Universitäts-Frauenklinik und Poliklinik
Universitätsklinikum Ulm
Ärztlicher Direktor Prof. Dr. Rolf Kreienberg

Analyse der Expression und posttranslationalen Modifikation des Tetraspanins Tspan-1 in Ovarialkarzinomzellen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

von
Claus Jürgen Scholz

aus
Koblenz

2007

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter:	PD Dr. rer. nat. Helmut Deißler
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Gabriele Lang
Tag der Promotion:	24. 07. 2007

Für meine Liebste Heike

Inhalt

Inhalt I
Abkürzungsverzeichnis III
1. Einleitung 1
1.1 Die Proteinfamilie der Tetraspanine 1
1.2 Das Ovarialkarzinom 7
1.3 Ziele dieser Arbeit 11
2. Materialien und Methoden 12
2.1 Materialien 12
2.2 Molekularbiologische Methoden 17
2.3 Zellbiologische Methoden 27
2.4 Proteinbiochemische Methoden 32
2.5 Auswahl der Patientenproben und statistische Auswertung 37
3. Ergebnisse 38
3.1 Tspan-1-Expression von Ovarialkarzinomzelllinien 38
3.2 Herstellung und Charakterisierung von Tspan-1-spezifischen anti-Peptidantikörpern 38
3.3 Molekulare Charakterisierung des Tspan-1-Proteins 48
3.4 Subzelluläre Lokalisation des Tspan-1-Proteins 56
3.5 Immunhistochemische Analyse der Tspan-1-Expression in Ovarialkarzinomen 59
4. Diskussion 63
4.1 Charakterisierung der anti-Tspan-1-Antiseren und mögliche Anwendungen 63
4.2 Tspan-1 ist ein heterogen glykosyliertes Protein 64
4.3 Tspan-1 ist an seinen N-Glykosylierungsstellen unterschiedlich modifiziert 65
4.4 Die Lokalisation von Tspan-1 in der Plasmamembran und in Lysosomen 67
4.5 Die subzelluläre Lokalisation von Tspan-1 wird nicht von der hybriden oder komplexen N-Glykosylierung beeinflusst 69
4.6 Von der N-Glykosylierung abhängige ER-Retention des Tspan-1 70

4.7 Die Expression und Lokalisation von Tspan-1 in Gewebeproben von verschiedenen Ovarialkarzinomen 72
4.8 Ausblick 74
5. Zusammenfassung 76
6. Literatur 78
Danksagung 90

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère
AS	Aminosäure
B2M	β2-Mikroglobulin
BMP	„bone morphogenetic protein“, Knochen-morphogenetisches Protein
BSA	„bovine serum albumin“, Rinderserumalbumin
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
c	centi
cDNA	„complementary deoxyribonucleic acid“, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDS	„coding sequence“, für ein Protein kodierende Sequenz
CFA	„complete Freund’s adjuvant“, Vollständiges Freund’sches Adjuvant
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonsäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„deoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EC	„extracellular domain“, extrazelluläre Domäne
(E)GFP	„(enhanced) green fluorescent protein“, (verstärkt) grün fluoreszierendes Protein
EGFR	„epidermal growth factor receptor“, epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ELISA	„Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay“, Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
Endo H_f	Endoglycosidase H-Maltosebindeprotein-Fusionsprotein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERα	Östrogen-Rezeptor alpha

f	femto
FCS	„fetal calf serum“, fötales Kälberserum
FIGO	„Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique“, Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtshilfe
g	Gramm
h	Stunde
IFA	„incomplete Freund’s adjuvant“, Unvollständiges Freund’sches Adjuvant
INS	intrazelluläre netzartige Struktur
IV	intrazelluläre Vesikel
kDa	Kilodalton
KLH	„keyhole limpet hemocyanin“, Schlüssellochschnecken-Hämocyanin
l	Liter
L	Leucin
LB	Luria-Bertani
LEL	„large extracellular loop“, große extrazelluläre Schleife
m	milli
m	Meter
M	molar
MCS	„multiple cloning site“, multiple Klonierstelle
min	Minute
mRNA	„messenger ribonucleic acid“, Boten-Ribonukleinsäure
µ	mikro
n	nano
n.s.	nicht signifikant
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
PSF	Penicillin-Streptomycin-Fungizone
PM	Plasmamembran
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	„ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure

