enzymatische Aktivität der Caspase-3/7 unterstützt. Durch das Schneiden des Z-DEVD-R110 durch die Caspase-3/7 am C-terminalen Ende des Substrats wird Rhodamin 110 freigesetzt und ist bei einer Wellenlänge von 485nmEx/527nmEm mit dem Fluorimeter detektierbar. Dabei ist die Fluoreszenzrate direkt proportional zum Caspase-3/7-Gehalt der Zelle, dass heißt je stärker die Fluoreszenz, desto höher war die Apoptoseaktivität der Zelle. Zu Beginn der Untersuchungen wurden in einer schwarzen, Fluoreszenz-undurchlässigen 96er Well-Platte 8000 Zellen in 100 $\mu$ l Medium pro Well ausgesät, wobei jeweils eine dreifach Bestimmung im dreifach Ansatz erfolgte, um nachher eine valide statistische Auswertung sicherzustellen. Nach 1-2 Tagen konnte der Versuch begonnen werden, indem 5 Stunden vor der geplanten fluoreszenzoptischen Messung das Apoptose-induzierende Reagenz Staurosporin, jeweils 1 $\mu$ g/ $\mu$ l, in die Wells der Positivkontrollen hinzugegeben wurde; als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen, die lediglich im Kulturmedium gewachsen waren. Anschließend erfolgten alle Arbeitsschritte unter der abgedunkelten Werkbank und während der Inkubationszeiten mit Alufolie lichtgeschützt. Die eigentliche Durchführung des Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assays erfolgte laut der Angaben des Herstellers Promega mit den auf Raumtemperatur aufgetauten und gebrauchsfertig vorbereiteten Reagenzien. Aus jedem Well wurden 50 $\mu$ l des Überstandes entnommen und verworfen, der restliche Überstand wurde auf Raumtemperatur abgekühlt. Nachfolgend wurden 50 $\mu$ l des Puffer-Substratgemisches in jedes Well zugegeben und unter Schütteln so lange inkubiert, bis sich nach ca. 4h ein Far-

bumschlag abzeichnete. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte schließlich mithilfe des Fluorimeters Fluostar Optima von BMG Labtech und wurde durch die Software BMG Optima dargestellt. Die relative Apoptoserate der einzelnen Proben wurde wie im Folgenden beschrieben ermittelt: Der Mittelwert der drei identisch behandelten Zellproben und der Blankwert (Fluoreszenz des Mediums) der jeweiligen Proben ergaben eine Differenz, die auf die Negativkontrolle bezogen wurde, um eine relative Vergleichbarkeit zwischen den Proben zu ermöglichen. Hierzu wurde der Probenwert durch die Negativkontrolle dividiert.

## 2.2.7 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie erfolgte an formalinfixierten, 2µm dicken Gewebsschnitten, die an einem Rotationsmikrotom vom paraffineingebetteten Gewebe geschnitten und anschließend über Nacht im Wärmeschrank bei 37° Celsius getrocknet wurden. Nach Entparaffinierung in der absteigenden Alkoholreihe wurden die Objektträger für das AG-Retrieval in Citratpuffer pH6 für 30 min im 95°Celsius heißen Wasserbad erhitzt und hinterher für 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Zwischen jedem der nun nachfolgenden Arbeitsschritte wurden die Gewebsschnitte in TBS-Waschpuffer für jeweils 3x5 min gewaschen. Als nächstes erfolgten das Blocking der endogenen Peroxidase durch Inkubation in 3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung für 10 min und anschließend der Serumblock in 1%iger Milchpulver/10%iger NHS-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur. Nach diesen Vorbereitungen konnte nun der primäre Antikörper gegen fls485, #7/1 (Verdünnung 1:1), in einer feuchten Kammer auf die Proben aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur und schließlich über Nacht bei 4°Celsius inkubiert werden. Auf den jeweiligen Negativkontrollen wurde für diesen Zeitraum die Serumblock-Lösung belassen. Am folgenden Tag wurden die Präparate nach gründlichem Waschen mit dem sekundären biotinylierten Antikörper gegen Mausantigene (Verdünnung 1:200) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubationszeit konnten die ABC-Lösung und die DAB-Färbung vorbereitet werden. Anschließend erfolgte die Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur mit der ABC-Lösung, bei der Avidin die am Präparat gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe über das gekoppelte Biotin erkennt und über weitere Bindungsstellen die ebenfalls an Biotin gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP) bindet. Durch die nachfolgende 15 minütige Inkubation mit der 3,3-Diaminobenzidin (DAB)-Lösung wurde das enthaltene Substrat der Meerrettichperoxidase umgesetzt und es entstand ein in Alkohol unlöslicher brauner Farbstoff. Die folgende Gegenfärbung in Hämalalaunlösung für 4 min diente der besseren Beurteilbarkeit des Präparats und erleichterte die Differenzierung zu den positiv gefärbten Regionen. Abschließend wurde den Präparaten in der aufsteigenden Alkoholreihe die hydrophilen Bestandteile entzogen und sie konnten mit Vitroclud luftblasenfrei eingedeckelt werden. Bei jeder Färbung wurde zum Ausschluß von Färbeartefakten eine Negativkontrolle mitgeführt, die nicht mit dem Primärantikörper #7/1 inkubiert wurde.

### 2.2.8 Immunfluoreszenz (Immunzytochemie)

Die Immunfluoreszenz wurde sowohl an Wildtypzellen der Zelllinien 3T3-NIH, Capan-1, H446 und CaCo2 zur fls485-Lokalisation, als auch an den Volltransfektanten zum Nachweis des Histidin-Tags durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben in speziell bekammerten Objektträgern, LabTeks, bis zur 80%igen Konfluenz angezüchtet und kurz vor der Fixierung für 45 min mit 10%iger Mitotrackerlösung zur Identifikation der Mitochondrien bei 37°Celsius inkubiert. Zwischen jedem der nachfolgenden Arbeitsschritte wurden die Präparate für 3x2 min mit kaltem PBS gewaschen. Die Fixierung und das AG-Retrieval erfolgten nun für 10 min mit eiskaltem Methanol bei -20°Celsius, danach wurden die Zellen für 20 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Für den Serumblock wurden die Zellen mit einer 1%igen NHS-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend abgekippt und mit dem primären Antikörper gegen fls485, #7/1 (Verdünnung 1:1, aus der Maus), bzw. gegen den His-Tag (Verdünnung 1:50 in PBS/Milchpulver(1%)), für eine Stunde bei Raumtemperatur und schliesslich über Nacht bei 4°Celsius inkubiert. Auf den Negativkontrollen wurde die Serumblocklösung für diesen Zeitraum belassen. Am darauffolgenden Tag konnten die Präparate nun mit dem sekundären FITC-markierten Antikörper gegen Mausantigene (Verdünnung 1:250 in PBS/Milchpulver(1%)) für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert werden; anschließend wurden die Kammern der LabTeks entfernt und die Färbung der Zellkerne mit Dapi II durchgeführt. Hierzu wurde die fertige Dapi II-Lösung für 1 min auf den Präparaten belassen, danach gründlich mit PBS, Wasser und schliesslich reinem Ethanol gewaschen und die Präparate mit Glyceringelatine eingedeckelt. Innerhalb der nächsten 48h erfolgten die Betrachtung und Aufnahmen der Zellen an einem Fluoreszenzmikroskop.

### 2.2.9 Elektronenmikroskopische Aufarbeitung und Immunogoldtechnik

Die genaue Lokalisation von fls485 in der Zelle und eventuelle strukturelle Veränderung der transfizierten Zellen wurden mithilfe der Elektronenmikroskopie an semi-dünnen (1µm) bzw. ultra-dünnen (70-100nm) Schnitten untersucht. Zunächst erfolgte die Lokalisationsuntersuchung an frischem Dünndarmgewebe durch eine Immunogold-Markierung. Dazu wurden winzige Gewebewürfel in 2% Paraformaldehyd für 5 Stunden aufgenommen und anschliessend über Nacht in PBS gespült. Am nächsten Tag konnten die freien Aldehydgruppen mit 50mM NH<sub>4</sub>Cl (in PBS) für 3x5 min geblockt werden. Nach der Behandlung in der aufsteigenden Ethanolreihe (30, 50, 70, 90% jeweils 2x10 min, 100% 3x10 min) wurden die Gewebswürfel in LR-White für zunächst 60 min, dann nach Austausch des LR-White rotierend in verschlossenen Behältern und mit Stickstoff überflutet über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe in frischem LR-White bei Raumtemperatur für 2x60 min rotierend und mit Stickstoff überflutet aufgenommen. Jetzt konnten die Proben in einer Gelatine kapsel

mit LR-White eingebettet werden, woraufhin in den folgenden 48h die Polymerisation bei 60°C im Polymerisierungs-Ofen von Heraeus, Düsseldorf erfolgte. Die Gelatine-Kapsel wurde mit heißem Wasser entfernt und die in LR-White eingebetteten Proben wurden am Schneidegerät Ultracut von Leica Microsystems, Wetzlar in Semi- oder Ultra-dünn-Schnitte geschnitten. Die darauffolgende Markierung mit Goldpartikeln erfolgte über eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Dafür wurden die Proben für 30 min mit 3% BSA und 5% Normalserum (in PBS) zur Blockierung von unspezifischen AK-Bindungsstellen behandelt, anschliessend 2-3x mit PBS + BSA (0,2%) für jeweils 10 min gewaschen und dann für 2h bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper #7/1 gegen fls485 (1:1) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff in PBS/BSA erfolgte die Inkubation mit dem Goldpartikel-gekoppelten Sekundärantikörper gegen Maus-Antigene (Verdünnung 1:100 in PBS + BSA (0,2%)) für 1h bei Raumtemperatur. Dieser Inkubation folgten ein letztes Waschen mit PBS/BSA, eine Fixierung für 10 min mit 3% Glutaraldehyd in PBS und eine Spülung für 5x3 min in Aqua dest. Nach Trocknung der Proben konnte die Kontrastierung mittels Uranylacetat und Bleicitrat im Ultrastainer 2168 von Laurylab, Frankreich erfolgen. Die Betrachtung struktureller Veränderungen durch die Transfektion wurde an Leer- und Vollklonen der 3T3- und Capan-1-Zellen durchgeführt. Die Behandlung der Proben erfolgte wie oben beschrieben, nur dass die Zellen zwischen den einzelnen Schritten per Zentrifugation sedimentiert wurden und nach Herstellung der Schnitte direkt die Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat durchgeführt wurde.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

Zu den molekularbiologischen Methoden zählen alle Experimente auf DNA- und RNA-Ebene.

### 2.3.1 RNA-Isolation aus Gewebe und Zellen mittels Tri-Reagenz

Die Verwendung von Tri-Reagenz an Gewebe- und Zellproben ermöglicht die simultane Isolation von RNA, DNA und Proteinen der selben Probe [35]. Für die Isolation aus kryokonserviertem Gewebe wurden von den Gewebeproben 100mg Portionen abgetrennt und mit 3ml Tri-Reagenz im Ultra-Turrax Gewebemixer homogenisiert. Um ein Zelllysate herzustellen, wurden die Zellen einer T75er Zellkulturflasche zweimal mit kaltem PBS gewaschen und dann ebenfalls in 3ml Tri-Reagenz aufgenommen. Die so gewonnenen Homogenisate waren für mindestens 1 Jahr bei -80°Celsius stabil. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min wurden zur Phasentrennung 200µl Chloroform hinzugefügt, kurz gevortext und nach weiteren 10 min Inkubationszeit die Proben für 15 min bei 4° Celsius und 12000rpm zentrifugiert. Die nun deutlich sichtbaren Phasen setzten sich aus der wässrigen RNA-Oberphase, der rosafarbenen Proteinunterphase und der DNA als weisslichem Ring dazwischen zusammen. Nach der Aufteilung der RNA-Phase und der Proteinphase in jeweils neue Eppendorfreaktionsgefässe wurde die Proteinphase für die spätere Isolation (siehe 2.4.1) bei -20° Celsius

gelagert, während der RNA-Phase erneut 750 $\mu$ l Tri-Reagenz zugesetzt, sie gevortext und nach 3 minütiger Inkubationszeit mit 300 $\mu$ l Chloroform gemischt und für 5 min inkubiert wurde. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 4° Celsius und 12000rpm wurde die obere RNA-Phase in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen an Isopropanol versetzt, gevortext, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und für abermals 15 min bei 4° Celsius und 12000rpm zentrifugiert. Der Überstand konnte nun verworfen, das Pellet mit 80% Ethanol gewaschen und für 5 min bei 4° Celsius und 10000rpm zentrifugiert werden. Nach Entfernen des Überstands und Trocknen des Pellets bei Raumtemperatur für 10 min wurde das Pellet in 40 $\mu$ l Reinstwasser, versetzt mit einem RNaseinhibitor RNAsin, gelöst und der RNA-Gehalt photospektrometrisch bestimmt (vgl. 2.3.3).

### 2.3.2 DNA-Isolation aus Zellen mittels Qiagen-Kit

Für die Testung der Leertransfektanten musste mithilfe der konventionellen PCR ein Nachweis des eingebrachten Vectors pcDNAdest40 auf DNA-Ebene erbracht werden. Hierzu erfolgte die DNA-Extraktion aus den Zellen mithilfe des kommerziell erhältlichen QIAmp DNA Mini Kits von Qiagen. Zunächst wurden die zu testenden Zellen wie oben beschrieben abtrypsiniert, sedimentiert und mit soviel PBS resuspendiert, dass man eine finale Menge von ca. 200 $\mu$ l erhielt, die dann in ein 1,5ml großes Eppendorfreaktionsgefäß überführt wurde. Nun wurden 20 $\mu$ l der im Kit enthaltenen Proteinase K und 200 $\mu$ l des AL Puffers zugesetzt, für 15 sec gevortext und schließlich für 10 min bei 56°Celsius inkubiert. Die Ausfällung der DNA erfolgte im folgenden Schritt durch die Zugabe von 200 $\mu$ l 96-100%igem Ethanol, kurzem Vortexen und dem Aufpipettieren der Suspension auf die QIAmp Säule. Anschließend erfolgten mehrere Waschschrte wie vom Hersteller empfohlen und schließlich die Eluation der DNA aus der Säule durch Zugabe von 200 $\mu$ l destilliertem Wasser, Inkubation bei Raumtemperatur für 1-5 min und Abzentrifugation in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß bei 8000 rpm für 1 min. Nach photospektrometrischer Bestimmung des DNA-Gehalts wurden die Proben bei -20°Celsius bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.3.3 Photospektrometrische RNA- und DNA-Quantifizierung

Die RNA-und DNA-Quantifizierung wurde mithilfe des Spektrophotometers NanoDrop durchgeführt, der es ermöglichte, die Konzentration von Nukleinsäuren bis zu einer Obergrenze von 3000ng/ $\mu$ l akkurat zu bestimmen. Gemessen wurde die Absorption bei 260nm mit einer Weglänge von 0,2mm, wobei die Nanodrop-Software automatisch anhand des Lambert Beer'schen Gesetzes die Konzentration der Nukleinsäure berechnete. Um die Reinheit der Nukleinsäureprobe zu bestimmen wurde der Quotient aus der Absorption bei 260nm zu 280nm gebildet. Dieser Wert sollte zwischen 1,8 bis 2,0 liegen. Liegt der Quotient unter 1,8, deutet das auf eine Verunreinigung der Probe durch Proteine hin. Ein Vorteil des NanoDrops gegenüber den herkömmlichen Photometern ist, dass nur 1- 2 $\mu$ l des Nukleinsäurelysates zur

Quantifizierung benötigt werden, da keine Küvetten, sondern eine speziell beschichtete Fläche zur Messung der Konzentration verwendet wird. Die Messung selbst wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.3.4 Erststrang-cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Zur semiquantitativen RNA-Expressionsanalyse mittels RealTime-PCR musste zunächst aus der wie oben beschrieben aus Gewebe oder Zellen isolierten RNA 2.3.1 eine Erststrang-komplementäre DNA (cDNA) mittels reverser Transkription geschrieben werden. Hierfür wurde das SuperScriptIII Reverse Transcriptase-Kit von Invitrogen benutzt und nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Ansatz wurden 1-2 µg RNA verwendet und der cDNA-Gehalt im Anschluss an die Transkription photometrisch am NanoDrop bestimmt.

### 2.3.5 RealTime-PCR mittels IQ5

Die RealTime-PCR hat gegenüber der klassischen PCR den Vorteil, dass man den RNA-Gehalt von Proben quantitativ und in Echtzeit bestimmen kann. Das hierzu benutzte System IQ5 von BioRad wurde laut der Herstellerangaben angewendet und nur im Ablauf der einzelnen Primer-Programme modifiziert. Demnach wurden die 96-Well-Platte, das sterile DEPC-Wasser und die Eppendorfreaktionsgefäße für den jeweiligen Mastermix zuvor unter der UV-Werkbank bestrahlt, um später unter DNA-freien Bedingungen den Mastermix wie folgt zusammenzupipettieren:

**Tabelle 2.43:** Mastermixansatz pro Probe für alle verwendeten Primer

| REAGENZ                      | MENGE  |
|------------------------------|--------|
| Sybr-Green Mix               | 10 µl  |
| forward primer (10 pmol)     | 0,5 µl |
| reverse primer (10 pmol)     | 0,5 µl |
| DEPC-H <sub>2</sub> O        | 8 µl   |
| außerhalb der Werkbank: cDNA | 1 µl   |

Zusätzlich zum jeweiligen Dreifachansatz der Proben wurde mindestens eine Negativkontrolle pro Primer mitgeführt. Die fertig bestückte und versiegelte Platte wurde in das IQ5-Gerät eingesetzt und das Primerprogramm für fls485 gestartet.

**Initialdenaturierung** 10 min bei 95° Celsius

**Amplifikation** 50 Zyklen

- Denaturierung: 10 min bei 95° Celsius
- Annealing: 10 min bei 68° Celsius

- Elongation: 16 min bei 72° Celsius

**Cooling** 30 min bei 40° Celsius, danach abkühlen auf 4° Celsius

Abschließend wurde die Platte entnommen und die Proben wie in Abschnitt 2.3.7 beschrieben auf einem Agarosegel visualisiert. Die Daten konnten mithilfe der Excel-Software statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt werden, wobei das Mitführen eines internen Standards pro Probe, in diesem Fall das Housekeeping Gen  $\beta$ -Actin, für die Quantifizierung der amplifizierten DNA essentiell war.

### 2.3.6 Klassische PCR zur Testung der Leertransfektanten

Die Testung der Leertransfektanten auf das erfolgreiche Einbringen des pcDNA-dest40-Vektors hin wurde mittels einer klassischen PCR durchgeführt. Die vorbereitete DNA (vgl. Abschnitt 2.3.2) wurde mit in Tabelle 2.44 beschriebenen Mastermix sowie einer Negativkontrolle in kleine sterile Eppendorfreaktionsgefäße gegeben und die PCR gestartet.

**Tabelle 2.44:** Mastermixansatz der klassischen PCR pro Probe

| REAGENZ                      | MENGE         |
|------------------------------|---------------|
| PCR-Puffer                   | 5 $\mu$ l     |
| CMV forward primer (10pmol)  | 2 $\mu$ l     |
| CamR reverse primer (10pmol) | 2 $\mu$ l     |
| dNTP                         | 1 $\mu$ l     |
| MgCl <sub>2</sub> (50 mM)    | 1,5 $\mu$ l   |
| taq-Polymerase               | 0,25 $\mu$ l  |
| DEPC-H <sub>2</sub> O        | 30,25 $\mu$ l |

Nach dem PCR-Lauf wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und die Transfektionsrate anhand des Bandenmusters beurteilt.

### 2.3.7 Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten im Agarose-Gel

Zur stichprobenartigen Kontrolle einer RealTime-PCR und regelhaft zum Nachweis des pcDNA-dest40-Vektors in Leertransfektanten wurde eine Auftrennung der PCR-Produkte nach ihrer Größe durchgeführt. Hierzu erfolgte eine horizontale Elektrophorese in 2%igem(w/v) Agarosegel bei einer Spannung von 100V in 1xTBE-Laufpuffer. Für das Agarosegel wurden 2g Agarose in 100ml TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und mit 15 $\mu$ l einer 1mg/ml Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Nach Aushärten des Gels konnten 20 $\mu$ l des PCR-Produkts mit 5 $\mu$ l Laufpuffer gemischt und neben der Low Molecular Weight DNA Ladder als Marker

auf das Gel aufgetragen werden. Da Ethidiumbromid mit der DNA interagiert, konnten die DNA-Fragmente als Banden nach Abschluss der Elektrophorese unter UV-Licht mittels des Geldokumentationsgerätes dargestellt werden.

## 2.4 Proteinchemische Methoden

Die proteinchemischen Methoden umfassen die Experimente, deren Ziel die Proteinisolation, -quantifizierung und -identifizierung ist.

### 2.4.1 Proteinisolation aus Gewebe und Zellen mittels Tri-Reagenz

Die Isolation von Proteinen mithilfe des Tri-Reagenz ermöglicht eine objektive und quantitative Analyse von Proteinlysaten im Western Blot. Außerdem kann aus ein und derselben Probe sowohl die RNA, als auch die DNA und die Proteine isoliert werden, was spätere Aussagen über die Ergebnisse valider macht und eine Zeitersparnis bedeutet. Für die Proteinisolation wurde wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben die Proteinphase von der RNA- und DNA-Phase getrennt und wie folgt weiterbehandelt: Nach Zugabe von 1,5 ml Isopropanol zur Proteinfällung und 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben für 10 min bei 4° Celsius und 12000rpm zentrifugiert. Das gewonnene Proteinpellet wurde nach Verwerfen des Überstandes in 2 ml 0,3M Guanidin-HCL in 95% Ethanol-Lösung durch 20 minütige Inkubation bei Raumtemperatur gewaschen und 5 min bei 4° Celsius und 10000rpm zentrifugiert. Nach dreimaligem Durchführen des Waschvorgangs erfolgte eine Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur in 2 ml 100%igem Ethanol und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 4° Celsius und 10000rpm. Nun konnte das Pellet für maximal 15 min bei Raumtemperatur getrocknet, danach in 200µl 7,5M Harnstoff/1,8M DTT/Proteaseinhibitor-Lösung aufgenommen und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert werden. Anschließend wurden die Proben in drei Zyklen für je 20 sec sonifiziert, für 3 min bei 95° Celsius erhitzt und abschließend die Proteinkonzentration mithilfe des  $D_C$  Protein-Assay (vgl. Abschnitt 2.4.3) ermittelt. Vor dem Auftragen auf das SDS-Gel für die Western Blot Analyse wurden die Proben im Verhältnis 1:2 mit 2fach Laemmli-Puffer versetzt.

### 2.4.2 Herstellung von Zellkulturlysaten für den Western Blot mit Laemmli-Puffer

Für eine schnelle objektive, allerdings im Gegensatz zur Proteinpräparation mit dem Tri-Reagent nicht quantitative Überprüfung der Proteinexpression eines Zelllysats wurden die Zellen in Laemmli-Puffer aufgenommen, so dass direkt eine Western Blot Analyse erfolgen konnte. Hierfür wurden die Zellen einer T75er Zellkulturflasche zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen, dann mit 2 ml Complete mini Proteaseinhibitor inkubiert und schließlich mit

1 ml fertiger 2fach Laemmli-Pufferlösung überschichtet und mit dem Zellschaber in frische Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde die Suspension für 3x20 sec mit dem Ultraschallhomogenisator unter Eiskühlung von außen sonifiziert, um die Zellstrukturen aufzulösen und die Zellyse so zu unterstützen. Den gleichen Zweck hatten das nachfolgende Erhitzen der Proben bei 95°Celsius für 5 min und das abschließende Einfrieren bei -20° Celsius. So behandelt konnten die Proben nach Auftauen auf 4° Celsius direkt einer Western Blot Analyse unterzogen werden.

### **2.4.3 Proteinquantifizierung mittels BioRad D<sub>C</sub> Protein-Assay (nach Lowri)**

Die Proteinquantifizierung erfolgte stets an den mit Tri-Reagenz aufgereinigten Proben, um eine konstante und damit vergleichbare Gesamtproteinmenge im Western Blot untersuchen zu können. Der dabei verwendete kolorimetrische Test von BioRad nutzt die Reaktion von Proteinen mit Kupferionen in einem alkalischen Milieu und der darauf folgenden Reduktion des zugegebenen Folinreagenz durch die Protein-Kupfer-Komplexe. Die typische Blaufärbung der Reaktionslösung hat eine maximale Absorption bei 750nm und ist vor allem durch die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan bedingt. Zunächst wurde eine Standardreihe mit bekanntem Gehalt an bovinem Serumalbumin (BSA) hergestellt. Hierfür wurden 50µl einer BSA-Lösung (10mg BSA/µl) mit 50µl einer 7,5M Urea/1,8mM DTT-Lösung gemischt und 50µl dieser Mischung in wiederum 50µl einer 7,5M Urea/1,8mM DTT-Lösung gegeben. Diese Schritte wurden solange wiederholt, bis man schließlich eine Verdünnungsreihe mit den BSA-Konzentrationen 5, 2,5, 1,25, 0,6, 0,3, 0,15, 0,07mg/ml und einem Blank erhielt. Nun wurden im dreifach Ansatz jeweils 5µl der Proben in eine 96er Well-Platte pipettiert und laut Herstellerangaben mit den Reagenzien A, S und B vermischt. Nach einer 15 minütigen Inkubation unter Lichtausschluss wurden die Proteinkonzentrationen der Proben im ELISAREADER mithilfe der Softmax-Software bei 750nm gemessen und anhand der BSA-Standardreihe von der Software berechnet.

### **2.4.4 Immunpräzipitation mit Ni-NTA Säulen von Qiagen zur Proteinaufreinigung**

Für die Validierung des fls485-Antikörpers#7/1 wurde die 2D-Gelelektrophorese verwendet. Um dabei optimale Ergebnisse zu erzielen, wurden die Zelllysate der Volltransfektanten nicht mit allen enthaltenen Komponenten elektrophoretisch aufgetrennt, sondern vorher gezielt mittels Immunpräzipitation aufgereinigt. Dabei wurden an den Ni-NTA Säulen laut Hersteller selektiv Histidinreste gebunden, die in den Volltransfektanten vermehrt gekoppelt an dem transfizierten fls485 vorkommen. Zur Negativkontrolle wurden gleichzeitig Wildtypzellen und Leertransfektanten mitgeführt. Das primäre Zelllysate wurde aus zwei zu 90%

konfluenten T75er Zellkulturflaschen gewonnen, wobei die Zellen wie oben beschrieben gewaschen, abtrypsiniert, sedimentiert und in PBS resuspendiert wurden. Die Suspension wurde wiederum abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 2 ml Complete mini Proteaseinhibitor resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension in 1,5 ml des im Kit enthaltenen Zelllysepuffers B erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde. Während dieser Inkubationszeit wurden die einzelnen Proben für mindestens 1 min im Zellpotter gestampft, um die Zelllyse zu beschleunigen; dabei wurde das Gerät zwischen den einzelnen Proben gründlich mit Ethanol gereinigt und getrocknet. Anschließend wurde das Zelllysats bei Raumtemperatur für 20-30 min und bei 9800rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Die nachfolgende Präzipitation, die Waschschrte und die finale Eluation des aufgereinigten Lysats aus der Säule erfolgten entsprechend den Herstellerangaben nach denaturierenden Bedingungen. Anschließend konnten die Proben bei -20° Celsius verwahrt werden.

### 2.4.5 Diskontinuierliche SDS-PAA-Gelelektrophorese

Der erste Schritt bei der Western Blot Analyse ist die Auftrennung der zu untersuchenden Proteinprobe nach der Größe der enthaltenen Proteine. Dies erreicht man über eine vertikale eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen. Durch den Einsatz von SDS kommt es zu einer Aufhebung der jeweiligen Proteinladung, da SDS stark negativ geladen ist und über eine Bindung an die hydrophoben Bestandteile der Proteine deren Denaturierung bewirkt, so dass die Proteine nur nach ihrer Masse aufgetrennt werden. Für die verwendeten Gele wurden zunächst die Komponenten des Trenngels gemischt (vgl. Tabelle 2.14) und zwischen zwei Glasplatten gegossen, dieser Ansatz wurde mit Isopropanol überschichtet und 20 min später nach Aushärtung mit Wasser abgespült. Jetzt konnte das Sammelgel hergestellt (vgl. Tabelle 2.14) und auf das Trenngel geschichtet werden, wobei recht zügig das Einsetzen der Probenkämme erfolgen musste. Je 20 µl der vorbereiteten Proben (vgl. Abschnitte 2.4.1 und 2.4.2) und 5 µl des Rainbow molecular weight marker RPN 800 wurden auf das ausgehärtete Gel aufgetragen und dieses in eine Mini Protean III Gelelektrophoresekammer von BioRad in ca. 1l Laufpuffer eingesetzt. Nach 15 min sammeln der Proben im Sammelgel bei 80V erfolgte die Auftrennung im Trenngel bei 120V für 1h, daraufhin wurde das Gel entnommen, das Sammelgel abgeschnitten und das fertige Gel in Kathodenpuffer für wenige Minuten zwischengelagert.

### 2.4.6 Western Blot-Analyse und Chemilumineszenz-Detektion

Nach der Auftrennung der Proteinlysate in der diskontinuierlichen SDS-PAA-Gelelektrophorese mussten die Proteine mittels Semi-Dry-Blotting auf eine PVDF-Membran überführt werden, um anschließend über eine sequentielle Antigen-Antikörper-Reaktion das gesuchte Protein nachweisen zu können. Hierfür wurden sogenannte Blotpakete zusammengesetzt, die den

Transfer der negativ geladenen Proteine entlang eines elektrischen Gradienten auf die Membran ermöglichten. Zunächst wurden in der Blottingkammer je drei in Anodenpuffer I und in Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere aufeinander gelegt, darauf wurde die PVDF-Membran, das in Abschnitt 2.4.5 beschriebene Gel und abschließend sechs in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere gestapelt. Nach Anschluss der Elektroden erfolgte das Blotting für 2 Gele bei 210mA für 45 min bei Raumtemperatur. Nach dem Blotting wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch einstündiges Inkubieren in der Blockinglösung abgesättigt. Im Anschluss wurde die Membran für 1h bei Raumtemperatur, dann über Nacht bei 4° Celsius mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Nach 3x5 min Waschen in PBS konnte am nächsten Tag die Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase- (HRP-)markierten Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur erfolgen. Für die Chemilumineszenzreaktion wurde die Membran nach einem weiteren Waschschrift mit dem ECL Western Blotting Substrate Kit von PIERCE für 1 min inkubiert, wobei durch die Zugabe und Umsetzung eines HRP-spezifischen Substrates die Chemilumineszenz im Optimax Röntgenfilmentwickler von Protec sichtbar wurde. Das anschließende Quantifizieren der Banden konnte nur durch eine Nachinkubation der Membran mit dem äußerst spezifischen Antikörper gegen das Housekeeping Gene  $\beta$ -Actin erfolgen, da dieses in fast allen Zellen in ähnlichem Maße exprimiert wird. Durch Einscannen der Röntgenfilme und Auswertung mithilfe der ImageJ-Software konnte so eine semiquantitative Aussage über die Expression des gesuchten Proteins in der Probe getroffen werden.

### 2.4.7 2D-Gelelektrophorese und Visualisierung mittels Syproruby

Die 2D-Gelelektrophorese wurde mit den bei der Immunpräzipitation gewonnenen Proteinlysaten im 2fach Ansatz durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.4.4) mit der Absicht, anschließend per MALDI die isolierten Proteinspots zu sequenzieren so die Validität des Erstantikörpers gegen fls485, #7/1, nachweisen zu können. Daher wurde eines der beiden Gele für das Ausstechen der Proteinspots nach Syprorubyfärbung, das andere für eine parallel stattfindende Western Blot Analyse mit #7/1 verwendet. In der ersten Dimension erfolgte eine isoelektrische Fokussierung, also die Auftrennung der Proteine nach ihrem spezifischen pH-Wert. Zunächst wurden die Gelstreifen von GE Healthcare (24cm, pH 3-11) rehydriert, indem das komplette Probenvolumen von 450 $\mu$ l in eine Rinne des Reswelling Trays gefüllt und der gesamte Streifen gegen Austrocknung mit Öl überschichtet wurde. Nach einer Inkubation über Nacht konnten die Gelstreifen ins Manifold der Fokussiereinheit (IPGphor GE Healthcare) eingelegt und über zwei mit A.bidest getränkte Papierwicks an beiden Ende des Streifens an die Elektroden angeschlossen werden. Das System wurde mit Öl überschichtet und die Fokussierung über Nacht wie in Tabelle 2.45 dargestellt ausgeführt.

**Tabelle 2.45:** Ablaufprotokoll für die isoelektrische Fokussierung

| DAUER | SPANNUNG |
|-------|----------|
| 0,5h  | 350V     |
| 1h    | 500V     |
| 1h    | 1500V    |
| 7h    | 3500V    |
| 6h    | 3500V    |
| 9h    | 3500V    |

Die Gele für das Auftrennen der Proteine in der zweiten Dimension, ihrer Größe, wurden selbst nach dem in Tabelle 2.28 beschriebenen Rezept und mithilfe des Gradientengießers von GE Healthcare zwischen zwei Glasplatten hergestellt. Die fertig gegossenen Gele wurden mit Isopropanol überschichtet und mussten für mindestens 5h aushärten. Nach der Fokussierung der Gelstreifen wurden diese kurz mit A.bidest abgespült und in speziellen Glasröhren equilibriert. Dazu wurden die Streifen zunächst für 20min im Equilibrierungspuffer I (100mg DTT/10ml Puffer), dann für weitere 20min im Equilibrierungspuffer II (50mg DTT/10ml Puffer) auf dem Schüttler inkubiert. Nun konnte die Laufkammer mit 750ml 10x Elektrophoresepuffer und 7,5l A.bidest befüllt und der Gelstreifen mit der Gelseite nach vorn bündig auf die obere Gelkante aufgedrückt werden. Nachdem der Streifen mit 0,5%iger flüssiger Agarose überschichtet worden war und alles kurz ausgehärtet konnte, wurden die Gele in die Laufkammer gesetzt und bei einer konstanten Spannung von 65V für 24h angeschlossen. Nach dem Lauf der Gele wurden diese vorsichtig aus den Glasplatten herausgelöst und über Nacht in der Syproruby-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Gele am Typhoon Fluoreszenzscanner eingelesen und die gefundenen Proteinspots mit denen der parallel stattgehabten Western Blot Analyse verglichen. Diejenigen Spots, die im Western Blot durch den fls485 Antikörper #7/1 erkannt wurden, wurden nun im Syproruby-gefärbten Gel ausgestochen, enzymatisch verdaut, per Massenspektrometer sequenziert und die erhaltene Sequenz mit den gängigen Proteindatenbanken abgeglichen.

## 2.5 Statistische Berechnungen

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Programme Microsoft Excel und Origin-Pro 8G SR4 von OriginLab Corporation durchgeführt. Zum Paargruppenvergleich wurde bei Normalverteilung der exakte Test nach Fisher angewendet. Statistische Signifikanz war definiert ab einem P-Wert  $\leq 0,05$ .

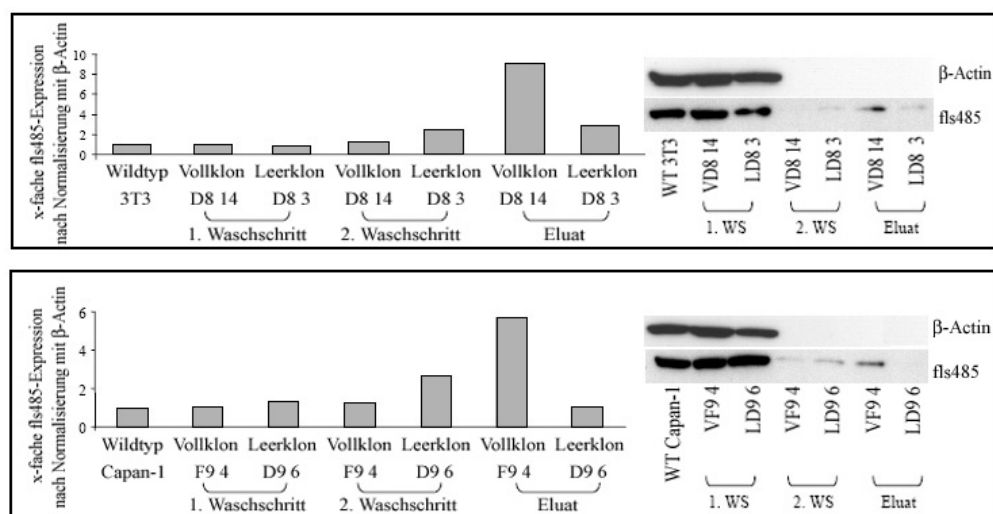
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung von fls485

Die Charakterisierung des Proteins fls485 erfolgte aus zwei Blickwinkeln heraus. Auf der einen Seite sollte die Verteilung des Proteins in Gewebe, Zelltypen und dessen subzelluläre Lokalisation untersucht werden. Auf der anderen Seite wurden erste Schritte bezüglich der funktionellen Untersuchung gegangen, um mögliche Anhaltspunkte auf die Aktivität als Chaperon oder die Rolle von fls485 in der Differenzierung neuroendokriner Zellen herauszufinden. In diesem ersten Abschnitt werden nun zunächst die Ergebnisse der topographischen Untersuchungen und der Validierung des genutzten Antikörpers #7/1 dargestellt.

#### 3.1.1 Validierung des fls485-Antikörpers #7/1 mittels 2D-Gelelektrophorese und Immunpräzipitation

Zur Validierung des für die oben beschriebenen Methoden verwendeten fls485-Antikörpers #7/1 wurde die Proteinaufreinigung mittels Immunpräzipitation und nachfolgender 2D-Gelelektrophorese durchgeführt. Wie in Grafik 3.1 dargestellt, konnte durch diese Aufreinigung eine deutliche Konzentrierung der Proteinproben erreicht werden, welche anhand der dargestellten Westernblottergebnisse überprüft wurde.



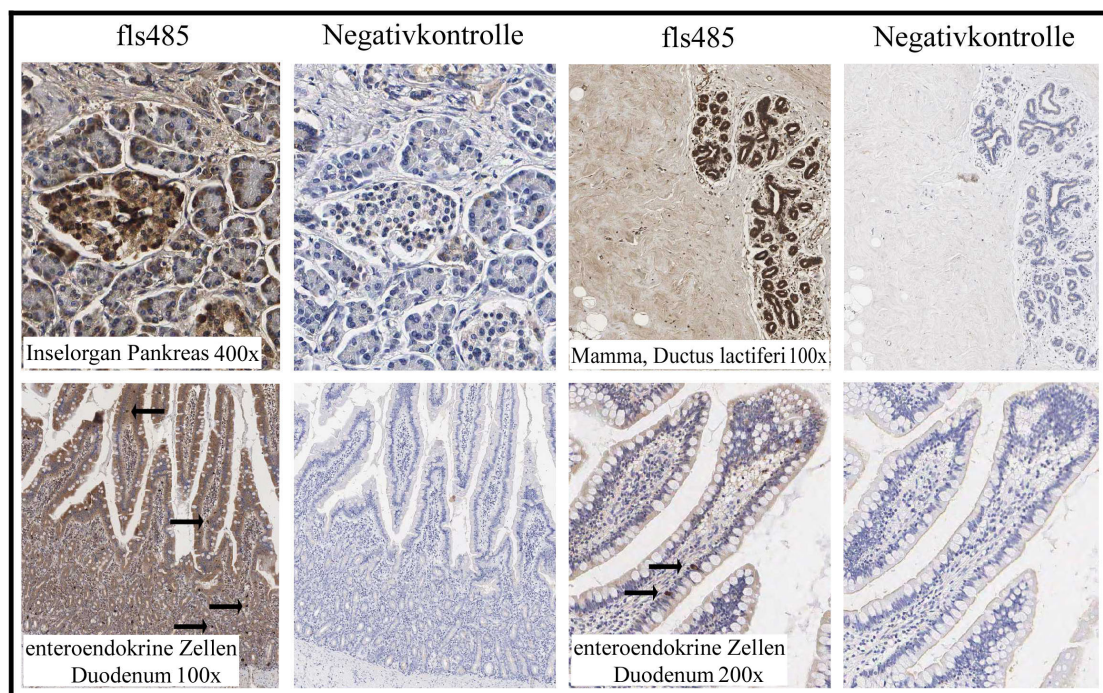
**Abbildung 3.1:** Westernblottergebnisse der Immunpräzipitation

Mit diesem aufgereinigten Eluat der jeweiligen Voll- und Leertransfektanten wurde nun

eine differenzierte Auftrennung mittels 2D-Gelelektrophorese durchgeführt, wobei jeweils 2 Gele parallel bestückt und untersucht und die gesuchten Proteinspots mittels Massenspektrometrie analysiert wurden (vgl. Kapitel 2.4.7). Die Ergebnisse der Massenspektrometrie entsprachen laut Proteindatenbanken nicht dem gewünschten Resultat, nämlich dem Nachweis von fls485, was sich am ehesten durch eine hohe Bias der 2D-Gelelektrophorese und der Massenspektrometrie erklären lässt (vgl. Abschnitt 4.2.1). Durch die Verwendung von zwei zwar gleichzeitig laufenden, aber eben nicht identischen Gelen und dem visuellen Abgleich zwischen den identifizierten Proteinspots des Westernblotergebnisses und der Syprorubryfärbung kann es zu diesem Negativergebnis gekommen sein. Die bereits im Vorfeld dieser Dissertation durchgeführte Generation und Etablierung des fls485-Antikörpers konnte allerdings dessen Spezifität erweisen, wobei der Klon #7/1 selektiv das 55kDa fls485-Molekül erkannte (vgl. Abschnitt 1.2.3) [22].

### 3.1.2 Immunhistochemische Färbungen an paraffinfixiertem Normalgewebe

Um zu Beginn der Arbeit einen Überblick über die Lokalisation von fls485 zu erhalten, erschien eine systematische immunhistochemische Färbung von Normalgewebe des menschlichen Körpers sinnvoll. Die Ergebnisse der Färbungen sind im Folgenden (vgl. Abbildung 3.2) exemplarisch dargestellt, wobei man generell feststellen konnte, dass fls485 ubiquitär im menschlichen Organismus vorkommt und eine auffällige Vermehrung der Expression in Gewebe neuroendokrinen Ursprungs wie zum Beispiel in den enteroendokrinen Zellen des Dünndarms zeigte.

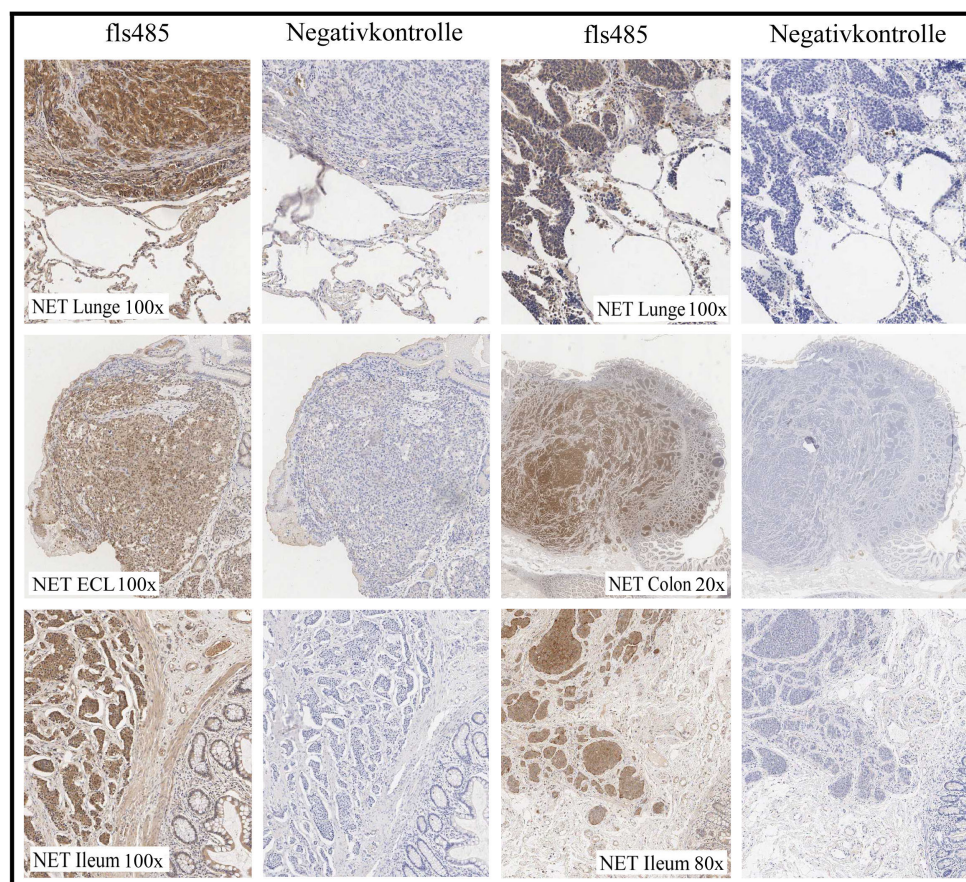


**Abbildung 3.2:** Immunhistochemie an Normalgewebe (Auswahl)

In der Übersicht wurden diejenigen Gewebe dargestellt, bei denen im Vergleich zu den restlichen Proben eine reproduzierbar vermehrte Färbung einzelner Zellpopulationen festgestellt werden konnte. Hierbei fielen vor allem die meist randständig gelegenen  $\beta$ -Zellen des Pankreasinselorgans, ebenso wie die enteroendokrinen Zellen mit apikal gelegenen Zellkern in oberen Abschnitten des Dünndarms auf. Eine Überexpression zeigten häufig auch Epithelien, wie zum Beispiel die Haut (nicht dargestellt) und das Gangepithel der Ductus lactiferi der Mamma.