RT	reverse Transkription
s	Sekunde
SDS	„sodium dodecyl sulfate“, Natriumdodecylsulfat
SEL	„small extracellular loop“, kleine extrazelluläre Schleife
TM	Transmembrandomäne
u	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	x-fache Erdbeschleunigung

1. Einleitung

1.1 Die Proteinfamilie der Tetraspanine

1.1.1 Vorkommen und Struktur der Tetraspanine

Tetraspanine sind eine evolutionär hoch konservierte Familie von Membranproteinen. Bis heute wurden bei Säugern 32, bei *Drosophila melanogaster* 35 und bei *Caenorhabditis elegans* 20 Tetraspanine identifiziert [25], darüber hinaus exprimieren auch Pilze und Schwämme Mitglieder dieser Proteinfamilie [51]. Aus dem Auftreten von Tetraspaninen in ursprünglicheren und höher entwickelten Organismen bis hin zum Menschen und der nahezu ubiquitären Expression in menschlichen Geweben kann eine grundlegende funktionelle Bedeutung dieser Proteinfamilie abgeleitet werden. Manche Tetraspanine wie CD9 werden in sehr vielen Geweben exprimiert [52], andere sind Teil funktioneller Membrankomplexe hochspezialisierter Zellen und können nur bei diesen nachgewiesen werden, zum Beispiel die urothelspezifischen Uroplakine [50].

Die 200-350 Aminosäuren (AS) großen Tetraspanine sind durch die vier namensgebenden Transmembrandomänen (TM) charakterisiert, von denen die ersten beiden die kleine, 13-31 Aminosäuren umfassende extrazelluläre Schleife („small extracellular loop“, SEL, auch „extracellular domain 1“, EC1) und die letzten beiden die große, 69-132 AS lange extrazelluläre Schleife („large extracellular loop“, LEL, auch „extracellular domain 2“, EC2) einschließen. Die beiden mittleren Transmembrandomänen sind durch eine typischerweise nur 4 Aminosäuren umfassende intrazelluläre Schleife verbunden. Auch die intrazellulären N- und C-terminalen Bereiche sind mit wenigen Ausnahmen mit 8-21 AS recht kurz. Gegenüber anderen Membranproteinen mit vier Transmembrandomänen wie z.B. den Claudinen [60] sind Tetraspanine klar durch die untereinander bestehende Sequenzhomologie abgrenzt. Kennzeichnend sind mehrere hoch konservierte Aminosäuren, unter anderem 4-8 Cysteine in EC2, von denen zwei zum immer vorhandenen Cystein-Cystein-Glycin (C-C-G)-Motiv beitragen (24). Mehr als die Hälfte aller Tetraspanine besitzen als charakteristische Merkmale darüber hinaus ein Prolin-X-X-Cystein-Cystein (P-X-X-C-C)-Motiv in EC2 („X“ entspricht einer beliebigen Aminosäure) sowie mehrere, u.a. auch

polare konservierte Aminosäuren bisher unbekannter Funktion in den Transmembrandomänen (siehe Abbildung 1). Weitere Auffälligkeiten sind die bei vielen Tetraspaninen vorkommende Häufung von potentiellen N-Glykosylierungs-stellen im EC2 und das Vorhandensein mehrerer membrannaher Cysteine in cytoplasmatischen Domänen, die bei manchen Tetraspaninen durch Palmitoylierung modifiziert sind [5, 24].