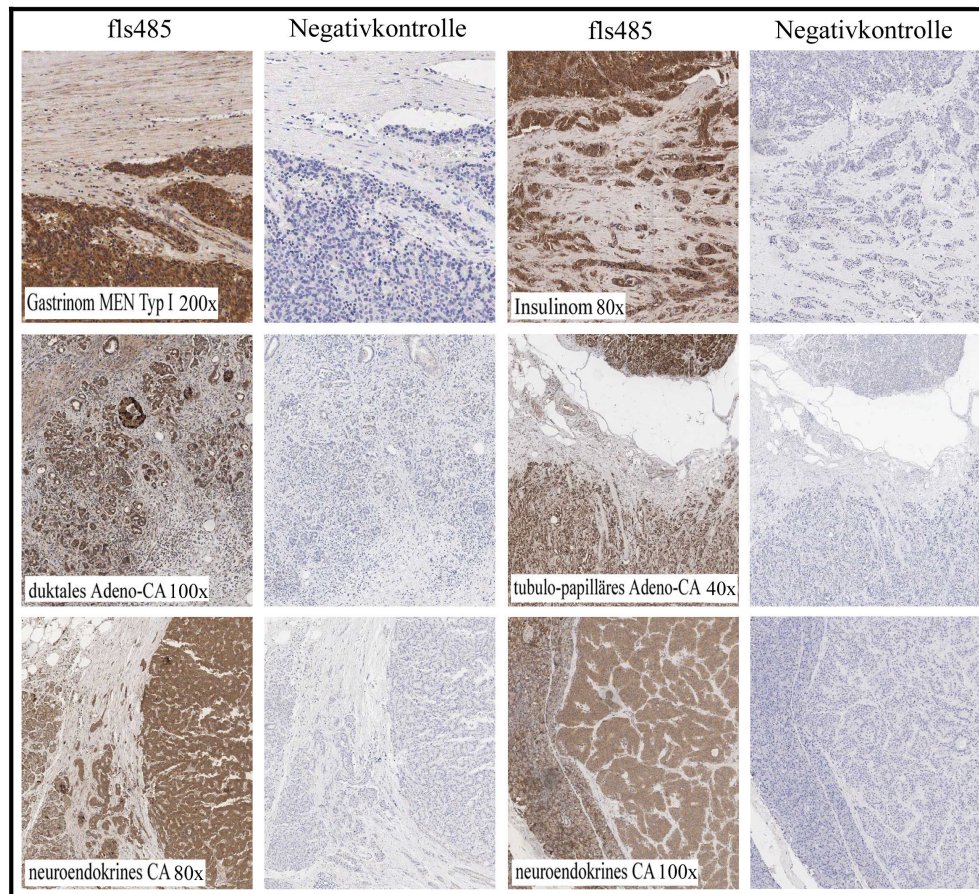
### 3.1.3 Immunhistochemische Färbungen an paraffinfixierten (neuro-) endokrinen Neoplasien

Die Feststellung, dass fls485 offenkundig vermehrt in Gewebe und Zellen neuroendokrinen Ursprungs exprimiert wird, führte zu der Überlegung, wie es sich mit der Expression in benignen und malignen Pathologien eben dieser Zelltypen verhält. Zu diesem Zweck wurden mithilfe des klinikeigenen Archivierungssystems Citrix passende Patientenfälle, das zugehörige histologische Präparat und die archivierten Probenblöcke herausgesucht, mikroskopiert und ebenfalls immunhistochemisch gegen fls485 gefärbt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Grafiken dargestellt.



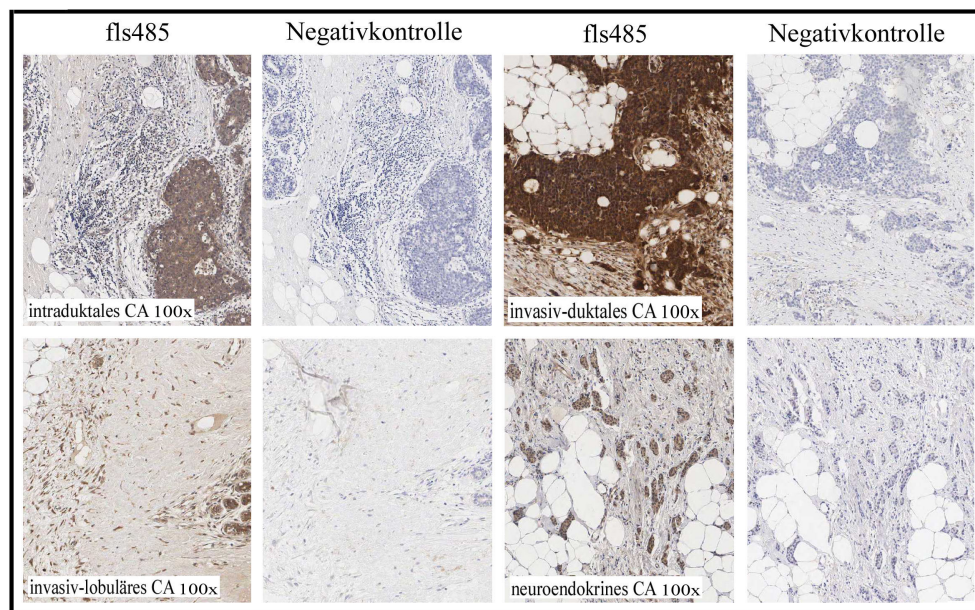
**Abbildung 3.3:** Immunhistochemie an neuroendokrinen Tumoren (NET)

Neuroendokrine Tumoren zeigten generell eine gute Anfärbbarkeit durch den fls485-Antikörper, wobei von insgesamt 42 gefärbten Präparaten vor allem diejenigen eine verstärkte fls485-Expression zeigten, die in oberen Abschnitten des Dünndarms lokalisiert waren (n=25). Im Vergleich zu Tumoren anderer Entitäten, wie zum Beispiel verschiedene Lungentumoren (vgl. Abbildung 3.6), konnte in pulmonalen neuroendokrinen Tumoren (n=5) ebenfalls eine vermehrte Anfärbbarkeit festgestellt werden.



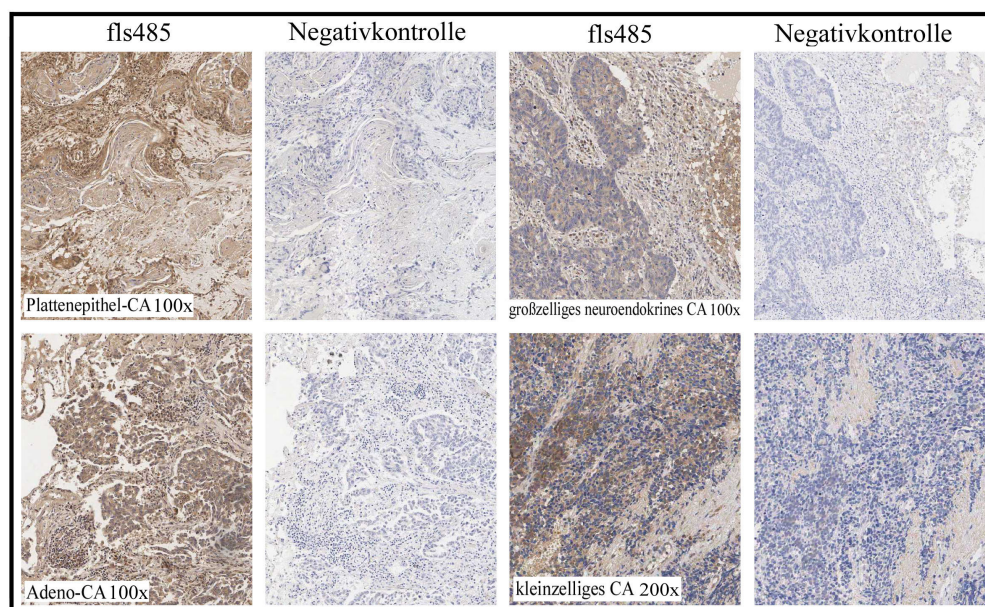
**Abbildung 3.4:** Immunhistochemie an Pankreastumoren

Von den insgesamt 27 verschiedenen Pankreasproben zeigten besonders die höher differenzierten Tumoren wie Insulinome (n=2) oder Gastrinome (n=1) und ebenso die neuroendokrinen Pankreaskarzinome (n=13) eine erhöhte Anfärbungsrate als die häufigen duktaalen Adenokarzinome des Pankreas (n=8). Zum Teil zeigen die dargestellten Proben einen Ausschnitt normalen Pankreasgewebes, um die unterschiedliche fls485-Expression der Tumorzellen im Vergleich zum normalen Drüsengewebe zu demonstrieren.



**Abbildung 3.5:** Immunhistochemie an Mammakarzinomen

Unter den 28 verschiedenen Mammaproben konnte bei den invasiv-duktalem und den intraduktalen Karzinomen ( $n=14$ ) und den neuroendokrinen Tumoren ( $n=6$ ) eine vermehrte Färbung der Tumorzellen festgestellt werden. Lobuläre ( $n=3$ ), medulläre ( $n=4$ ) und muzinöse ( $n=1$ ) Mammakarzinome zeigten eine schwache bis mittelstarke Anfärbbarkeit, wie exemplarisch an einem invasiv-lobulären Mammakarzinom dargestellt (vgl. Abbildung 3.5).



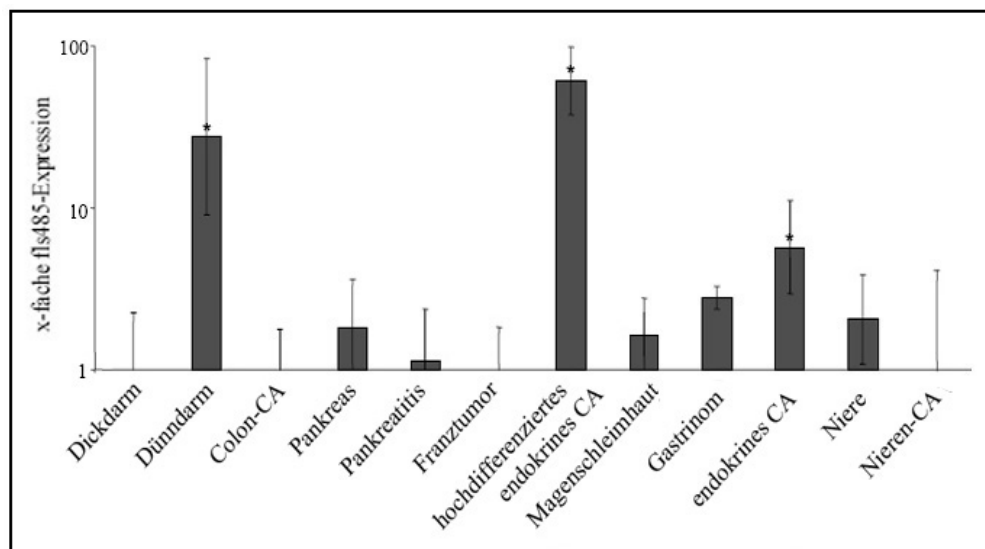
**Abbildung 3.6:** Immunhistochemie an Lungentumoren

Primäre Lungentumoren zeigten im Gegensatz zu den anderen untersuchten Tumorentitäten keine signifikanten Unterschiede in ihrem Färbeverhalten. Lediglich bei den neuroendokrinen Tumoren der Lunge ( $n=5$ ) (vgl. Abbildung 3.3) konnte wie bei allen NETs eine vermehrte Expression beobachtet werden. Ebenso war bei den Plattenepithelkarzinomen ( $n=2$ )

eine etwas stärkere Färbung festzustellen als im Vergleich zum Normalgewebe. Kleinzellige Bronchialkarzinome (n=16), die ebenfalls von Zellen neuroendokrinen Ursprungs ausgehen, zeigten das typische histologische Bild mit vielen polymorphen kleinen Tumorzellen, deren Zytoplasma-Kern-Relation derart zugunsten des Zellkerns verschoben war, dass eine sichere Beurteilung der cytoplasmatischen *fls485*-Färbung nicht möglich war.

### 3.1.4 Semiquantitative Analyse der *fls485*-Expression an kryokonserviertem Gewebe

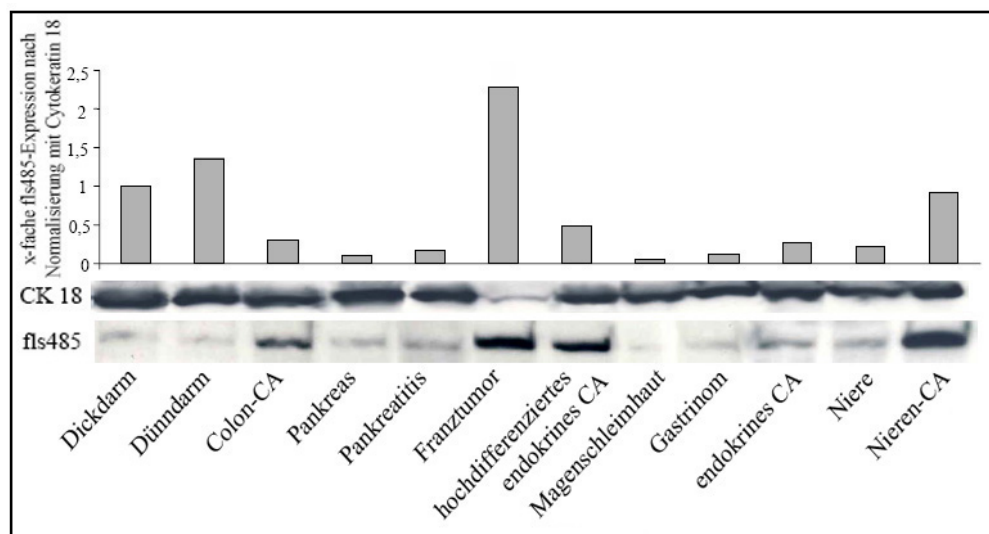
Neben der immunhistochemischen Färbung von Normalgewebe und den neuroendokrinen Pathologien wurde ebenfalls kryokonserviertes Patientenmaterial mittels RealTime-PCR und Westernblotanalyse auf dessen *fls485* Expression hin untersucht. Nach Normalisierung mit Cytokeratin 18 fanden sich ähnliche Ergebnisse wie in der Immunhistochemie, wobei allerdings deutliche Unterschiede zwischen der Expression auf RNA-Ebene und Proteinebene in ein und derselben Probe festzustellen waren. Die RNA-Expression der Proben von



**Abbildung 3.7:** PCR-Ergebnisse des kryokonservierten Gewebes

Dünndarm und hochdifferenziertem endokrinen Tumor war im Gegensatz zu den Vergleichsproben signifikant erhöht, während sich auf der Proteinebene eher durchschnittliche *fls485*-Konzentrationen finden ließen.

Im Gegensatz dazu konnte man eine niedrige *fls485*-Expression auf RNA-Ebene, aber eine sehr hohe Proteinexpression in einer seltenen Art des Pankreastumors, dem Franztumor, beobachten. Normales Pankreas-, Nieren- und Magenschleimhautgewebe zeigte keine signifikanten Abweichungen von den Durchschnittswerten, wie es auch die immunhistochemische Färbung dieser Normalgewebe vermuten ließ. Die signifikant stärkere *fls485*-Expression der  $\beta$ -Zellen des Pankreas in der Immunhistochemie (vgl. Abbildung 3.2) scheint in der Zellmasse der kryokonservierten Probe keinen ausschlaggebenden Unterschied zu bewirken. Im

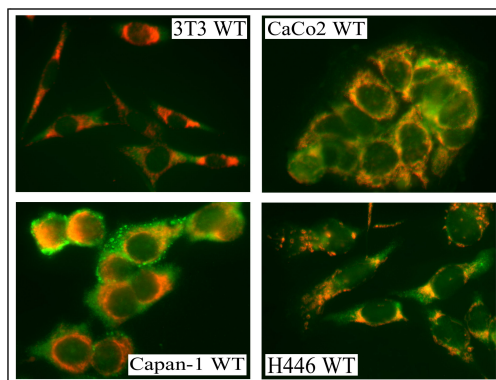


**Abbildung 3.8:** Westernblotergebnisse des kryokonservierten Gewebes

Widerspruch zu den Ergebnissen der Immunhistochemie steht das Expressionsmuster der untersuchten Gastrinomprobe, da bei der RNA- und Proteinanalyse deutlich niedrigere Werte zu messen waren, als die Anfärbbarkeit des Gewebes erwarten ließ (vgl. Abbildung 3.4). An dieser Stelle waren die Untersuchung weiterer Proben aufgrund der Seltenheit des Tumors leider nicht möglich, so dass im Endeffekt keine sichere Aussage über das Maß der fls485-Expression in dieser Tumorentität getroffen werden kann.

### 3.1.5 Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von fls485 mittels Immunfluoreszenz

Die Untersuchung der subzellulären Verteilung von fls485 wurde zu dem Zweck durchgeführt, eventuelle Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins im Zellstoffwechsel aufgrund dessen Lokalisation innerhalb der Zelle ziehen zu können. Hierzu wurden die zu Anfang ver-



**Abbildung 3.9:** Immunfluoreszenz an Wildtyp-Zelllinien

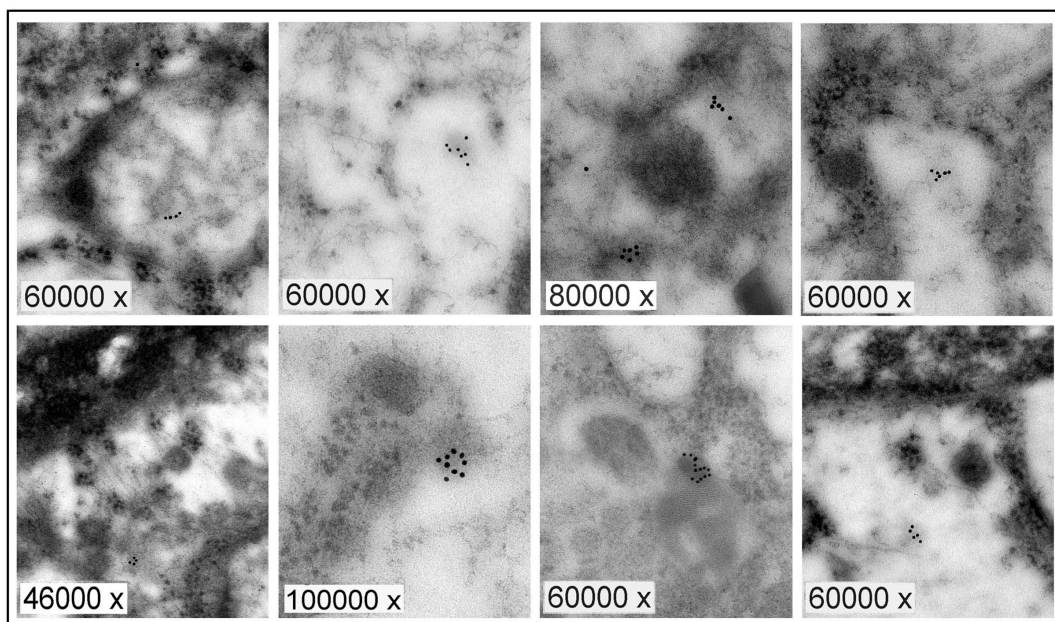
wendeten Wildtyp-Zellen der Zelllinien 3T3, CaCo2, Capan-1 und H446 mittels Immunfluoreszenz gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Wie in Grafik 3.9 sichtbar, wurden die Mitochondrien rot angefärbt, während sich fls485 grün darstellte. Desweiteren erkennt man die typische Zellmorphologie der später für die Transfektion verwendeten spindelförmigen 3T3-Zellen und der Capan-1-Zellen mit vesikulären Strukturen im Zytoplasma.

Durch die Aussparung des Zellkerns wird deutlich, dass sich fls485 hauptsächlich im Cytoplasma wieder findet, was die direkte nukleäre Beteiligung als Tran-

skriptionsfaktor unwahrscheinlich werden lässt und für eine Aktivität des Proteins im rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) oder für eine Lokalisation an freien Ribosomen im Cytoplasma spricht. Diese Vermutungen wurden in der nachfolgend beschriebenen Elektronenmikroskopie noch näher untersucht (vgl. Abbildung 3.10). Eine weitere Beobachtung war das oben bereits genannte vesikuläre Anfärbemuster der Capan-1-Zellen, welches sich in den späteren Versuchen zum Transfektionsnachweis reproduzieren ließ (vgl. Abbildung 3.21) und die Frage aufwarf, ob *fls485* in der Zelle vermehrt in Vesikeln vorliegt. Dieser Hypothese wurde ebenfalls in der elektronenmikroskopischen Untersuchung nachgegangen (vgl. Abbildung 3.22).

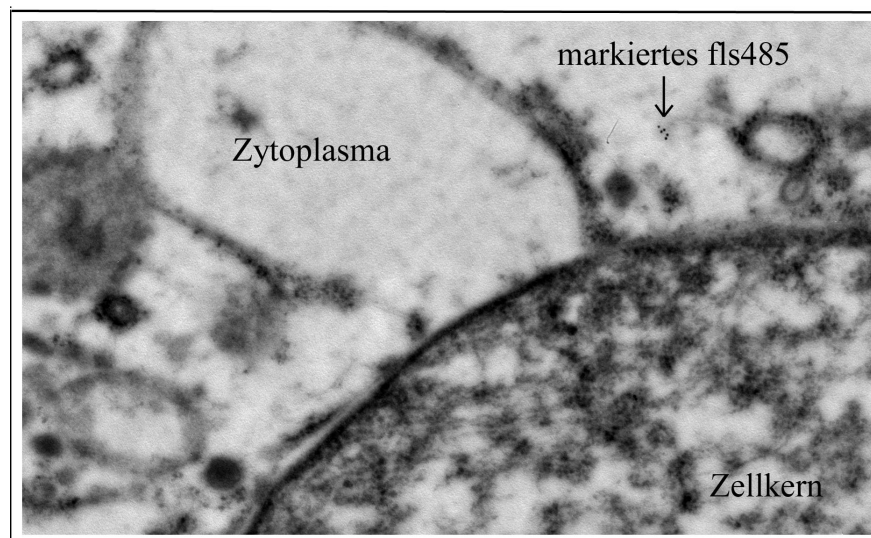
### 3.1.6 Elektronenmikroskopische Darstellung der subzellulären Verteilung von *fls485*

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen gliedern sich in zwei Versuche: Zum einen ist in Grafik 3.10 die Immunogold-Technik am gesunden Dünndarm dargestellt, mit der die genaue subzelluläre Lokalisation von *fls485* geklärt werden sollte. Zum anderen wurden die Leer- und Volltransfektanten der 3T3- und Capan-1-Zellen elektronenmikroskopisch betrachtet, um eventuelle strukturelle Veränderung, die durch die Überexpression verursacht sein könnten, sichtbar zu machen (vgl. Abschnitt 3.2.4).



**Abbildung 3.10:** Immunogold-Elektronenmikroskopie am Dünndarm mit *fls485*-Markierung

In Abbildung 3.10 sieht man die mit den 10nm großen Goldpartikeln markierten fls485-Proteine, wobei ab einer Anzahl von mindestens 3 Goldpartikeln an einem Ort von einem gültigen Nachweis des Proteins ausgegangen wurde. Pro Probe ( $n=2$ ) wurden jeweils 5 Felder ausgezählt. Um die Partikel darstellen zu können, wurden in der Grafik hohe Vergrößerungen gewählt, daher ist der genaue Ort der Markierung im Kontext mit den Zellorganellen nicht direkt zu erkennen.



**Abbildung 3.11:** Immunogold-Elektronenmikroskopie am Dünndarm mit fls485-Markierung (Übersicht)

Hierzu wurde exemplarisch ein Ausschnitt der Zelle in geringerer Vergrößerung in Abbildung 3.11 dargestellt. Neben dem Zellkern sind einige freie Ribosomen und ein markiertes Molekül fls485 im Zytoplasma sichtbar. Da mit dieser aufwendigen Technik keine signifikante Häufung an fls485-Proteinen in den nativen Zellen dargestellt werden konnte, wurde in der später durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchung der Voll- und Leertransfektanten auf dieses spezielle Verfahren verzichtet, vor allem da der Transfektionserfolg selbst bereits durch molekularbiologische Methoden geclückt war (vgl. Abschnitte 3.2.2 und 3.2.3).

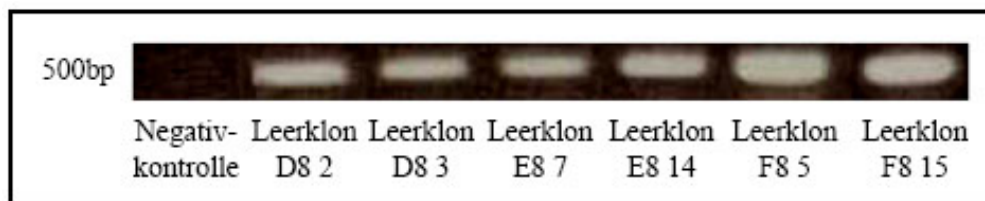
## 3.2 Forcierte fls485-Überexpression mittels stabiler Transfektion der Pankreaskarzinomzelllinie Capan-1 und der murinen Fibroblastenzelllinie NIH-3T3

Die forcierte fls485-Überexpression in zwei verschiedenen Zelllinien war der nächste Schritt in der Untersuchung des Proteins. Dabei stand die Überlegung im Raum, mit welcher Zelllinie die stabile Transfektion durchzuführen sei, da die bislang verwendeten CaCo2- und H446-

Zellen keine eindeutigen Transfektionserfolge in der transienten Transfektion zeigten, und auf der anderen Seite die stabile Transfektion mit 3T3-Zellen mit anderen Plasmiden schon früher gelungen war. 3T3-Zellen sind als murine Fibroblasten Zellen mesenchymalen Ursprungs, was für die Untersuchung der Rolle von fls485 in humanen neuroendokrinen Zellen als ein nicht ganz passendes Modell erschien. Dennoch fiel die Entscheidung aufgrund der vorherigen Transfektionserfolge auf die 3T3-Zellen, allerdings unter zusätzlicher Transfektion der epithelialen Zelllinie Capan-1. Somit war auf der einen Seite ein Erfolg der stabilen Transfektion wahrscheinlich, auf der anderen Seite hatte man im besten Fall zwei vergleichbare Modelle zur Untersuchung der Funktionalität des Proteins fls485.

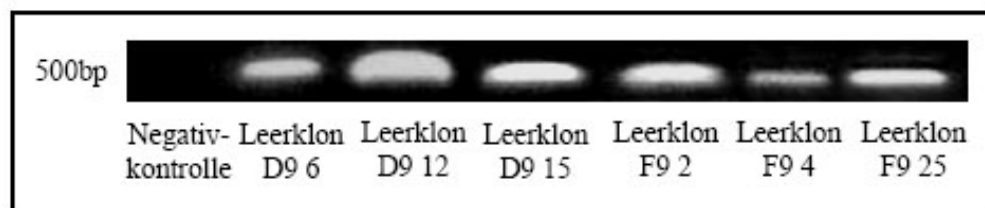
### 3.2.1 Charakterisierung der 3T3- und Capan-1-Leerklone auf DNA-Ebene

Das Einbringen des pcDNA-dest40-Plasmids in die Leertransfektanten wurde mittels einer klassischen PCR kontrolliert. Von den 37 geernteten Leerklonen der 3T3-Zellen zeigten insgesamt 10 Klone eine deutliche DNA-Bande auf Höhe des pcDNA-dest40-Fragments bei 500bp im Agarosegel (vgl. Grafik 3.12).



**Abbildung 3.12:** pcDNAdest40-Expression in 3T3-Leertransfektanten

Die Transfektionsrate der Capan-1-Zellen war deutlich niedriger, dennoch konnte bei 9 von 83 geernteten Leerklonen der pcDNA-dest40-Vektor nachgewiesen werden (vgl. Grafik 3.13). Auftrennungen von PCR-Produkten, bei denen die Wasserprobe (Negativkontrolle) eine Bande zeigte, wurden nicht gewertet und der Versuch mit derjenigen Probe wiederholt.



**Abbildung 3.13:** pcDNAdest40-Expression in Capan-1-Leertransfektanten

### 3.2.2 Charakterisierung der 3T3- und Capan-1-Vollklone auf RNA-Ebene

Die Identifizierung der erfolgreich mit dem fls485-Konstrukt transfizierten Capan-1 und 3T3-Zellen (Vollklone/Volltransfektanten) wurde mithilfe der RealTime-PCR durchgeführt. Hierzu wurden Zelllysate der unterschiedlichen Klone mittels spezifischer fls485-Primer amplifiziert und in Relation zu der  $\beta$ -Actin Expression normalisiert. Von insgesamt 75 isolierten 3T3-Vollklonen wurden im Laufe der Anzucht 22 nicht in die Bewertung aufgenommen, entweder aufgrund parasitären Befalls oder durch mangelnde Zellmasse nach der Isolation, und 3 Klone zeigten sich nach RealTime-PCR negativ. Lediglich die 7 in Grafik 3.14

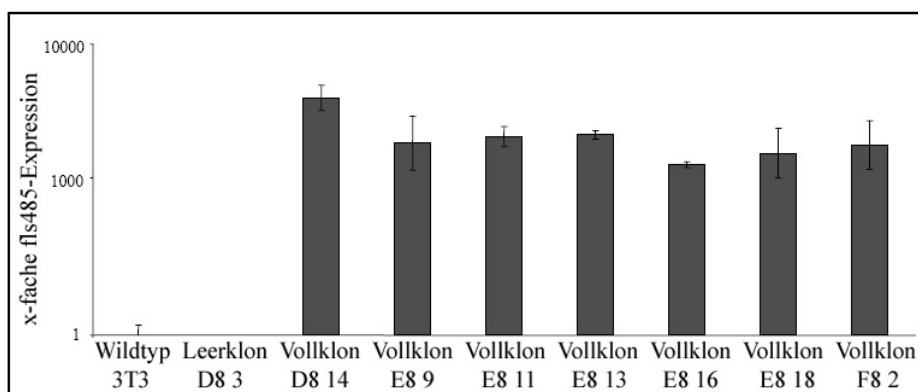


Abbildung 3.14: RT-PCR der 3T3 Wildtypzellen und deren Klone

dargestellten 3T3-Vollklone wiesen eine signifikant so stark erhöhte fls485-Expression in der RealTime-PCR im Vergleich zu den Wildtypzellen und den Leerklonen auf, dass sie anschließend auch im Western Blot auf Proteinebene erfolgreich getestet wurden.

Ebenso wurden von den zunächst 55 geernteten Capan-1-Vollklonen nur 7 erfolgreich auf Proteinebene getestet, da die fls485-Expression in der RealTime-PCR (vgl. Grafik 3.15) in diesen Klonen signifikant höher war als bei den restlichen 25 auf RNA-Ebene getesteten Capan-

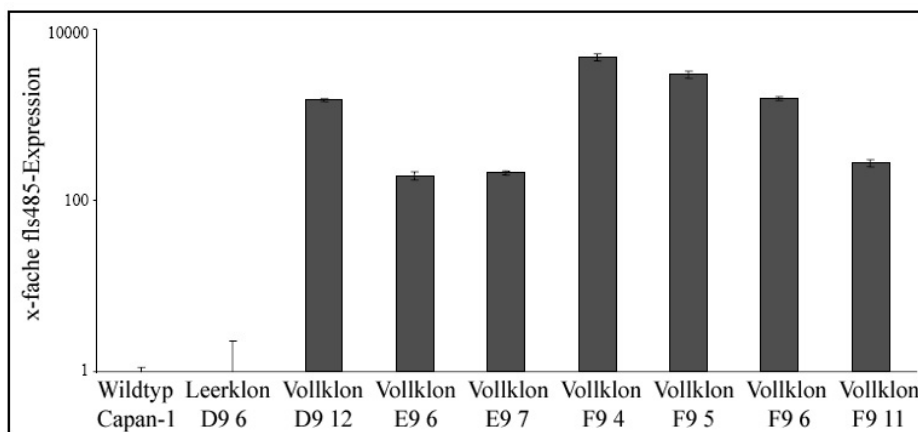


Abbildung 3.15: RT-PCR der Capan-1 Wildtypzellen und deren Klone

1-Klonen. Desweiteren fielen insgesamt 9 der Capan-1-Klone durch Absterben während der Aufzucht aus. Analog zu den Ergebnissen aus der Untersuchung des kryokonservierten Gewebes (vgl. Abschnitt 3.1.4) konnte bei vielen Klonen eine erhebliche *fls485*-Überexpression auf RNA-Ebene beobachtet werden, während auf Proteinebene nur ein durchschnittlicher bis niedriger Wert messbar war. Diese Klone wurden nicht in den weiteren Experimenten verwendet.

### 3.2.3 Charakterisierung ausgewählter *fls485*-Voll- und Leervektortransfektanten auf Proteinebene mittels Westernblotanalyse und Immunfluoreszenz

Die Western Blot Analyse der wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben ausgewählten 3T3- und Capan-1-Volltransfektanten wurde zum einen mit dem spezifisch gegen *fls485*-gerichteten Antikörper #7/1, zum anderen mit dem anti-His Antikörper von R&D, durchgeführt. Diejenigen Klone, die unter der #7/1-Markierung eine Doppelbande bei 50kDa zeigten, wurden als erfolgreich transfiziert gewertet, da die untere Bande das nativ in den Zellen vorkommende *fls485*-Protein darstellt, während die obere Bande das künstlich eingebrachte und aufgrund seines His-Tags geringfügig größere *fls485*-Protein repräsentiert (vgl. Grafiken 3.16 und 3.17). Die Verwendung des anti-His Antikörpers diente dem Nachweis des His-Tags, welches einer Markierung von 6x der Aminosäure Histidin als Kette am Ende des künstlich eingebrachten *fls485* entspricht. Bei jeder Probe, in der der Nachweis des His-Tags im Westernblot und der Immunfluoreszenz gelang, konnte von einem erfolgreichen Einbringen des Fremdplasmids und der Synthese des künstlichen *fls485*-Proteins ausgegangen werden, was einem Transfektionserfolg entspricht.

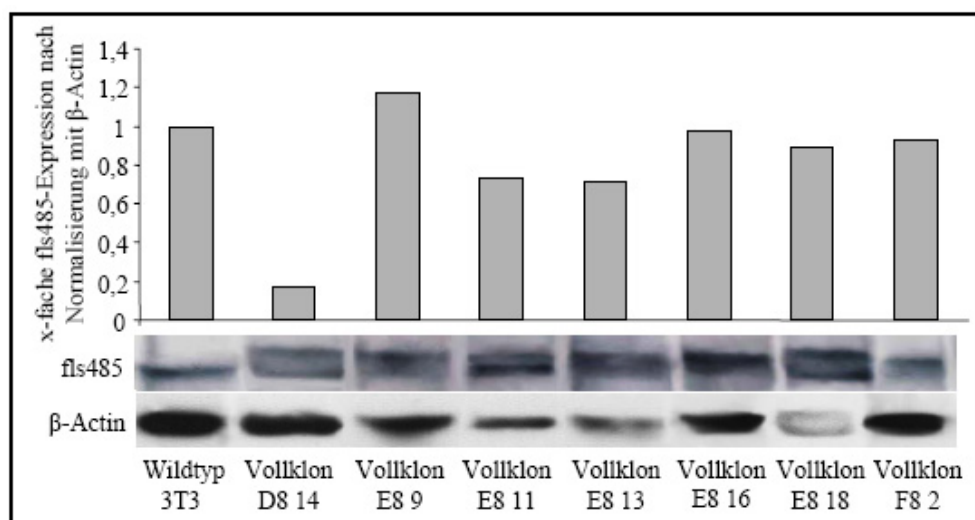
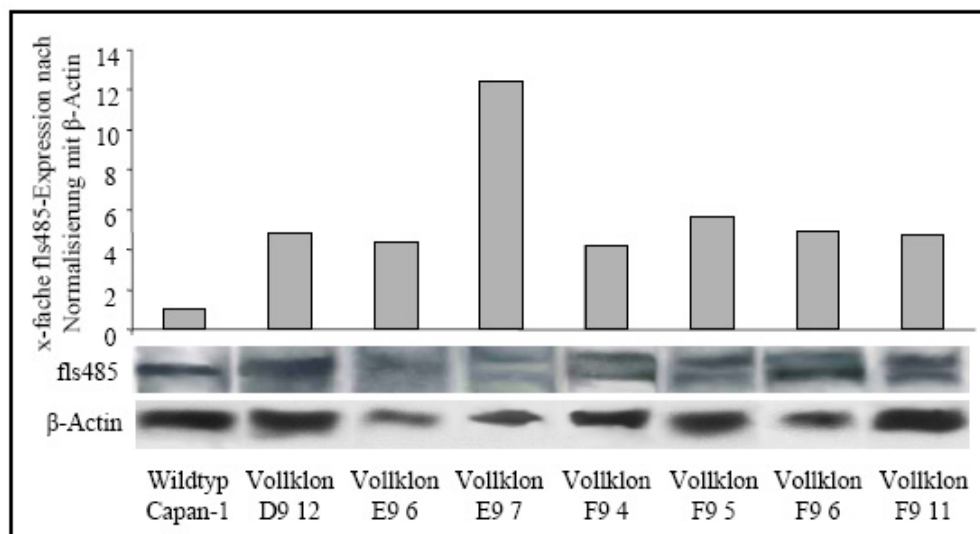
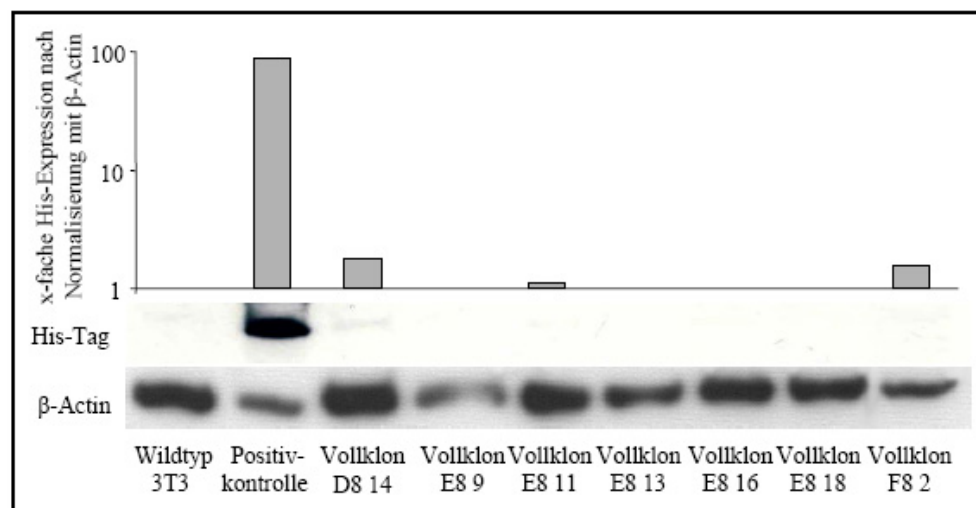


Abbildung 3.16: Westernblotergebnisse zur *fls495*-Expression in 3T3-Klonen



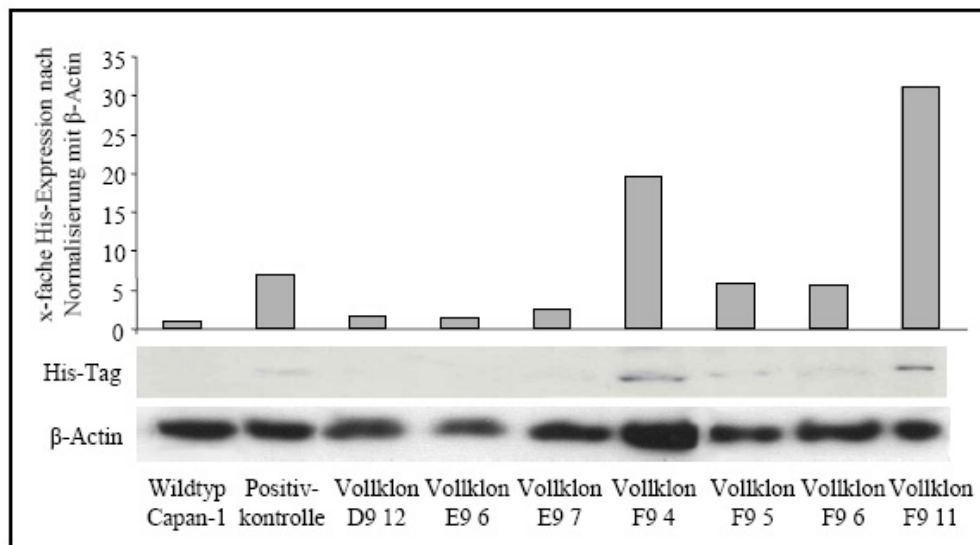
**Abbildung 3.17:** Westernblotergebnisse zur fls495-Expression in Capan-1-Klonen

Bei geglücktem Nachweis des His-Tag konnte in den folgenden Western Blot Analysen typischerweise auch hier eine Bande bei 50kDa gefunden werden. Als Positivkontrolle diente ein Klon, HepG2 B12, der bereits zuvor regelrecht transfizierten HepG2-Zellen [36], als Negativkontrolle wurde der jeweilige Wildtyp mitgeführt.



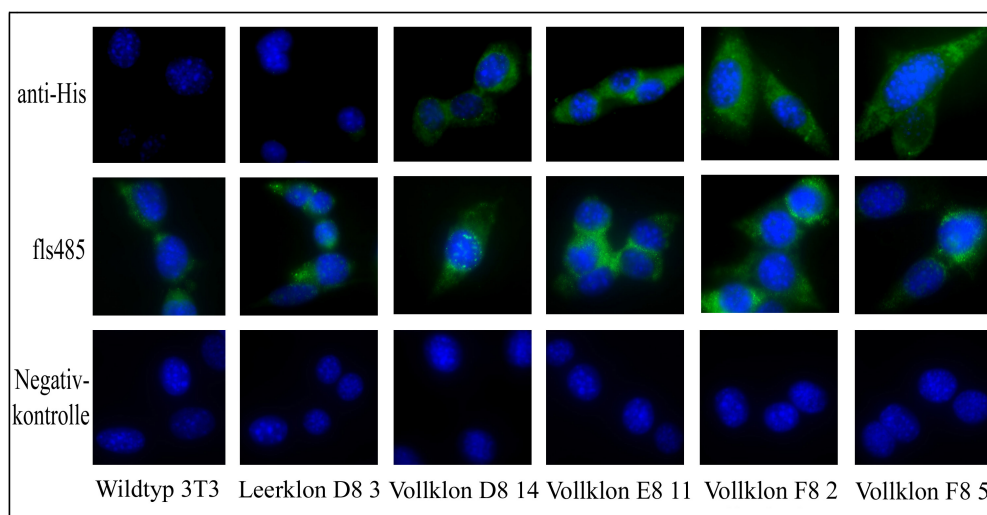
**Abbildung 3.18:** Westernblotergebnisse zum His-Tag-Nachweis in 3T3-Klonen

Wie in den Grafiken 3.18 und 3.19 sichtbar, war pro transfizierter Zelllinie nur bei zwei Klonen ein signifikanter His-Tag-Nachweis möglich, nämlich bei den 3T3-Vollklonen D8 14 und F8 2 und den Capan-1-Vollklonen F9 4 und F9 11. Daher wurde jeweils derjenige Klon für die im folgenden beschriebenen *in vitro* Experimente genutzt, der neben dem His-Tag-Nachweis ausserdem eine signifikant erhöhte Proteinexpression von fls485 zeigte.



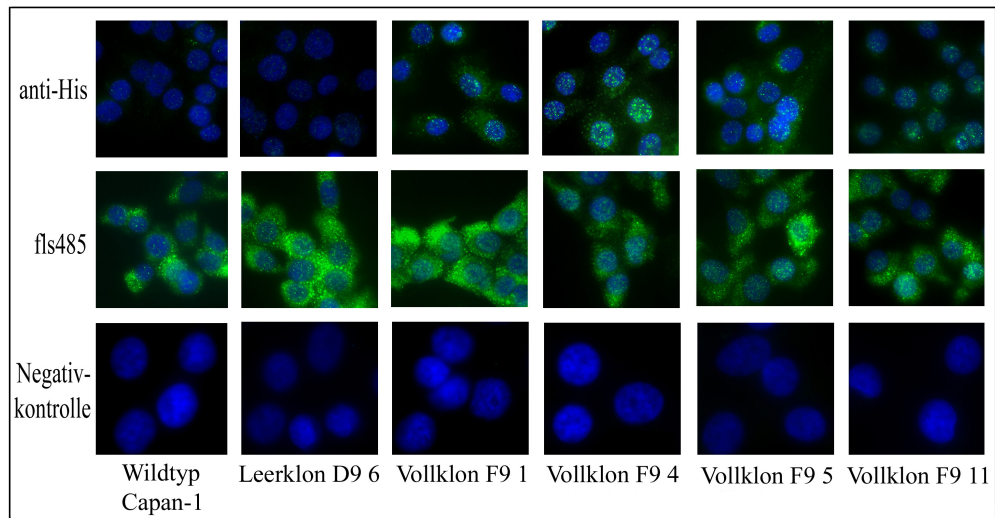
**Abbildung 3.19:** Westernblotergebnisse zum His-Tag-Nachweis in Capan-1-Klonen

Für eine größere Validität der Ergebnisse wurde zusätzlich neben dem Western Blot-Nachweis von *fls485* und dem His-Tag eine Immunfluoreszenz mit dem gleichen Ziel durchgeführt. Ausser den Wildtyp-Zellen wurden auch die Leervektorzellen mit in den Versuch eingeschlossen, um einen möglichen Einfluss des Transfektionsvorganges selbst auf das Resultat auszuschließen.



**Abbildung 3.20:** Immunfluoreszenz an 3T3-Zellen und deren Klone

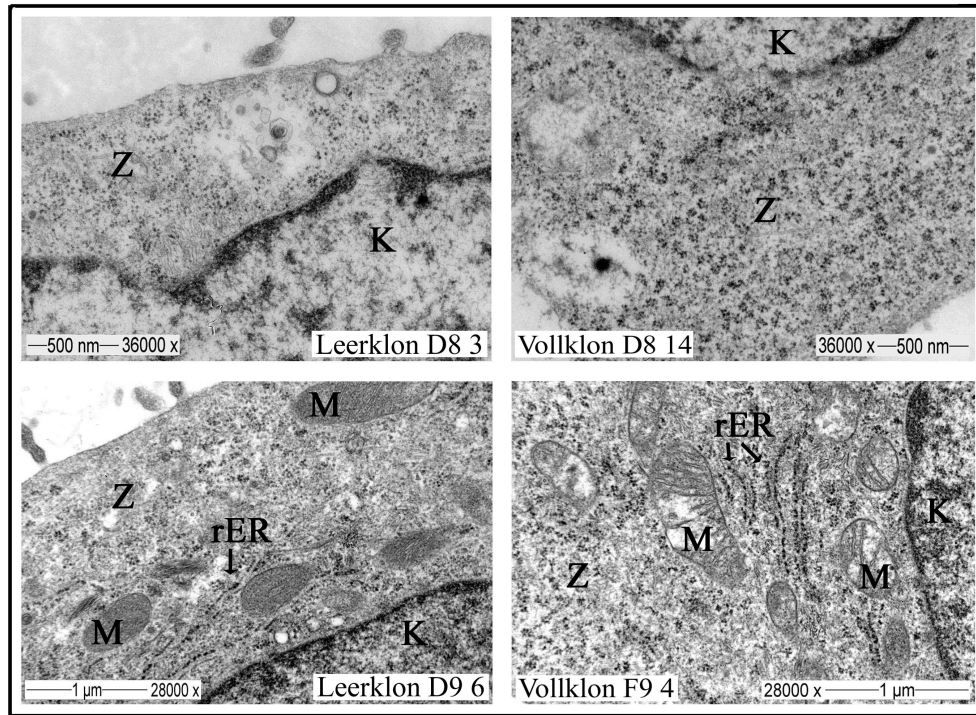
Wie in den Grafiken 3.20 und 3.21 zu sehen ist, stellte sich die Markierung von *fls485*, bzw. des His-Tags, grün fluoreszierend dar, während der Zellkern blau fluoreszierte. Hierdurch konnte neben den molekularbiologischen Untersuchungen auch auf zellbiologischer Grundlage der Transfektionserfolg nachgewiesen und die zytoplasmatische Lokalisation von *fls485* in den Transfektanten bestätigt werden.



**Abbildung 3.21:** Immunfluoreszenz an Capan-1-Zellen und deren Klone

Aus den Daten der Immunfluoreszenzfärbung wird deutlich, dass eine erfolgreiche Transfektion der Vollklone D8 14, E8 11, F8 2 und F8 5 bei den 3T3-Zellen und der Volltransfektanten F9 1, F9 4, F9 5 und F9 11 bei den Capan-1-Zellen stattgefunden hat, da auch hier ein eindeutiger Nachweis des His-Tags (siehe grüne zytoplasmatische Fluoreszenz) erfolgen konnte.

### 3.2.4 Darstellung intrazellulärer Strukturen der Transfektanten mittels Elektronenmikroskopie



**Abbildung 3.22:** Elektronenmikroskopie an Transfektanten. Zellkern (K), Zytoplasma (Z), Mitochondrien (M), raues endoplasmatisches Retikulum (rER)

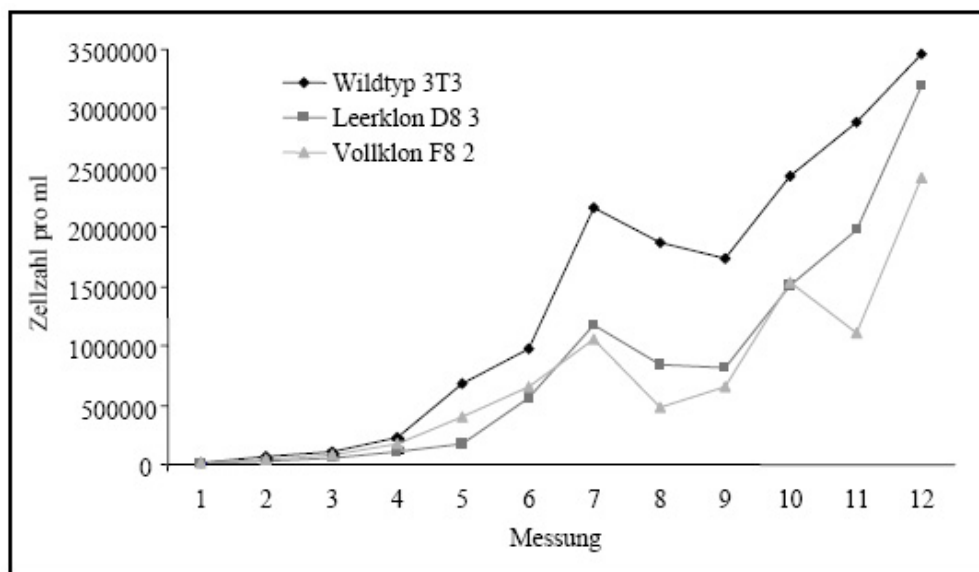
Zum Abschluss der topographischen Analyse und mit erfolgreicher stabiler Transfektion wurde eine elektronenmikroskopische Untersuchung an den ausgewählten Voll- und Leertransfektanten durchgeführt. Der Gedanke dahinter war, dass möglicherweise durch stattgefundene strukturelle Veränderungen in der transfizierten Zelle Rückschlüsse auf die funktionellen Prozesse gezogen werden können, an denen *fls485* beteiligt ist. So wurde zum Beispiel eine Zunahme an rER oder freien Ribosomen erwartet, ebenso wurde eine erhöhte Apoptoserate mit *apoptotic bodies* in Erwägung gezogen. Auf der anderen Seite wurde auf vesikuläre Strukturen geachtet, da diese bereits in den nativen Capan-1-Zellen auffällig geworden waren (vgl. Abschnitt 3.1.5). Nach Auswertung der Präparate (vgl. Abbildung 3.22) konnte lediglich ein vermehrtes Vorkommen von Intermediärfilamenten, Mitochondrien und rER in den Capan-1-Zellen festgestellt werden, wobei sich hier kein Unterschied zwischen Leer- und Volltransfektant fand. Eine signifikante Vermehrung von freien Ribosomen oder rER im Volltransfektanten ließ sich nur sporadisch finden, so dass auf ultrastruktureller Ebene von keinem Unterschied zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen ausgegangen werden muss. Ebenso scheint die Anfärbbarkeit von *fls485* in Capan-1-Zellen in vesikulärer Form eine zelltypische Besonderheit zu sein, die sich auf elektronenmikroskopischer Ebene nicht reproduzieren ließ.

### 3.3 Ergebnisse der funktionellen *in vitro* Experimente

Der letzte Schritt in der Untersuchung von fls485 im Rahmen dieser Arbeit waren die funktionellen *in vitro* Experimente. Um eine Vorstellung davon zu bekommen, welche Wirkung fls485 auf die Zelle und gegebenenfalls den Zellverband hat, wurden grundlegende Untersuchungen des Wachstums- und Apoptoseverhaltens der Zellen betreffend durchgeführt. Ein nächster Schritt wäre zum Beispiel die Untersuchung von Tumorzellen der genannten Entitäten *in vitro* und per molekularbiologischer Analysen, um einen direkten Vergleich mit den künstlich transfizierten Zellen herstellen zu können.

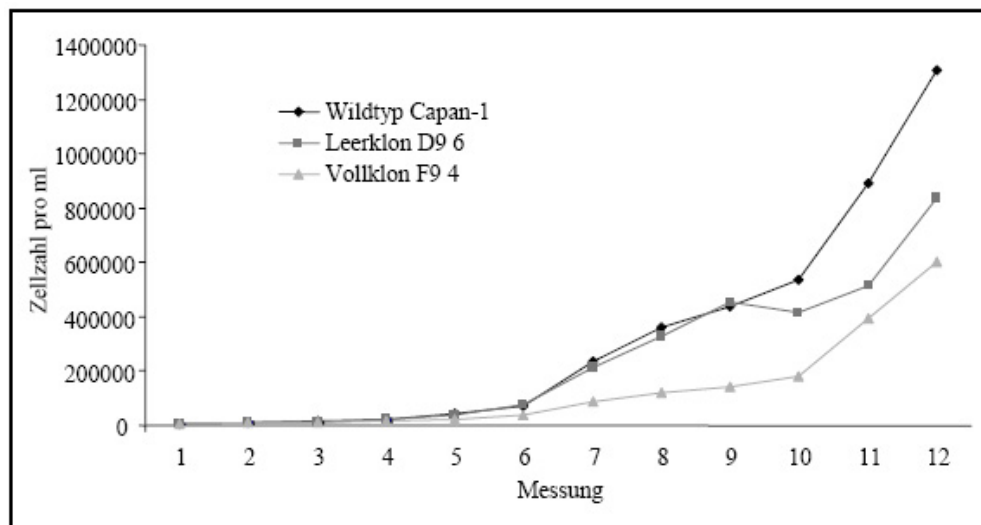
#### 3.3.1 Wachstumsverhalten der stabilen Transfektanten

Das zunächst vordringlichste Experiment bei der Untersuchung des Einflusses von fls485 auf die Funktion der Zellen war das Erstellen einer Wachstumskurve. Hier zeigte sich neben einem generell schnelleren Wachstum aller 3T3-Zelltypen im Vergleich zu den Capan-1-Zellen, dass vor allem bei den Capan-1-Vollklonen das Wachstum unter einer erhöhten fls485-Expression im Gegensatz zu den Wildtyp- und Leerklon-Zellen deutlich verringert ist (vgl. Grafik 3.24).



**Abbildung 3.23:** Wachstumsverhalten der 3T3-Transfektanten

Nach 12 Messungen über zwei Wochen entsprach die Zellanzahl der Capan-1-Volltransfektanten knapp 50% der der Wildtyp-Zellen und nur 70% der Zellzahl der Leertransfektanten. Ebenso war das Wachstum der 3T3-Zellklone verlangsamt, da hier nach 12 Messungen die Vollklone eine Zellmasse von 70% gegenüber den Wildtyp-Zellen und 77% im Vergleich zu den Leerklon-Zellen aufwiesen (vgl. Grafik 3.23). Dieses Ergebnis würde zu der aus den immunhistologisch Färbungen gezogenen Annahme passen, dass fls485 in schlechter differenzierten und hochmalignen Tumoren geringer exprimiert wird als in höher differenzierten, langsamer

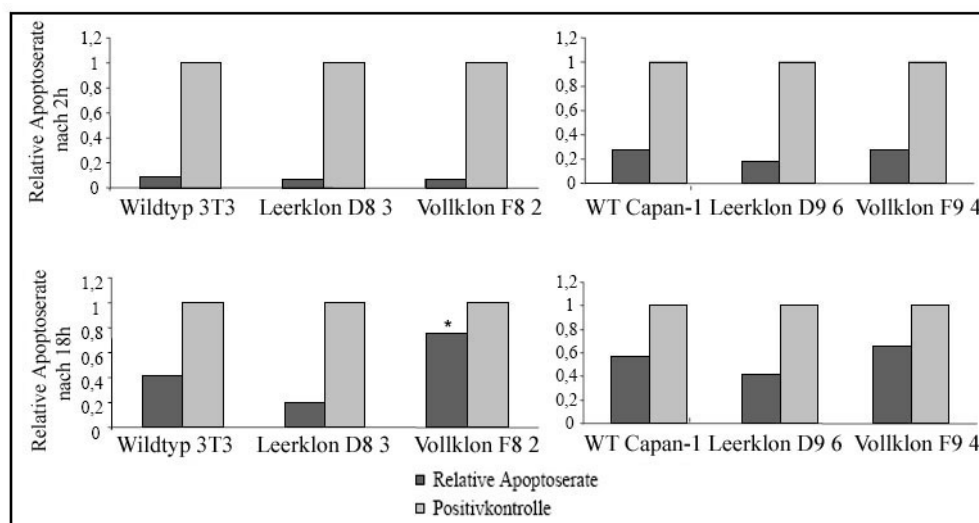


**Abbildung 3.24:** Wachstumsverhalten der Capan-1-Transfektanten

wachsenden Tumorentitäten. Neben dem verlangsamten Wachstum der Volltransfektanten zeigten auch die Leerkclone ein im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen etwas reduziertes Teilungsvermögen. Dies lässt sich am ehesten durch den Einfluss der Transfektion an sich erklären, da das Einbringen fremder DNA und das Ausüben des Selektionsdruckes mittels G418 Stress für die Zellen bedeutet und sich somit die Zellstoffwechselabläufe verlangsamen können.

### 3.3.2 Apoptoseverhalten der stabilen Transfektanten

Die Ergebnisse des Wachstumsverhaltens der Volltransfektanten führten zu der Überlegung, ob die reduzierte Zellmasse der Vollklone vielleicht nicht ausschließlich durch ein geringeres Wachstumspotential der Zellen zu erklären waren, sondern auch aufgrund einer gesteigerten Rate des programmierten Zelltodes, der Apoptose, zu begründen sind. Daher werden



**Abbildung 3.25:** Apoptoseneigung der 3T3- und Capan-1-Transfektanten nach 2h und nach 18h

in der Grafik 3.25 die Ergebnisse des Apoptose-Assays nach 2h und nach 18h dargestellt, wobei nach 2h Inkubationszeit keine signifikant erhöhte Apoptoserate zu messen war. Im Gegensatz dazu zeigten die 3T3-Volltransfektanten nach 18h Inkubationszeit eine signifikant erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu den Leertransfektanten, jedoch nicht im Vergleich zu den Wildtypzellen. Bei den Capan-1-Volltransfektanten konnte ebenfalls eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu den Wildtypzellen und den Leertransfektanten gemessen werden, welche jedoch in beiden Fällen nicht signifikant war. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die verlangsamte Wachstumsrate der Volltransfektanten nicht durch eine primär erhöhte Apoptoserate zu erklären ist, sondern vielmehr durch einen dämpfenden Effekt von fls485 auf den Zellzyklus.

## 4 Diskussion

Die individuelle Zusammensetzung von Metaboliten, Proteinen und anderen Molekülen einer Zelle kann uns Auskunft geben über deren aktuelle Stoffwechsellage und pathologische oder reaktive Zustände [37, 38]. Dabei sind nicht nur Schwankungen in der Expression verschiedener Moleküle interessant, sondern auch deren Kompartimentalisation und damit ihre spezielle Funktion in der jeweiligen Zelle und Situation. Anhand der drei großen Molekülebenen der Biochemie - DNA, RNA und Proteine - lassen sich spezifische Expressionsprofile verschiedener Gewebe- und Zelltypen analysieren und so Rückschlüsse auf ihre Funktion und Veränderungen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen ziehen. Auf Genebene spricht man dabei vom *Genom* einer Zelle, auf Proteinebene vom *Proteom*, d.h. den jeweilig vorhandenen Proteinen innerhalb einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt. Interessant dabei sind Veränderungen dieser Zusammensetzung, wie zum Beispiel im Rahmen der Tumorgenese, wenn aus einer normalen Körperzelle eine Tumorzelle entsteht. Unterschiede im Genom oder Proteom dieser Zelle können Hinweise erbringen auf spezifische Effektormoleküle, die entweder die Tumorgenese unterstützen (*Onkogene*) oder sie hemmen (*Tumorsuppressorgene*). Auch die vermehrte Expression von Proteinen, die von der Zelle sezerniert und damit gegebenenfalls in den Blutkreislauf gelangen, ist von großem Interesse, da hier in der klinischen Anwendung mögliche Tumorfrühmarker oder Moleküle von prädiktivem prognostischem Wert erkannt werden können. Gerade in der Frühdiagnostik von selteneren Tumorentitäten wie neuroendokrinen Tumoren, deren Entität aufgrund der Vielfalt an verschiedenen Ursprungszellen schwer zu spezifizieren ist, könnten spezifische Moleküle der Tumorzellen wegweisend zur Diagnostik und letztlich auch zum Therapieerfolg beitragen [39]. Da Patienten häufig erst durch die Symptome auffallen, die aufgrund von Metastasierung der Primärtumoren auftreten und somit in vielen Fällen die operative Therapie limitiert ist, wären neue diagnostische Ansätze gerade für diese Tumorentität wünschenswert.

Zur Analyse von speziellen Proteinen oder dem Genom und Proteom einer Zelle insgesamt sind viele gängige Methoden etabliert, die in den letzten Jahren um einige Techniken erweitert wurden. Unter anderem wird im Folgenden auf diese Methoden näher eingegangen, um deren Vor- und Nachteilen zu diskutieren und so die Validität der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse besser beurteilen zu können. Außerdem ist ein systematischer Überblick über die aktuellen Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der neuroendokrinen Tumorforschung nötig, insbesondere da die wissenschaftliche Lage zu dem untersuchten Protein fls485 noch recht unvollständig ist und daher kaum Vergleichsergebnisse zur kritischen Diskussion vorliegen.

## 4.1 Aktueller Stand der Forschung

In den letzten Jahren wurde vermehrt auf dem Gebiet der neuroendokrinen Tumorbilogie geforscht, doch bei der Zusammenfassung dieser Ergebnisse wird in mehreren Übersichtsarbeiten deutlich, wie unvollständig die wissenschaftlichen Erkenntnisse in diesem Bereich nach wie vor sind [40, 41, 42]. Ein direkter Zusammenhang zu dem in dieser Arbeit untersuchten Protein fls485 und der Tumorgenese neuroendokriner Neoplasien wurde dabei ebensowenig beschrieben wie eine vermehrte Chaperonaktivität in dieser Tumorklasse. Dennoch sollen an dieser Stelle die wenigen publizierten Daten zu fls485 und die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zur Tumorbilogie dieser Entität beschrieben werden, da einige Resultate dieser Arbeit und der aktuelle Stand der Forschung zu neuroendokrinen Tumoren eine Korrelation nicht ausschließen.

### 4.1.1 Studienlage zum putativen Chaperon fls485

Das Gen fls485, welches für das gleichnamige Protein kodiert, wurde bislang nur in zwei Publikationen beschrieben und ist daher lediglich ansatzweise untersucht. Bekannt ist die Genlokalisierung auf Chromosom 3p25.3, die erstmalig in einer cDNA Bibliothek aus fetaler hepatischer mRNA beschrieben wurde, und die Gensequenz mit 3 offenen Leserastern (C3orf32), die durch alternatives Spleißen, alternative Promotoren und posttranslationale Modifikationen zu verschiedenen Proteinisoformen führen können [22, 43]. Diese Erkenntnis konnte durch die Versuche im Vorfeld dieser Arbeit bestätigt werden, da die monoklonal erzeugten Antikörper gegen das Protein fls485 zwei verschiedene Varianten von fls485 erkannten (39 kDa, bzw. ca. 55kDa). Desweiteren wurde in einer Studie die mögliche Funktion von fls485 als Tumorsuppressorgen in monosomalen uvealen Melanomen diskutiert, da das Gen fls485 innerhalb des Suszeptibilitätslokus von uvealen Melanomen (*UVM*) auf Chromosom 3p25 liegt [34]. Die Erkenntnis der vorliegenden Arbeit, dass die Expression von fls485 in niedrig differenzierten neuroendokrinen Karzinomen geringer ist als in höhergradig differenzierten - und damit dem Ursprungsgewebe ähnlicheren - Tumoren, könnte diesen Verdacht bestätigen, vor allem da sowohl neuroendokrine Zellen als auch Melanozyten den gleichen embryonalen Ursprung haben und somit in ähnlicher Weise auf den Einfluss von fls485 während der Tumorgenese reagieren könnten.

Die zweite Arbeit zu fls485 diskutiert die unterschiedliche Expression von fls485 in normaler und durch Zöliakie pathologisch veränderter Dünndarmschleimhaut [22]. Zum Einen wurde eine ubiquitäre Expression von fls485 in der Dünn- und Dickdarmschleimhaut nachgewiesen, wobei vor allem in der Dünndarmschleimhaut ein vermehrtes Vorkommen von fls485 in den oberen Abschnitten der Krypten-Zotten-Achse (KZA) und in enterochromaffinen Zellen festgestellt werden konnte. Um die Abhängigkeit der fls485-Expression von der Lokalisation innerhalb der KZA untersuchen zu können, wurde an Zöliakie erkrankte Dünndarmschleimhaut analysiert, da bei dieser Erkrankung die Architektur der KZA mit zunehmender Schwere

der Erkrankung gestört ist und die Zellen einem vermehrtem oxidativen Stress unterliegen. So konnte ab einem Zöliakiestadium IIIa-c ein signifikanter Unterschied der fls485-Expression im Vergleich zu normaler Dünndarmschleimhaut gezeigt werden, was im Rahmen einer möglichen Chaperonaktivität von fls485 für eine zunehmende Induktion dieses Proteins bei zellulärem Stress spräche [22]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten die Expression von fls485 innerhalb der KZA und den enteroendokrinen Zellen bestätigen (vgl. Abbildung 3.2), was zur Untersuchung von anderen Geweben und Zellen neuroendokrinen Ursprungs Anlass bot. Die hierbei erhobenen Daten werden in Abschnitt 4.2.2 genauer diskutiert, doch um diese besser in den aktuellen Kontext einordnen zu können, soll vorher im folgenden Abschnitt ein kurzer Überblick über die aktuelle wissenschaftliche Lage zu neuroendokrinen Tumoren gegeben werden.

#### 4.1.2 Genomische Aberrationen in der Pathogenese neuroendokriner Tumoren

Die aktuelle Studienlage zur Untersuchung von neuroendokrinen Tumoren (NET) auf der Genom- und Proteomebene macht deutlich, dass man zunächst die Einteilung dieser Tumorentität überdenken sollte, da es zu den verschiedenen Tumorarten äußerst heterogene Ergebnisse hinsichtlich ihrer genomischen Veränderungen und damit ihrer Genexpressionsprofile gibt [42, 44]. Dabei liegt die Überlegung zugrunde, dass Tumoren mit - zum Beispiel - der gleichen Deletion eines Allels eher in eine Gruppe sortiert werden sollten, als solche zusammen zu klassifizieren, die sich hinsichtlich ihres Wachstums- oder Differenzierungsmusters ähneln (vgl. Abschnitt 1.1.2). Da diese molekulargenetischen Unterschiede aber noch weitgehend unbekannt sind, wurden in den aktuellen Studien neuroendokrine Tumoren vorwiegend in zwei Gruppen eingeteilt:

Die erste Gruppe umfasst NETs, die im Rahmen eines genetischen Syndroms, wie zum Beispiel der *Multiplen Endokrinen Neoplasie 1 & 2* oder des *von-Hippel-Lindau Syndroms*, auftreten. Hierbei kommt es durch somatische oder Keimbahnmutationen zu einem komplexen Bild erblicher Krankheiten, die häufig mit dem Auftreten neuroendokriner Tumoren assoziiert sind. Die betroffenen Gene wie das *MEN1-Gen* auf Chromosom 11q13 oder das *VHL-Gen* auf Chromosom 3p25 sind dabei in der Regel bereits bekannt und scheinen bei der Entstehung sporadisch auftretender NETs keine Rolle zu spielen. Vielmehr werden weitere mögliche Tumorsuppressorgene auf dem Genlokus 3p25 diskutiert, da hier in einer Studie von Lott *et al.* [45] chromosomale Aberrationen festgestellt wurden, die mit der Tumorgenese sporadisch auftretender NETs assoziiert sein könnten [42]. Interessant hierbei ist, dass das in dieser Arbeit untersuchte Gen fls485 ebenfalls auf diesem Genort lokalisiert ist und somit nicht nur eine mögliche Tumorsuppressorfunktion bei der Entwicklung uvealer Melanome, sondern auch im Zusammenhang mit NETs bestehen könnte (vgl. Abschnitt 1.2.3).

In der zweiten Gruppe werden die sporadisch auftretenden neuroendokrinen Neoplasien un-

tersucht, deren molekulargenetischen Veränderungen während der Tumorgenese noch weitgehend unbekannt sind und deren Genexpressionsprofile wegweisende Erkenntnisse für Diagnostik und Therapie dieser Tumorgruppe liefern können. Diese Gruppe lässt sich weiter in funktionelle - Tumoren mit klinisch relevanter Hormonproduktion - und nicht-funktionelle Tumoren unterteilen, wobei nicht-funktionelle Tumoren des Pankreas in der Regel mehr genetische Aberrationen zeigten als funktionell aktive Tumoren wie Gastrinome oder Insulinome [46]. Allen Studien der letzten Jahre ist gemein, dass es wenig konkordante Ergebnisse hinsichtlich der Genexpressionsprofile der verschiedenen NETs gibt [47]. Je nach Lokalisation (Magen, Pankreas, Lunge, Dünn- und Dickdarm), Metastasierungverhalten und klinischem Erscheinungsbild (Auftreten des sogenannten *Karzinoidsyndroms* mit Flush, Diarrhoe und kardialer Klappenfibrose) wurden eine Vielzahl von genetischen Aberrationen beschrieben. Um den Rahmen nicht zu sehr auszudehnen, sollen an dieser Stelle nur die häufigsten und wiederholt beobachteten Veränderungen während der Tumorgenese zusammengefasst werden:

1. Verlust der Heterozygotie bestimmter Gene, welcher im Rahmen von familiären Syndromen wie MEN1 oder der Neurofibromatose von Recklinghausen auftritt, ist nicht mit sporadisch auftretenden NETs assoziiert [41, 48].
2. In sporadisch auftretenden NETs ist der Verlust chromosomaler Strukturen häufiger als ein Zugewinn chromosomalen Materials, wobei die genomischen Aberrationen mit Fortschreiten der Tumorgenese und bei Auftreten von Metastasen zunehmen und akkumulieren [41, 49].
3. Bekannte Tumorsuppressor- und Onkogene wie *p53*, *Retinoblastom Tumorsuppressor-gen(Rb)* oder *ras* zeigen keinen signifikanten Einfluss auf die Tumorgenese sporadisch auftretender NETs [42, 48].
4. Der Verlust von Chromosom 11q, 16q und 18q wurde in verschiedenen Studien in NETs des Dünndarms nachgewiesen [42, 48, 50], ebenso zeigten diese Tumoren eine signifikante Erhöhung des Homeobox-Gen Produkts CDX-2, welches bereits bei der normalen neuroendokrinen Differenzierung eine wichtige Rolle spielt (vgl. Abschnitt 1.1.3) und in diesem Zusammenhang ein spezifischer Marker für gut differenzierte NETs des Dünndarms sein könnte [51].
5. In pankreatischen NETs (PNET) konnten Duerr *et al.* einen signifikanten Unterschied in den Genexpressionsprofilen benigner im Vergleich zu malignen PNETs feststellen, was die Validität der WHO-Klassifikation in dieser Tumorgruppe bekräftigt [41].
6. NETs unterschiedlicher Lokalisationen wie des GI-Traktes, der Lunge oder des Pankreas sollten aufgrund ihres signifikant unterschiedlichen Genexpressionsmusters getrennt voneinander klassifiziert werden [47, 50].
7. *Chromogranin A*, ein Mitglied der Chromogranin-Familie, ist nach wie vor der globalste serologische und immunhistochemische Tumormarker zur Detektion von NETs des Gastroentero-pankreatischen Systems. Ein kombinierter Nachweis von Chromogranin A und Pankreatischem Polypeptid hat sich als sensitiver Marker für nicht-funktionelle PNETs heraus-

gestellt [40]. Ebenso scheint ein weiteres Mitglied der Chromogranin-Familie, *Neuroendocrine secretory protein 55*, *NESP-55*, ein spezifischer Marker für PNETs und Phäochromozytome zu sein [40].

8. Zur Chaperonaktivität in neuroendokrinen Tumoren liegen aktuell keine Daten vor, ob-  
schon für einen Vertreter der Chaperone, *Hsp90*, bekannt ist, dass dessen Expression vor  
allem in malignen Zellen gesteigert ist. Als Stabilisator vieler für das Wachstum der Zelle  
verantwortlicher Moleküle fungiert es hier als Onkogen und ist Ziel neuer therapeutischer  
Ansätze, die über eine Inhibition von Hsp90 eine erhöhte Apotoserate in malignen Zellver-  
bänden herbeiführen möchten [52, 53, 54].

Neben den genannten Erkenntnissen bezüglich der Genom- und Proteomanalytik neuroen-  
dokriner Tumoren gibt es noch viele weitere Gene und deren Produkte, die in Microarray-  
Techniken spezifiziert, jedoch nicht reproduzierbar nachgewiesen werden konnten. Die meis-  
ten Arbeitsgruppen begründen diesen Umstand mit heterogenen Untersuchungsmaterialien  
(Lokalisation und Aggressivität des Tumors, Alter und Geschlecht der Patienten, eventuelle  
Therapiemaßnahmen) und unterschiedlicher Methodik [44], allen gemein ist jedoch die Fest-  
stellung, dass es auf diesem Gebiet noch zuwenig redundante Ergebnisse gibt, um sichere  
Parameter für Diagnostik und Therapie festlegen zu können [42].

## 4.2 Untersuchungsergebnisse im Kontext der aktuellen Methodik zur Proteomanalyse

Die Struktur der vorliegenden Arbeit basiert auf einer zweiseitigen Herangehensweise an  
die Thematik: Auf der einen Seite wurde eine topographische Analyse mittels verschiede-  
ner bildgebender Methoden wie der Immunhistochemie, der Immunfluoreszenz oder der Im-  
munogoldtechnik durchgeführt. Auf der anderen Seite wurden erste funktionelle Aspekte  
von fls485 untersucht, indem eine stabile Transfektion an einem passenden Zelllinienmodell  
durchgeführt wurde. Der Transfektionserfolg wurde wiederum durch verschiedene Methoden  
bestätigt, um möglichst valide Ergebnisse zu erhalten.

Die verwendeten Methoden, ihre Vor- und Nachteile und die beste Etablierung im jeweili-  
gen Versuchsaufbau sollen nun anhand der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen und eigener  
Erfahrungswerte diskutiert werden.

### 4.2.1 Antikörpervalidierung

Der in den meisten Experimenten verwendete monoklonale Antikörper gegen fls485, #7/1,  
wurde im Vorfeld dieser Arbeit durch Immunisierung von männlichen Mäusen mit einem  
aufgereinigten Fusionsprotein (bestehend aus der fls485-Sequenz (bp543-1017) und einem  
Hexa-Histidin-Tag) generiert. Da der Versuch, Antikörper gegen eine kürzere Sequenz von  
fls485 mit zwei Epitopen zu erzeugen, initial fehlschlug, wurden verschiedene Validierungsex-

perimente durchgeführt, um bei der sekundär verwendeten, längeren Sequenz mit unbekannter Antikörperbindungsstelle eine Spezifität des Antikörpers gegen fls485 zu garantieren. So konnte in mehreren Experimenten (ELISA, transiente Transfektion mit EGFP-Konstrukt, konkordante Ergebnisse in Immunhistochemie und mRNA- *in situ* Hybridisierung) gezeigt werden, dass es zum einen verschiedene Klone des Antikörpers gab, und dass diese unterschiedliche Isoformen von fls485 valide erkannten [22].

Um die Charakterisierung des Antikörpers #7/1 abzuschließen, sollte als letztes ausstehendes Experiment der Nachweis von fls 485 in einem Proteinspot erfolgen, welcher durch #7/1 nach 2D-Gelelektrophorese im Westernblot erkannt wurde. Zu diesem Zweck wurde ein Zelllysats aus einer Adenokarzinom-Zelllinie *LoVo* und später aus Volltransfektanten der fls485-Klone gewonnen, wobei letzteres mittels Immunpräzipitation gegen das His-Tag aufgereinigt wurde (vgl. Abschnitt 3.1.1). Leider konnte im Endergebnis nicht der gewünschte Nachweis erbracht werden, weshalb an dieser Stelle die möglichen Fehlerquellen diskutiert werden sollen.

Die Westernblot-Ergebnisse zur Überprüfung der Immunpräzipitation belegen eine Aufreinigung des Proteingemisches, was allerdings auch mit einem deutlichen Verlust an Probenmasse einherging (vgl. Abbildung 3.1). Diese Problematik bei der Aufreinigung von hochkomplexen Proteingemischen wird auch in anderen Arbeiten beschrieben, die zwar die Aufreinigung mittels Immunpräzipitation oder anderen Bindungsassays als deutlichen Vorteil bei der späteren Identifikation in der 2D-Gelelektrophorese und in der nachfolgenden Massenspektrometrie sehen. Auf der anderen Seite jedoch kann der nun geringe Proteingehalt der Probe bei positiven Nachweis zwar sehr viel spezifischere, aber dafür auch weitaus häufiger falsch-negative Ergebnisse liefern [55]. Festzuhalten ist in diesem Zusammenhang jedenfalls, dass eine ausreichende Proteinmenge mittels Quantifizierung nach Immunpräzipitation in dieser Arbeit sichergestellt wurde, da durch die Verwendung von Zellkulturmaterial keine mengenmäßige Limitierung des Probenmaterials vorlag.

Der Grund für das negative Ergebnis dieses Experiments sollte also in den nachfolgenden Schritten, der zweidimensionalen Gelelektrophorese und der Massenspektrometrie, gesucht werden. Dafür werden zunächst die durch andere Arbeitsgruppen beschriebenen Vor- und Nachteile dieser Methoden diskutiert:

Generell wird die Auftrennung und Identifikation von Proteinen mittels Gelelektrophorese und Massenspektrometrie als einer der Goldstandards in der Proteomanalytik betrachtet [39, 56]. Gerade die Weiterentwicklung von normaler Silber- oder Coomassiefärbung eines 2D-Gels hin zur Färbung mit fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern und internem Standard (Fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis, DIGE) stellte eine deutliche Verbesserung dieser Methodik dar [57]. Zum Einen werden für die neue Methode deutlich geringere Proteinmengen benötigt, zum Anderen fehlt bei der alten Methode ein interner Standard, was zu einer schlechten Reproduzierbarkeit und stärkeren Abweichungen zwischen einzelnen Gelen führt [55]. Weitere Vorteile der neuen Methode sind die bessere Vergleichbarkeit von Proben, da bis zu drei Proben gleichzeitig in einem Gel untersucht werden können,

und eine mögliche Identifizierung von posttranslationalen Modifikationen, die durch eine Lateralverschiebung der Proteinspots auffällig wird [56].

Ein deutlicher Nachteil der 2D-Gelelektrophorese insgesamt ist die Interferenz von reichlich vorkommenden Proteinen mit den ggf. nachzuweisenden weniger häufig vertretenen Proteinen innerhalb einer Probe. Dieses Problem tritt vor allem dann auf, wenn Probenmaterial aus Zelllysaten oder Gewebsextraktionen gewonnen und nicht - wie zum Beispiel durch Immunpräzipitation - aufgereinigt wurde [39, 56], weshalb dieser Umstand in dieser Arbeit keine Rolle spielen sollte. Ebenso können stark basische oder saure und hydrophobe Proteine unter Umständen nicht detektiert werden, da hier die Auftrennung nicht exakt genug ist und die Proteinspots eine unzureichende Auflösung zeigen [56]. Bei einem pH-Wert von 9,2 von fls485 am isoelektrischen Punkt kann dieses Problem ebenfalls vernachlässigt werden. Im Gegensatz dazu kann das durch alternative Spleißen und posttranslationale Modifikationen bedingte Vorkommen von verschiedenen Isoformen eines Proteins in gleich mehreren Spots die Analyse eines 2D-Gels erschweren und somit als Ursache für das Negativresultat in Frage kommen [56, 38].

Ein weiteres Problem, das vor allem die Analyse mittels Massenspektrometrie betrifft, sind Probenkontaminationen mit Keratin aus Haaren oder Hautschüppchen, die das gesuchte Protein innerhalb dieser Keratin-Peaks maskieren können. Ebenso kann die Proteinmenge innerhalb eines Spots zwar zur Identifikation mittels 2D-Gelelektrophorese ausreichend, aber für die MS-Analyse insuffizient gewesen sein [55, 57]. Eine erhöhte Validität der Ergebnisse erhält man daher nur, wenn zwei unterschiedliche MS-Analyse-Techniken wie MALDI-MS (Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry) und LC-MS (electrospray liquid-chromatography mass spectrometry) kombiniert werden und das gleiche Ergebnis liefern, wohingegen Ergebnisse zwischen DIGE-, MS- und Westernblot-Analysen nicht zwingend übereinstimmen müssen [38, 55, 58].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mehrere Fehlerquellen als Ursache für das Negativergebnis in Betracht kommen:

1. Probenkontaminationen bei der weiteren Verarbeitung stellen eine mögliche Ursache dar.
2. Der Gehalt von fls485 innerhalb der identifizierten Spots könnte für eine valide MALDI-MS-Analyse zu gering gewesen sein.
3. Da eine Verwendung von fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern (2D-DIGE) zur Zeit des Experiments nicht zur Verfügung stand und stattdessen eine Gesamtfärbung des Gels mit Syproruby erfolgte (vgl. Abschnitt 2.4.7), könnten Gel-zu-Gel Variationen zum Ausschneiden falscher Spots geführt haben. Auch der bei dieser Methode nicht vorhandene interne Standard kann zu dieser Problematik beigetragen haben.
4. Bekannte Phänomene wie Wellung oder Einlaufen der Gele während des Ausschneidens der Proteinspots [57] können ebenfalls zur Selektion falscher Gelbereiche geführt haben.

Da der fls485-Antikörper #7/1 im Vorfeld dieser Arbeit bereits durch andere Methoden ausreichend charakterisiert wurde [22] und die oben geschilderte Problematik einen Metho-

dikfehler nicht ausschließt, wurde die Spezifität des Antikörpers gegen fls485 für die folgenden Experimente als bewiesen betrachtet.

### 4.2.2 Topographische Analyse

Die topographische Analyse steht meist an erster Stelle, wenn nicht das gesamte Proteom einer Zelle, sondern gezielt einzelne Proteine untersucht werden sollen. Der Hintergrund dieser Überlegung ist auf der einen Seite, dass man über eine eventuelle gewebs- oder zelltypspezifische Lokalisation Rückschlüsse auf die funktionelle Rolle des untersuchten Moleküls ziehen kann, auf der anderen Seite bieten topographische Analysen aber auch wichtige Anhaltspunkte für die weiteren Untersuchungen, wie zum Beispiel auch funktionelle Assays. Aus diesen Gründen wurde auch in dieser Arbeit mit der Frage nach der Lokalisation von fls485 begonnen, der mithilfe von drei verschiedenen Methoden nachgegangen wurde. Die Validität der gewonnenen Ergebnisse soll im Folgenden anhand der wissenschaftlich üblichen Vorgehensweise und der Fehlerquellen dieser Methoden diskutiert werden.

#### Immunhistochemie

Der Erfolg einer validen immunhistochemischen Untersuchungsreihe hängt entscheidend von der Technik des *Antigen Retrieval* ab [59, 60]. Da in dieser Arbeit nur formalin-fixierte, in Paraffinblöcke eingebettete Gewebsschnitte mit dieser Methode untersucht wurden, mussten durch eine geeignete Vorbehandlung die durch die Formalinfixierung entstandenen Querverbindungen gelöst und somit die Antigene - in diesem Fall das Protein fls485 - wieder freigelegt werden. Dafür wurde zunächst eine Testreihe an Normalgewebe durchgeführt, dessen Expression von fls485 bereits bekannt war. Hier bot sich die Schleimhaut des Dünndarms an, da schon in einer vorherigen Arbeit die fls485-Expression innerhalb diesen Gewebes beschrieben worden war [22].

Zur Austestung der besten Antigen-Retrieval-Technik wurden verschiedene Ansätze ausprobiert wie Erhitzen in der Mikrowelle oder im Wasserbad mit verschiedenen Temperaturen und Pufferlösungen (Tris/EDTA, Citrat) mit unterschiedlichen pH-Werten (pH 2, 6, 9 und 12) für verschieden lange Zeiträume. Erfolgskriterien waren hinterher eine möglichst gut erhaltene makroskopische Gewebsmorphologie und eine glaubhaft reproduzierbare Färbung von fls485 mit möglichst wenig Hintergrundfärbung. Auf diesem Wege wurde das Erhitzen im Wasserbad in Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6 als beste Methode zum Antigen-Retrieval identifiziert. Ebenso wurde bei jeder Färbung eine Negativkontrolle mitgeführt, die nicht mit dem Primärantikörper inkubiert worden war, um mögliche Färbungsartefakte erkennen zu können (vgl. Abschnitt 2.2.7).

Da diese Vorgehensweise der gängigen Methodik entspricht [59], sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen als valide zu betrachten. Bei der Identifizierung der neuroendokrinen (Tumor-)Zellen im pathologisch veränderten Gewebe (vgl. Abbildung 3.3) wa-

ren die bereits vorhandenen Färbungen mit gängigen neuroendokrinen Markern, wie zum Beispiel Chromogranin A oder NSE, eine hilfreiche Ergänzung. Daher konnte die im gesunden Normalgewebe erhobene Annahme, dass das Protein fls485 vornehmlich in Zellen endokrinen Ursprungs vorkommt, wie in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas oder den enteroendokrinen Zellen im oberen GI-Trakt, anhand der Patientenproben nochmals bestätigt werden. Da in der Regel auch gesundes Gewebe neben dem tumorös veränderten Proben eingebettet wurde, ließ sich das Färbeverhalten von pathologisch verändertem und normalem Gewebe direkt miteinander vergleichen. Ebenso konnte durch die oben erwähnten, bereits im Rahmen der normalen Diagnostik angefertigten Färbungen mit neuroendokrinen Markern wie Chromogranin A neuroendokrine Zellen sicher identifiziert werden. Bei den Tumoren, die in größerer Probenanzahl vorlagen, konnte so reproduzierbar die Annahme bestätigt werden, dass das Protein fls485 vor allem in höher differenzierten Tumoren mit langsamerem Wachstum vorliegt, wohingegen Tumoren mit malignerem Verhalten eine geringere Anfärbbarkeit aufwiesen (vgl. Abschnitt 3.1.3). Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten der funktionellen Versuche, in denen die Volltransfektanten mit einer erhöhten fls485-Expression eine signifikant langsamere Wachstumsgeschwindigkeit zeigten als deren Wild- und Leerkonzellen (vgl. Abschnitt 3.3.1).

Die Untersuchungen an kryokonserviertem Gewebe mit normalen und pathologisch veränderten Proben (vgl. Abschnitt 3.1.4) diente zum Einen dem Zweck, die Ergebnisse der immunhistochemischen Versuche exemplarisch zu bestätigen, zum Anderen sollte die Korrelation zwischen RNA- und Proteinexpression untersucht werden. Wie in vorherigen Studien zum humanen Proteom festgestellt, kann die mRNA-Expression durchaus im scharfen Kontrast zum Proteingehalt eines bestimmten Gens, bzw. Proteins stehen [43], was für die in etwa zeitgleich stattgefundene Charakterisierung der Volltransfektanten von großer Bedeutung war (vgl. Abschnitt 4.2.3). Die immunhistochemischen Daten konnten hinsichtlich der fls485-Expression in Dünndarm und gut differenziertem neuroendokrinen Karzinom bestätigt werden, da sich auch hier auf Proteinebene im Westernblot eine vermehrte Expression zeigte. Ein weiterer gut differenzierter Tumor, das Gastrinom, zeigte weder auf RNA- noch auf Proteinebene eine signifikant vermehrte Expression, weshalb die Untersuchungen zu den potentiell funktionell aktiven Tumoren wie Gastrinomen noch weiter forciert werden müssen. Dies war im Rahmen dieser Arbeit aufgrund geringer Fallzahlen und vor allem begrenzten Patientenmaterials nicht möglich.

## Immunfluoreszenz

Neben der Verteilung von fls485 in Geweben und bestimmten Zelltypen wurde als Methode zur Erhebung der subzellulären Lokalisation und zur weiteren Bestätigung des Transfektionserfolges die indirekte Immunfluoreszenz ausgewählt (vgl. Abschnitte 3.1.5 und 3.2.3). Hierbei bindet der spezifische Erstantikörper an das Antigen der zu untersuchenden Probe, um anschließend durch einen gegen den Erstantikörper gerichteten, fluoreszenz-markierten Zwei-

antikörper erkannt und markiert zu werden. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zur direkten Immunfluoreszenz ist der Ausschluss eines unspezifischen Bindungsverhaltens des Zweitantikörpers, wodurch falsch-positive Ergebnisse vermieden werden. Trotzdem kommt es gerade bei der Immunfluoreszenz häufig zu Hintergrundfärbungen, die die Aussagekraft der Experimente vermindern können. Daher sollte wie bei der Immunhistochemie zunächst eine Testreihe durchgeführt werden, um die Vorgehensweise mit den besten Resultaten, sprich spezifische Färbung und wenig Hintergrund bei validen Negativkontrollen, herausfiltern zu können. Auch das Verhalten des Erstantikörpers kann durch vorherige immunhistochemische Experimente getestet werden [61]. Da bei der Immunfluoreszenz native und transfizierte Zellen und keine Gewebsschnitte gefärbt wurden, ist die Methodik der Immunhistochemie nicht eins zu eins auf die Immunfluoreszenz übertragbar gewesen. Ein AG-Retrieval wie bei den immunhistochemischen Gewebsschnitten im heißen Wasserbad mit Citratpuffer führte zur Ablösung und morphologischen Zerstörung der Zellen. Daher wurde nach Durchführung einer Testreihe das Einfrieren und spätere Wiederauftauen in Methanol als beste Methode zur Fixierung und zum AG-Retrieval für die Immunfluoreszenz identifiziert (vgl. Abschnitt 2.2.8); ebenso zeigte sich hierbei die geringste Hintergrundfärbung.

Die Ergebnisse aus der Färbung der nativen Zelllinien (vgl. Abschnitt 3.1.5) waren konkordant mit denjenigen der elektronenmikroskopischen Immunogoldtechnik, weswegen von einer rein cytoplasmatischen Lokalisation vom Protein fls485 ausgegangen werden kann. Da sich in den Capan-1-Zellen das markierte fls485 überwiegend als vesikuläre Struktur darstellte, kam zunächst die Vermutung auf, dass fls485 gegebenenfalls in Transportvesikeln vorliegt; diese Hypothese konnte aber anhand der elektronenmikroskopischen Auswertung nicht bestätigt werden. Vielmehr scheint das vermehrte Vorliegen von vesikulären Strukturen eine Eigenschaft von Capan-1-Zellen zu sein, die auch in der Literatur beschrieben wurde und zum Sekretionsverhalten der Zellen (u.a. Muzine) passt [62].

### **Elektronenmikroskopische Immunogoldtechnik**

Die letzte der zur topographischen Analyse angewandten Methoden ist die elektronenmikroskopische Immunogoldtechnik. Hierbei soll anhand von Goldpartikelmarkierung das gesuchte Antigen sichtbar gemacht und so dessen Lokalisation in der Zelle festgestellt werden. In diesem Fall diene normale Dünndarmschleimhaut, in der bekannterweise die Expression von fls485 erhöht ist (vgl. Abschnitt 3.1.4 und [22]), als Probe zur Bestätigung der Immunfluoreszenzresultate. Bei der Immunogoldtechnik gibt es zwei verschiedene Herangehensweisen: Die *pre-embedding* und die *post-embedding* Methode. Diese unterscheiden sich vor allem darin, zu welchem Zeitpunkt die Inkubation mit dem Erstantikörper stattfindet, nämlich entweder vor Einbettung und Schneiden der Proben oder hinterher, was erheblichen Einfluss auf die Erfolgsrate der Methode haben kann [63, 64]. Wie in vorherigen Versuchen unserer Arbeitsgruppe festgestellt, ist es je nach Lokalisation des gesuchten Antigens ratsam, die *post-embedding* Methode zu wählen, da hier die zu markierenden Strukturen leichter

zugänglich sind als im nativen Zustand. Daher wurde für diese Arbeit ebenfalls dieses Vorgehen gewählt (vgl. Abschnitt 2.2.9), um ein falsch-negatives Ergebnis aufgrund von Antigenmaskierung bei unzureichender Plasmamembranpenetration durch den Primärantikörper auszuschließen. Die so gewonnenen Resultate bestätigten die Ergebnisse der Immunfluoreszenz, nämlich die cytoplasmatische Lokalisation des Proteins fls485. Eine Kernlokalisation wurde in keiner der untersuchten Proben beobachtet, ebenso konnte, wie bereits oben erwähnt, ein vermehrtes Vorkommen in vesikulären Strukturen weder an den Dünndarmzellen, noch an den Volltransfektanten beobachtet werden (vgl. Abschnitt 3.1.6).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass anhand der topographischen Analyse die freie cytoplasmatische Lokalisation des Proteins fls485 gesichert ist, wobei bei keiner der beschriebenen Methoden eine nukleäre Lokalisation beobachtet wurde. Damit ist eine Funktion von fls485 als direkter nukleärer Transkriptionsfaktor unwahrscheinlich, schließt aber eine Signaltransduktion im Rahmen eines komplexeren Geschehens nicht aus. Eine Sekretion in den Extrazellulärraum scheint ebenso wenig wahrscheinlich, da ein Nachweis von typischen Transportvesikeln und das vermehrte Vorliegen im Golgi-Apparat der untersuchten Zellen nicht festgestellt werden konnte. Vielmehr scheint fls485 ein freies cytoplasmatisches Protein zu sein, welches ubiquitär im humanen Normalgewebe vorkommt, jedoch ein signifikant gehäuftes Vorkommen in Zellen ektodermalen Ursprungs zeigt. Auf der anderen Seite geht diese Eigenschaft verloren, je weniger die untersuchten Zellen dem gesunden Normalgewebe gleichen, sprich je weniger differenziert sie sind. Diese Beobachtung würde wiederum die Hypothese unterstützen, dass fls485 eine Rolle als Tumorsuppressorgen spielen könnte (vgl. Abschnitt 4.1.1), welches im Rahmen der Dedifferenzierung zunehmend supprimiert wird. Um diese Aspekte näher untersuchen zu können, werden in den folgenden Abschnitten die Ergebnisse der Vorexperimente zu den funktionellen Analysen und diese selbst diskutiert.

### 4.2.3 Transiente und stabile Transfektion als etablierte *in vitro* Modelle

Das Einbringen von Fremd-DNA in Plasmidform in Zellen zur zeitlich begrenzten („*transienten*“) oder längerfristigen („*stabilen*“) Überexpression von Genen und Proteinen ist eine etablierte Methode, um Einblicke in die funktionellen Auswirkungen des überexprimierten Gens/Proteins zu erlangen [65]. Der Erfolg dieser Methode hängt von verschiedenen Umständen ab: Zunächst sollte die zu transfizierende Zelllinie mit Bedacht ausgesucht werden, da sich nicht jeder Zelltyp gleich gut transfizieren lässt, die Zelllinie aber trotzdem passend zum Versuchsaufbau sein sollte. Desweiteren gilt es, zwischen den verschiedenen Methoden zum Einbringen der Plasmid-DNA zu entscheiden und diejenigen mit dem besten Transfektionsresultaten auszuwählen. Auch die jeweilige Versuchsumgebung, wie das Verhältnis von Kulturmedium mit/ohne Serum zum Transfektionsreagenz und die Konzentration des jeweiligen Selektionsmediums verlangen die Durchführung von Vorversuchen mittels transienter

Transfektion und bei der stabilen Transfektion gegebenenfalls einen größeren Versuchsansatz. Trotz all dieser Planung und Optimierung liegt der stabile Transfektionserfolg in der Regel jedoch nur bei einer von 10.000 Zellen [65].

Um nicht zu große zeitliche und finanzielle Einbußen zu haben, wurde in dieser Arbeit systematisch nach diesen Vorgaben gearbeitet. Eine transiente Transfektion der initial verwendeten Zelllinien 3T3, Capan-1, H446 und CaCo2 (vgl. Abschnitt 2.2.3) bestätigte die Angaben in der Literatur, dass sowohl die Zelllinien 3T3 als auch Capan-1 eine befriedigende Transfektionsrate mit dem Lipofektionsreagenz Fugene-6 aufwiesen [62]. Da jedoch *Copeland & Cooper* bereits früh die hervorragende Transfizierbarkeit von 3T3-Zellen beschrieben hatten [66], fiel die Entscheidung zunächst zugunsten der 3T3-Zellen. Als passenderes Modell erschienen allerdings die Capan-1-Zellen, da sie aufgrund ihrer ektodermalen Abstammung geeigneter zur Überexpression des vor allem in Zellen ektodermaler Herkunft vorkommenden Proteins fls485 waren (vgl. Abschnitt 4.2.2). Eine schlussendliche Transfektionsrate von 2,7% bei den 3T3- und 3,6% bei den Capan-1-Zellen erscheint daher zunächst gering, ist jedoch vor dem Hintergrund, dass es sich hierbei lediglich um die Klone mit hoher mRNA- und gleichzeitig hoher Proteinüberexpression handelt (vgl. Grafiken 3.18 und 3.19) ein befriedigender Transfektionserfolg. Da es in erster Linie um die Untersuchung des Proteins fls485 ging, war diese genaue Selektion notwendig, obschon manche Arbeitsgruppen die Auswirkungen von proteomischen Veränderungen *in vitro* als wenig aussagekräftig in Bezug auf das Verhalten von Zellen *in vivo* erachten, da in der Petrischale das für den Gewebverband typische *microenvironment* fehle [67]. Diese Kritik hat durchaus ihre Berechtigung und wird daher im Abschnitt 4.3 näher erörtert. Da jedoch bislang noch keine Daten über rekombinant überexprimiertes fls485 vorliegen, war dieses Vorgehen sicherlich der nächste Schritt, um erste Einblicke in die Zellfunktion unter vermehrter fls485-Expression zu erhalten.

Die Überprüfung des Transfektionserfolges selbst ist sicherlich die zeitintensivste Arbeit an dieser Methode, da jeder isolierte Klon aufgezogen und schließlich auf mRNA-, bzw. Proteinebene getestet werden muss. Dies kann zum einen durch FACS-Analysen erfolgen, bei denen die positiven Zellen fluoreszenzmarkiert werden und daher aufgrund der hohen Sensitivität schon in geringerer Anzahl getestet werden können [65]. Zum anderen kann - wie auch in dieser Arbeit - ein Nachweis der Fremd-RNA durch RealTime-PCR und des Fremd-Proteins mittels Westernblot-Analyse erfolgen (vgl. Abschnitt 3.2.3). Hierbei war vor allem der Nachweis des durch die Transfektion eingebrachten *His-Tags* im Westernblot ausschlaggebend, da dadurch zweifelsfrei das künstlich eingebrachte und nicht das konstitutionell vorhandene fls485-Protein nachgewiesen werden konnte. Um die Validität des Resultats noch untermauern zu können, wurde wie bei den topographischen Analysen auch eine zweite, unabhängige Methode hinzugenommen, um den Transfektionserfolg zu verifizieren. Die Immunfluoreszenz an Wildtyp-, Leer- und Volltransfektanten basierte auf dem gleichen Vorgehen wie bei der topographischen Analyse (vgl. Abschnitt 4.2.2) und lieferte die Bestätigung der Ergebnisse aus der Westernblot-Analyse (vgl. Abschnitt 3.2.3). Da mithilfe verschiedener, unabhängiger

Methoden die erfolgreiche Transfektion von wenigstens 2 Klonen pro transfizierter Zelllinie nachgewiesen werden konnte, wurden diese Klone (3T3-Vollklon F8 2 und Capan-1-Vollklon F9 4) als sicher stabil transfizierte Klone für die funktionellen Analysen genutzt.

#### 4.2.4 Funktionelle Analyse

Die funktionellen Untersuchungen mit den stabil transfizierten Zelllinienklonen VF8 2 und VF9 4 umfassten zwei Methoden: Zunächst wurde eine Wachstumskurve erstellt, deren Anfertigung allein schon stabiler Klone bedurfte, da der Versuch in der Regel über zwei Wochen durchgeführt wird und transient transfizierte Klone nur eine Proteinüberexpression von wenigen Tagen zeigen, danach ist die Fremd-DNA weitgehend abgebaut [65]. Zur Standardisierung wurde wie auch bei den übrigen Zellkulturexperimenten ein geeichtes Zellzahlbestimmungsgerät, *Casy 1*, verwendet, um die gleiche Ausgangszahl an lebendigen Zellen zu erhalten und die Wachstumsrate täglich exakt bestimmen zu können. Die so gewonnenen Ergebnisse zeigten bei dem Capan-1-Vollklon eine signifikante Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit, und auch die Wachstumsrate des 3T3-Vollklons war im Vergleich zu den Leer- und Wildtypzellen deutlich eingeschränkt (vgl. Abschnitt 3.3.1). Da ein direkter Einfluss der Transfektion selbst auf die Wachstumsgeschwindigkeit durch das Mitführen der Wildtyp- und Leerkonzellen ausgeschlossen werden konnte, lässt dieses Resultat zwei mögliche Schlußfolgerungen zu:

Auf der einen Seite könnte die Überexpression von fls485 zu einer erhöhten Apoptoserate in den Vollklonen führen, weshalb täglich weniger lebendige Zellen bei den Vollklonen im Vergleich zu den Kontrollen gemessen wurde. Auf der anderen Seite könnten die transfizierten Zellen insgesamt langsamer wachsen, was durch eine hemmende Wirkung von fls485 auf den Progress des Zellzyklus erklärt werden könnte. Wie genau dieser Prozess abläuft, ist bis jetzt noch nicht erforscht und bedarf weiterer Untersuchungen, da hierbei auch die Frage nach einer möglichen Rolle von fls485 als Tumorsuppressorgen bei der Pathogenese neuroendokriner Tumoren geklärt werden könnte (vgl. Abschnitt 4.1.1).

Die initiale Schlussfolgerung wurde im Rahmen des zweiten funktionellen Experiments, der Begutachtung des Apoptoseverhaltens, untersucht. Apoptose ist eine streng regulierte Form des kontrollierten Zelluntergangs, der entweder durch eine extrazelluläre Liganden-Rezeptor-Signaltransduktion über den *Fas-Rezeptor* und seinen Liganden, *FasL*, ausgelöst werden kann, oder aber über eine Freisetzung von *Cytochrom c* aus den intrazellulär liegenden Mitochondrien. Die daraufhin im Rahmen einer komplexen Signaltransduktion durch enzymatische Spaltung freigesetzten *Caspasen* sind die ausführenden Proteasen für den weiteren Abbau von überlebenswichtigen Strukturen innerhalb der Zelle [68]. Nicht nur in der geordneten Embryonalentwicklung ist der Prozess der Apoptose essentiell, auch als protektiver Mechanismus bei der körpereigenen Abwehr von mutierten Zellen, z.B. im Rahmen einer Karzinogenese, wird Apoptose zunehmend als entscheidender Faktor diskutiert [69]. Aus diesem

Grund und zur Klärung der Frage, ob die Wachstumsgeschwindigkeit der Vollklone aufgrund einer erhöhten Apoptoserate vermindert ist, wurde das häufig verwendete Apoptose-Assay von Promega® angewendet. Hier zeigte sich eine signifikante Zunahme der Apoptoserate des 3T3-Vollklons VF8 2 nach 18h (vgl. Abschnitt 3.3.2), wohingegen die Unterschiede zu den Wildtyp- und Leervektorzellen in allen anderen Vergleichsgruppen nicht signifikant waren. Dieses Ergebnis war widersprüchlich zu den Resultaten der Wachstumskurven, da hier vor allem der Capan-1-Vollklon eine erniedrigte Wachstumsgeschwindigkeit zeigte und man daher in dieser Gruppe eine erhöhte Apoptoserate erwartet hätte. Daher muss man unter Beachtung aller Resultate eher von einer hemmenden Wirkung von fls485 auf den Progress des Zellzyklus ausgehen (s.o.). Natürlich muss hierbei in Zukunft auch die Verwendung anderer Apoptoseassays in Betracht gezogen werden, da einige Arbeitsgruppen das Austesten von mehreren funktionellen Assays für die jeweilige Zelllinie als sinnvoll erachten [68, 70].

### 4.3 Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sind auf dem Weg zu vollständigen Charakterisierung des Proteins fls485 nur ein anfänglicher Schritt. Die notwendigen Arbeitswerkzeuge, wie die genaue Kenntnis der Lokalisation und die Generierung stabiler Transfektanten, sind nun vorhanden und ermöglichen für die Zukunft weitere interessante Untersuchungsansätze. Der nächste Schritt könnte zum einen die Durchführung eines Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase-Assays mit den stabilen Transfektanten sein, um der Frage nach einer enzymatischen Aktivität von fls485 nachzugehen (vgl. Abschnitt 1.2.3). Zum anderen wäre auch der Einsatz primärer Zellkulturen aus neuroendokrinen Tumoren zur Transfektion denkbar, da in diesem Modell eine exaktere Nachahmung der *in vivo* Verhältnisse möglich wäre (vgl. Abschnitt 4.2.3). Auch könnte man an primären Zellen von unterschiedlich gut, bzw. schlecht differenzierten NETs die funktionellen Analysen wiederholen und mit denen der künstlich transfizierten Zellen vergleichen, um so Rückschlüsse auf die funktionellen Einflüsse von fls485 ziehen zu können.

Ein weiterer Ansatz wäre die Untersuchung der möglichen Chaperonaktivität von fls485. Hier beschreiben *Shi et al.* eine interessante Methode, wie die Faltung eines künstlich denaturierten Enzyms durch ein putatives Chaperon mittels spektrofluorimetrischer Messung beobachtet werden kann [32].

Je nach Resultat der genannten Versuchsmöglichkeiten ergeben sich natürlich noch viele interessante Fragestellungen, deren Klärung Inhalt weiterer experimenteller Arbeit sein wird.

## 5 Zusammenfassung

Proteomics - die Wissenschaft, die sich mit der Proteinzusammensetzung von Zellen und deren Wechselwirkung untereinander beschäftigt, hat seit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms zunehmend an Bedeutung gewonnen. Auch in dieser Arbeit steht ein Protein, *fls485*, im Mittelpunkt, dessen codierendes Gen initial durch ein RNA-Genchiparray an Enterozyten der menschlichen Dünndarmschleimhaut aufgefallen war. Bei der Sequenzanalyse des Proteins fielen zwei Motive auf: Das chaperonspezifische Motiv -CXXCXGXG- und das -CXXC-Motiv der Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase-Familienmitglieder [22]. Diese Beobachtung warf die Frage auf, welche Funktion *fls485* in der Zelle ausübt und ob es eine gewebe-typische Lokalisation gibt, die Anhalte für weitere Einflüsse von *fls485* auf den Zellverband, bzw. spezifische Zellen selbst liefert. Da die Datenlage zu *fls485* bislang noch sehr lückenhaft ist, wurde die Charakterisierung des Proteins grundlegend von zwei Seiten durchgeführt: Die topographische und die funktionelle Analyse.

Für die topographische Analyse konnten anhand verschiedener Methoden wie der Immunhistochemie, der Immunfluoreszenz an Zelllinien mit bekannter *fls485*-Expression und der elektronenmikroskopischen Immunogoldtechnik mehrere Rückschlüsse gezogen werden: Zum einen ist *fls485* ein ubiquitär im menschlichen Körper vorkommendes Protein, welches jedoch eine deutlich vermehrte Expression in Zellen ektodermalen Ursprungs, wie Zellen der Epidermis und des diffusen neuroendokrinen Systems, zeigt. Darauf aufbauend wurde die *fls485*-Expression in pathologisch verändertem Gewebe dieser Zellklassen untersucht, wobei sich eine Reduktion der Expression ergab, je schlechter differenziert die untersuchten Tumoren waren. Diese Erkenntnis könnte die These anderer Arbeitsgruppen unterstützen, die in *fls485* ein mögliches Tumorsuppressorgen sehen [34]. Zum anderen konnte mittels Immunfluoreszenz und elektronenmikroskopischer Versuche gezeigt werden, dass *fls485* ein freies cytoplasmatisches Protein ist und keine nukleäre Expression zeigt.

Für die funktionelle Analyse wurden zunächst stabile Transfektanten an zwei verschiedenen Zelllinien (Capan-1 und 3T3) erzeugt, die für die funktionellen Assays als passendes Modell dienten. Eine erste orientierende Untersuchung zeigte, dass bei *fls485*-Überexpression die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen vermindert ist, was die Daten der immunhistochemischen Färbungen bestätigt und auf einen dämpfenden Einfluss von *fls485* auf den Progress des Zellzyklus hinweist.

Inwieweit *fls485* als putatives Chaperon auch eine Bedeutung im Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase-System hat, ist Gegenstand weiterführender Arbeiten unter Nutzung des etablierten Modells.

# Summary

Proteomics - the investigation on proteins, their composition and interaction in cells, has become an important scientific topic since the decoding of the human genom. This medical thesis also examines a protein, *fls485*, whose genetic code was discovered in a RNA-Genechiparray on human enterocytes of the small intestine. The sequence analysis of *fls485* revealed two interesting motifs: -CXXCXGXG-, known as a specific motif for chaperons, and -CXXC-, which belongs to the members of the thiol-disulfide-oxidoreductase-family [22]. Based on this observation, several issues are of particular importance: What are the tasks that are fulfilled by *fls485* inside a cell? Are there any tissue-specific preferences of this protein and, if so, can we conclude any more influences of *fls485* on the tissue of interest or single specialised cells? Since the literature available about this topic is still incomplete, the characterization of *fls485* was accomplished via two sides: The topographic and the functional analysis.

The methods applied for the topographic analysis included immunohistochemistry, immunofluorescence on cell lines with known *fls485* expression and electron microscopical immunogoldtechnique. Interestingly, this analysis revealed on the one hand an ubiquitous existence of *fls485* in human tissues, on the other hand there is an increased expression in cells of ectodermal origin, for example epidermal cells or cells which belong to the diffuse neuroendocrine system. Considering these results, we hypothesized how the expression might change in pathologically altered neuroendocrine cells. Here we found a decreased expression of *fls485* in neuroendocrine lesions dependent on their grade of differentiation: The less differentiated a tumor was, the less *fls485* expression was detectable. This knowledge possibly supports the assumption other groups described, namely that *fls485* acts as a putative tumorsuppressorgene in other tumor entities [34]. Additionally, the data obtained by immunofluorescence and electron microscopy revealed a cytoplasmatic localization of *fls485* without any nuclear expression.

For the functional analysis an appropriate transfection model was established using two different cell lines (Capan-1 and 3T3). First results showed a decreased growth rate in cells with an *fls485* overexpression, which supports the immunohistochemical data and indicates a deceleration of the cell cycle's progress by *fls485*.

To which extend *fls485* as a putative chaperon affects the thiol-disulfide-oxidoreductase-system remains subject to further investigation and can be obtained by using the established model.

# Literaturverzeichnis

- [1] WALDEYER: *Anatomie des Menschen*. Urban & Fischer Verlag, München, 2006.
- [2] LÜLLMANN-RAUCH, R: *Histologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003.
- [3] SCOVILLE DH, *et al.*: *Current View: Intestinal Stem Cells and Signaling*. Gastroenterology, 134:849–864, 2008.
- [4] CHENG H, LEBLOND CP: *Origin, Differentiation and Renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine*. American Journal of Anatomy, 141(3):537–562, 1974.
- [5] PINTO D, CLEVERS H: *Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium*. Experimental Cell Research, 306:357–363, 2005.
- [6] RIMONDI E, *et al.*: *Involvement of TRAIL/TRAIL-Receptors in Human Intestinal Cell Differentiation*. Journal of cellular physiology, 206:647–654, 2006.
- [7] GASSLER N, *et al.*: *Regulation of Enterocyte Apoptosis by Acyl-CoA Synthetase 5 Splicing*. Gastroenterology, 133:587–598, 2007.
- [8] LEE CS, KAESTNER KH: *Development of gut endocrine cells*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 18:453–462, 2004.
- [9] HÖCKER M, WIEDENMANN B: *Molecular Mechanisms of Enteroendocrine Differentiation*. Annals New York Academy of Sciences, 157(5):160–174, 2005.
- [10] WITTEKIND, MEYER: *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2010.
- [11] SCHONHOFF SE, GIEL-MOLONEY M, LEITER AB: *Minireview: Development and Differentiation of Gut endocrine cells*. Endocrinology, 145(6):2639–2644, 2004.
- [12] ALIAGA JC, *et al.*: *Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells*. Am J Physiol, 277:631–641, 1999.
- [13] MARIADASON JM, *et al.*: *Gene Expression Profiling of Intestinal Epithelial Cell Maturation Along the Crypt-Villus Axis*. Gastroenterology, 128:1081–1088, 2005.

- [14] GASSLER N, *et al.*: *Molecular characterisation of non-absorptive and absorptive enterocytes in human small intestine*. Gut online, 55:1084–1089, 2006.
- [15] CHANG J, *et al.*: *Proteomic changes during intestinal cell maturation in vivo*. Journal of Proteomics, 71:530–546, 2008.
- [16] TURCK N, *et al.*: *Laminin isoforms: biological roles and effects on the intracellular distribution of nuclear proteins in intestinal epithelial cells*. Experimental Cell Research, 303:494–503, 2005.
- [17] BRITTAN M, WRIGHT NA: *Gastrointestinal stem cells*. Journal of Pathology, 197:492–509, 2002.
- [18] LOPEZ MJ, *et al.*: *Studies in transgenic mice reveal potential relationship between Secretin-producing cells and other endocrine cell types*. The Journal of Biological Chemistry, 270(2):885–891, 1995.
- [19] HERP F, *et al.* VAN: *Physiological manipulation of cellular activity tunes protein and ultrastructural profiles in a neuroendocrine cell*. Journal of Endocrinology, 198:607–616, 2008.
- [20] BABYATSKY MW, *et al.*: *Oral trefoil peptides protect against ethanol- and indomethacin-induced gastric injury in rats*. Gastroenterology, 110:489–497, 1996.
- [21] MASHIMO H, *et al.*: *Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor*. Science, 274:262–265, 1996.
- [22] REINARTZ A, EHLING J, *et al.*: *Small intestinal mucosa expression of putative chaperone fls485*. Gastroenterology, 10, 2010.
- [23] BUCHNER, J: *Introduction: The cellular protein folding machinery*. Cellular and Molecular Life Sciences, 59:1587–1588, 2002.
- [24] NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE: *Transkription und Translation in der eukaryoten Zelle*, März 2008. [http : //commons.wikimedia.org/wiki/File : Transkription\\_Translation\\_01.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Transkription_Translation_01.jpg).
- [25] QIU XB, *et al.*: *The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones*. Cellular and Molecular Life Sciences, 63:2560–2570, 2006.
- [26] CHEETHAM ME, CAPLAN AJ: *Structure, function and evolution of DnaJ: Conservation and adaptation of chaperone function*. Cell Stress & Chaperones, 3(1):28–36, 1998.
- [27] NOONAN E, *et al.*: *Hsp70B' and Hsp72 form a complex in stressed human colon cells and each contributes to cytoprotection*. Experimental Cell Research, 314:2468–2476, 2008.

- 
- [28] NOONAN E, *et al.*: *Hsp70B' regulation and function*. Cell Stress & Chaperones, 12(3):219–229, 2007.
- [29] JAKOB U, MUSE W, ESER M BARDWELL JC: *Chaperone activity with a redox switch*. Cell, 96:341–352, 1999.
- [30] GRAF PCF, JAKOB U: *Redox-regulated molecular chaperones*. Cellular and Molecular Life Sciences, 59:1624–1631, 2002.
- [31] RAINA S, MISSIAKAS D: *Making and breaking disulfide bonds*. Annual Review Microbiology, 51:179–202, 1997.
- [32] SHI Y, *et al.*: *Contributions of cysteine residues in Zn2 to zinc fingers and thiol-disulfide oxidoreductase activities of chaperone DnaJ*. Biochemistry, 44:1683–1689, 2005.
- [33] KARZAI AW, MCMACKEN R: *A bipartite signaling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the Escherichia coli DnaK protein*. The Journal of Biological Chemistry, 271:11236–11246, 1996.
- [34] TSCHENTSCHER F, *et al.*: *Tumor classification based on gene expression profiling shows that uveal melanomas with and without monosomy 3 represent two distinct entities*. Cancer Research, 63:2578–2584, 2003.
- [35] PIOTR, C: *A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples*. BioTechniques, 15(3):532–536, 1993.
- [36] REINARTZ A, *et al.*: *Lipid-induced up-regulation of human acyl-CoA synthetase 5 promotes hepatocellular apoptosis*. Biochimica et biophysica acta., 9:1025–1035, 2010.
- [37] RUBAKHIN S, *et al.*: *Profiling metabolites and peptides in single cells*. Nature Methods, 8:20–29, 2011.
- [38] YAMADA M, *et al.*: *The Proteomic Profile of Pancreatic Cancer Cell Lines Corresponding to Carcinogenesis and Metastasis*. J Proteomics Bioinform, 2:1–18, 2009.
- [39] HIRANO T, KATO H: *Present Status of Clinical Proteomic Analysis for the Early Detection and Determination of Therapeutic Strategy in Lung Cancer*. Annual Thoracic Cardiovascular Surgery, 12(1):4–11, 2005.
- [40] K ÖBERG: *Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract: Recent advances in molecular genetics, diagnosis and treatment*. Current Opinion in Oncology, 17:386–391, 2005.
- [41] K ÖBERG: *Genetics and molecular pathology of neuroendocrine gastrointestinal and pancreatic tumors (gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors)*. Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity, 16:72–78, 2009.

- [42] ZIKUSOKA MN, *et al.*: *The Molecular Genetics of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors*. Cancer, 104(11):2292–2309, 2005.
- [43] E, HOFSLI: *Genes involved in neuroendocrine tumor biology*. Pituitary, 9:165–178, 2006.
- [44] CAPURSO G, *et al.*: *Gene expression profiles of progressive pancreatic endocrine tumours and their liver metastases reveal potential novel markers and therapeutic targets*. Endocrine-Related Cancer, 13:541–558, 2006.
- [45] LOTT ST, *et al.*: *High frequency loss of heterozygosity in von Hippel-Lindau (VHL)-associated and sporadic pancreatic islet cell tumors: Evidence for a stepwise mechanism for malignant conversion in VHL tumorigenesis*. Cancer Research, 62:1952–1955, 2002.
- [46] SPEEL EJ, *et al.*: *Genetic differences in endocrine pancreatic tumor subtypes detected by comparative genomic hybridization*. Am J Pathol., 155:1787–1794, 1999.
- [47] DUERR EM, *et al.*: *Defining molecular classifications and targets in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors through DNA microarray analysis*. Endocrine-Related Cancer, 15:243–256, 2008.
- [48] STANCU M, *et al.*: *Genetic Alterations in Goblet Cell Carcinoids of the Vermiform Appendix and Comparison with Gastrointestinal Carcinoid Tumors*. Modern Pathology, 16(12):1189–1198, 2003.
- [49] ZHAO J, *et al.*: *Genomic imbalances in the progression of endocrine pancreatic tumors*. Genes Chromosomes Cancer, 32:364–372, 2001.
- [50] ZHAO J, *et al.*: *Genomic Alterations in Well-Differentiated Gastrointestinal and Bronchial Neuroendocrine Tumors (Carcinoids)*. American Journal of Pathology, 157(5):1431–1438, 2000.
- [51] BARBARESCHI M, *et al.*: *CDX-2 homeobox gene product expression in neuroendocrine tumors*. American Journal of Surgery & Pathology, 28(9):1169–1176, 2004.
- [52] MOSER C, LANG S, STOELTZING O: *Heat-shock protein 90 (Hsp90) as a molecular target for therapy of gastrointestinal cancer*. Anticancer Research, 29:2031–2042, 2009.
- [53] KANG BH, *et al.*: *Targeted inhibition of mitochondrial Hsp90 suppresses localised and metastatic prostate cancer growth in a genetic mouse model of disease*. British Journal of Cancer, 104:629–634, 2011.
- [54] HWANG M, MORETTI L, LU B: *Hsp90 Inhibitors: Multi-targeted antitumor effects and novel combinatorial therapeutic approaches in cancer therapy*. Current Medicinal Chemistry, 16:3081–3092, 2009.

- 
- [55] MCNAMARA L, *et al.*: *Fluorescence two-dimensional gel electrophoresis for biomaterial applications*. J. R. Soc. Interface, 7:107–117, 2009.
- [56] MIRZA S, OLIVIER M: *Methods and approaches for the comprehensive characterization and quantification of cellular proteomes using mass spectrometry*. Physiolog Genomics, 33:3–11, 2008.
- [57] ROZANAS C, LOYLAND S: *Capabilitis usig 2-D DIGE in proteomics research*. Methods in Molecular Biology, 441:1–18, 2008.
- [58] SUEHARA Y, *et al.*: *Anatomic site-specific proteomic signatures of gastrointestinal stromal tumors*. Proteomics Clin. Appl., 3:584–596, 2009.
- [59] SHI S, SHI Y, TAYLOR C: *Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Review and Future Prospects in Research and Diagnosis over Two Decades*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 59:13–32, 2010.
- [60] SHI S, COTE R, TAYLOR C: *Antigen Retrieval Techniques: Current Perspectives*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 49:931–937, 2001.
- [61] BATAILLE F, *et al.*: *Multiparameter Immunofluorescence on Paraffin-embedded Tissue Sections*. Immunohistochem Mol Morphol, 14:225–228, 2006.
- [62] LGC STANDARDS: *Zelllinie Capan-1*, 2011. [http : //www.lgcstandards – atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx](http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx).
- [63] ZHANG C, *et al.*: *Profiling of cellular proteins in porcine reproductive and respiratory syndrome virus virions by proteomics analysis*. Virology Journal, 7:242–254, 2010.
- [64] MAHENDRASINGAM S, *et al.*: *The ultrastructural distribution of prestin in outer hair cells: A post-embedding immunogold investigation of low and high frequency regions of the rat cochlea*. Eur J Neurosci., 9:1595–1605, 2010.
- [65] C, MÜLHARDT: *Der Experimentator - Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Verlag, Heidelberg, 2009.
- [66] N, COPELAND und COOPER G: *Transfection by exogenous and endogenous murine retrovirus DNAs*. Cell, 16:347–356, 1979.
- [67] BECKER KF, WALCH A, UEFFING M: *Protein analysis of tissues - Current views and clinical perspectives*. Virchows Arch, 455:191–192, 2009.
- [68] HUMPAL-WINTER J, *et al.*: *Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay: Rapid Apoptosis Detection in High-Throughput Applications*. Promega Notes, 79:33–35, 2001.

- [69] POLLEY A, *et al.*: *Proteomic Analysis Reveals Field-Wide Changes in Protein Expression in the Morphologically Normal Mucosa of Patients with Colorectal Neoplasia*. Cancer Research, 13:6553–6562, 2006.
- [70] MIRET S, *et al.*: *Comparison of in vitro assays of cellular toxicity in the human hepatic cell line HepG2*. Society of Biomolecular Sciences, 11:184–193, 2006.

# Abkürzungsverzeichnis

|                   |                                                 |
|-------------------|-------------------------------------------------|
| <i>ACSL5-fl</i>   | Acyl-Coenzym A Synthetase                       |
| <i>AG</i>         | Antigen                                         |
| <i>AK</i>         | Antikörper                                      |
| <i>AP</i>         | Absorptive Progenitorzelle                      |
| <i>APUD</i>       | Amine precursor uptake and decarboxylation      |
| <i>ATPase</i>     | Adenosin-Triphosphatase                         |
| <i>bHLH</i>       | basic helix-loop-helix                          |
| <i>BSA</i>        | Bovines Serum Albumin                           |
| <i>CBC</i>        | cryptbase columnar cell                         |
| <i>CCK</i>        | Cholezystokinin                                 |
| <i>cDNA</i>       | complementary DNA                               |
| <i>DAB</i>        | 3,3-Diaminobenzidin                             |
| <i>DAPI</i>       | Fluoreszenzfarbstoff 4,6-Diamidin-2-phenylindol |
| <i>DEPC</i>       | Diethylpyrocarbonate                            |
| <i>DMEM</i>       | Dulbecco's Modified Eagle's Medium              |
| <i>DNA</i>        | Desoxyribonucleinacid                           |
| <i>DNES</i>       | Diffuses neuroendokrines System                 |
| <i>dNTP</i>       | Desoxyribonukleosidtriphosphate                 |
| <i>DTT</i>        | Dithiothreitol                                  |
| <i>EC</i>         | enterochromaffin                                |
| <i>ECL</i>        | enterochromaffin-like                           |
| <i>E. coli</i>    | Escherichia coli (Bakterium)                    |
| <i>EDTA</i>       | Ethylenediaminetetraacetic acid                 |
| <i>EM</i>         | Elektronenmikroskopie                           |
| <i>EtOH</i>       | Ethanol                                         |
| <i>ER</i>         | Endoplasmatisches Retikulum                     |
| <i>FACS</i>       | Fluorescence-activated cell sorting             |
| <i>Fas</i>        | gehört zur TNF-Familie & induziert Apoptose     |
| <i>FCS</i>        | Fetal calf serum                                |
| <i>FITC</i>       | Fluoresceinisothiocyanat                        |
| <i>G418</i>       | Geneticin 418                                   |
| <i>GEP-System</i> | Gastro-entero-pankreatisches System             |

*G/F-Domäne* Glycin/Phenylalanin-reiche Domäne

*GIP* gastric inhibitory peptide

*GLP* Glucagon-like peptide

*HCl* Chlorwasserstoff (Salzsäure)

*HEPES* 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

*HPD-Motiv* Aminosäuresequenz aus Histidin, Prolin und Aspartat

*HRP* Horseradish Peroxidase

*Hsp33* Heat shock protein 33

*Hsp40* Heat shock protein 40

*Hsp70* Heat shock protein 70

*Hdj1* Humanes DnaJ-Homolog 1

*IgG* Immunglobulin G

*KCl* Kaliumchlorid

*KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>* Kaliumdihydrogenphosphat

*KZA* Krypton-Zotten-Achse

*LRC* Label-retaining cell

*LT* Lower Tris Buffer

*mAB* monoclonal Antibody

*MALDI* Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation

*MgCl<sub>2</sub>* Magnesiumchlorid

*mRNA* messenger Ribonucleinacid

*NaCl* Natriumchlorid

*Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>* Disodiumhydrogenphosphat

*NaOH* Natriumhydroxid

*NET* neuroendokrine Tumoren

*Ngn-3* Neurogenin-3

*NHS* Normal Horse Serum

*NSE* Neuronen-spezifische Enolase

*PAA* Polyacrylamid

*PAGE* Polyacrylamid-Gelelektrophorese

*PBS* phosphate buffered saline

*PCR* Polymerase Chain Reaction

*PMSF* Phenylmethylsulfonylfluorid

*PVDF* Polyvinylidenfluorid

*rER* raues endoplasmatisches Retikulum

*RNA* Ribonucleinacid

*SDS* Sodiumdodecylsulfat

*SP* Sekretorische Progenitorzelle

*TBS* Tris buffered saline

|              |                                                                                    |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>TCF</i>   | T-cell factor, Bestandteil des Wnt-Signalwegs                                      |
| <i>TFF</i>   | trefoil factor family                                                              |
| <i>TNF</i>   | Tumornekrosefaktor                                                                 |
| <i>TNM</i>   | Tumorklassifikation (Tumorgröße (T), Lymphknotenbefall (N) und Metastasierung (M)) |
| <i>TRAIL</i> | TNF-related apoptosis inducing ligand                                              |
| <i>Tris</i>  | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                                                    |
| <i>tRNA</i>  | transfer Ribonucleinacid                                                           |
| <i>UICC</i>  | union for international cancer control                                             |
| <i>UT</i>    | Upper Tris Buffer                                                                  |
| <i>UVM2</i>  | uveal melanoma susceptibility locus 2                                              |
| <i>WHO</i>   | world health organisation                                                          |

# Danksagung

Mein Dank geht in erster Linie an **Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaus Gaßler**, meinen Doktorvater, der dieses interessante Thema für mich ausgewählt hat und mich stets mit engagierter Betreuung unterstützt hat. Seine konstruktive Kritik und seine Erfahrungen auf dem Gebiet haben entscheidend zu dieser Arbeit beigetragen.

Vielen Dank an **Frau Univ.-Prof. Dr. med. R. Knüchel-Clarke**, die mir als Leiterin des Instituts für Pathologie erst die Möglichkeit eröffnet hat, auf diesem Gebiet meine Dissertation zu verfassen.

Ebenfalls danken möchte ich den Kooperationspartnern an der Universität Heidelberg, namentlich **Herrn Prof. Dr. J. Kopitz**, **Herrn Prof. Dr. H. Zentgraf**, **Frau S. Franz** und **Frau C. Tessmer** für die Bereitstellung der Zelllinien Capan-1 & H446 und des monoklonalen Antikörpers #7/1.

Einen ganz herzlichen Dank möchte ich an dieser Stelle meinen damaligen Kollegen aus der AG Gaßler aussprechen, namentlich **Frau U. Schneider**, **Frau Dr. rer. nat. A. Reinartz**, **Frau Dipl. Biol. K. Raupach**, **Herrn Dr. med. J. Ehling** und **Herrn Dr. med. J. Köster**, die mir immer zur Seite gestanden und mir mit vielen wertvollen Tips und Fertigkeiten maßgeblich bei dieser Arbeit geholfen haben. Einen ganz wesentlichen Beitrag hat auch **Frau P. Akens** geleistet, indem sie mir bereitwillig bei der Literaturbeschaffung geholfen hat. Vielen Dank an euch alle!

Ein großes Dankeschön auch an **Herrn Dr. rer. nat. J. Bornemann** für die Probenaufbereitung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen und das gemeinsame Mikroskopieren. Ebenfalls danken möchte ich den damaligen Mitarbeitern der AG Henkel, namentlich **Frau Dr. rer. nat. C. Henkel**, **Frau P. Jirak** und **Frau N. Reulen**, die den Großteil der 2D-Gelelektrophorese und die Analyse & Auswertung mittels Massenspektrometrie für mich übernommen haben.

Danke auch an die Biologen der AG Dahl, für viele unterhaltsame Stunden an den Zellkulturbänken und wertvolle Ratschläge!

Herzlich danken möchte ich generell allen Mitarbeiter der Pathologie, egal ob Forschung oder Routine, da jeder hilfsbereit und freundlich zu mir war und mich mit seiner jeweiligen Expertise in meinem Vorwärtkommen unterstützt hat.

Mein besonderer Dank gilt meinen **Eltern**, die es mir ermöglicht haben, mein Studium und die Dissertation in der vorgegebenen Zeit zu absolvieren, und mich bei Rückschlägen immer wieder ermutigt haben weiterzumachen, und meiner **Schwester Malaika**, für das Korrekturlesen dieser Arbeit trotz weitgehender Unkenntnis der Materie.

## Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten im Institut für Pathologie, Pauwelsstraße 30, Universitätsklinikum Aachen, hinterlegt sind.

Verena Anna Sophia Simon

## LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE DATEN

|               |                                |
|---------------|--------------------------------|
| Familienname  | Simon                          |
| Vornamen      | Verena Anna Sophia             |
| Geburtsdatum  | 20.09.1984                     |
| Geburtsort    | 46397 Bocholt                  |
| Familienstand | ledig                          |
| Anschrift     | Burloer Weg 101, 46397 Bocholt |
| Telefon       | 0241-4307794                   |
| Mobil         | 0176-20614692                  |
| Email         | vsimon@ukaachen.de             |

### STUDIUM

**10/2004** Erstimmatrikulation an der RWTH Aachen

Studienfach: Humanmedizin (Modellstudiengang)

**08/2006 - 07/2007** Studentische Hilfskraft, Abteilung für Neuroradiologie

Universitätsklinikum Aachen

**10/2007 - 09/2008** Medizinische Dissertation, Laborarbeit am Institut für Pathologie

Universitätsklinikum Aachen (AG Intestinale Molekulare Pathologie)

**04/2008 - 06/2009** Studentische Hilfskraft, Institut für Pathologie

Universitätsklinikum Aachen

**06/2009** Erwerb der Zusatzqualifikation -Infektiologie- am Institut für Immunologie, Viro-

logie & Mikrobiologie , Universitätsklinikum Aachen

**07/2009- 08/2009** Teilnahme an einem Forschungsaustausch mit der University of Virginia,

USA, Departement of Pharmacology

Thema: *Characterization of toll-like receptor antagonists*

Betreuer: Norbert Leitinger, Ph.D. (Associate Professor of Pharmacology)

**11/2010** 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen)

Gesamtnote -Sehr Gut- (1,5)

## BERUFSERFAHRUNG

seit **03/2011** Assistenzärztin in der Klinik für Operative Intensivmedizin für Erwachsene,  
Universitätsklinikum Aachen

## WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN

- 12/2007** REINACHER P, REINGES MH, SIMON VA, HANS FJ, KRINGS T.: *Dynamic 3-D contrast-enhanced angiography of cerebral tumours and vascular malformations* Eur. Radiol. 2007 Dec; 17 Suppl 6:F52-62
- 03/2010** REINARTZ A, EHLING J, FRANZ S, SIMON V, BRAVO IG, TESSMER C, ZENTGRAF H, LYER S, SCHNEIDER U, KÖSTER J, RAUPACH K, KÄMMERER E, KLAUS C, TISCHENDORF JJ, KOPITZ J, ALONSO A, GASSLER N: *Small intestinal mucosa expression of putative chaperone fls485* BMC Gastroenterology 2010 Mar 7;10:27

Aachen, den 14.12.2011