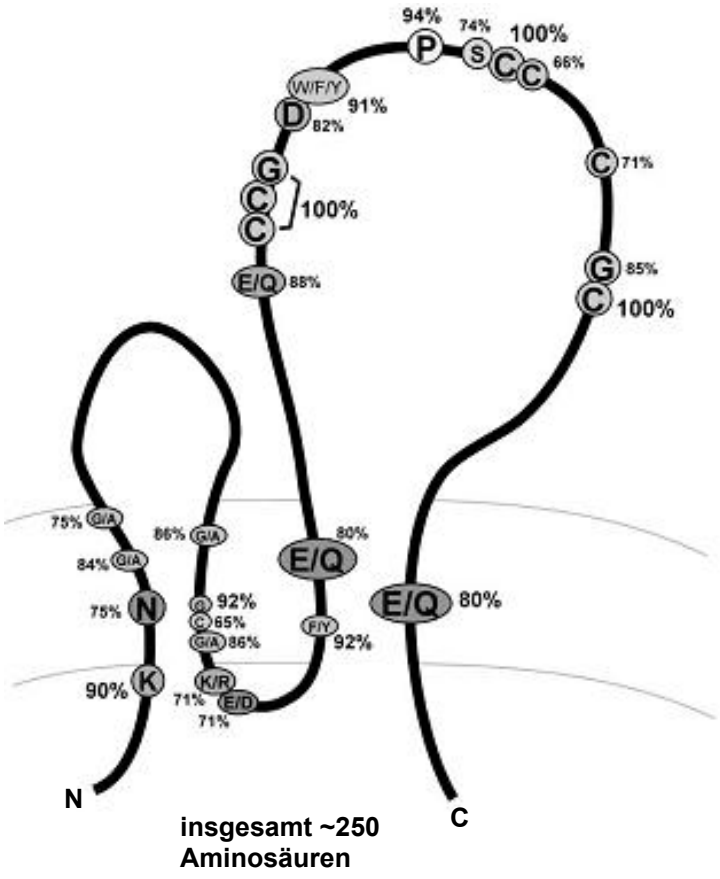


Abbildung 1: Darstellung der Tetraspanin-Struktur. Konservierte Aminosäuren sind unter Angabe ihrer relativen Häufigkeit eingezeichnet [25].

1.1.2 Funktion der Tetraspanine – das Tetraspanin-Netz

Bislang konnte keinem der untersuchten Tetraspanine eine unmittelbare, zum Beispiel enzymatische Funktion zugeordnet werden. Vielmehr scheint die wesentliche Bedeutung der Tetraspanine darin zu bestehen, dass sie mit anderen Proteinen in Wechselwirkung treten und deren Funktionen als Partner in Multiproteinkomplexen modulieren. Bei der Interaktion mit anderen Proteinen unterscheidet man klar definierte Abstufungen: Die spezifische und stabile Assoziation eines Tetraspanins mit einem nicht auch dieser Proteinfamilie angehörenden Partnermolekül wird als direkt oder primär bezeichnet [50]. Diese Komplexe bleiben selbst nach Solubilisierung mit stringenten Detergenzien (z.B. Digitonin oder Triton X-100) erhalten und entstehen bereits früh während der Biosynthese im Endoplasmatischen Retikulum (ER) [25]. Beispiele hierfür sind die Interaktionen von CD9 und CD81 mit EWI-F und EWI-2, zwei Mitgliedern der Immunglobulindomänen-Familie [25], von CD81 mit CD19 in B-Zellen [51] und von CD151 mit der α_3-Untereinheit des $\alpha_3\beta_1$-Integrins [5]. Primäre Tetraspanin-Partnerprotein-Komplexe werden durch indirekte Interaktionen zwischen den Tetraspaninen verbunden. Solche, auf als sekundär bezeichneten Bindungen beruhenden, größeren Proteinkomplexe können durch relativ milde Detergenzien (z.B. Brij 96, Brij 97), insbesondere in Anwesenheit von zweifach geladenen Kationen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+}, in Lösung gebracht werden. Sekundäre Assoziationen entstehen erst im Golgi-Apparat, denn das Aufrechterhalten der Komplexe ist von der Palmitoylierung der Tetraspaninkomponenten abhängig. So wurde gezeigt, dass die indirekte Wechselwirkung der beiden Tetraspanine CD9 und CD151 durch Mutation der zur Membran proximalen Cysteine unterbunden wird [50]. Sogenannte tertiäre Interaktionen führen zu hochmolekularen, relativ unlöslichen Proteinkomplexen, die durch mildere Detergenzien wie Brij 99 oder CHAPS nicht aufgebrochen werden können [25]. Der übergeordnete Komplex mit dynamischem Gleichgewicht aus primären, sekundären und tertiären Interaktionen wird Tetraspanin-Netz („tetraspanin web“) oder Tetraspanin-angereicherte Mikrodomäne („tetraspanin enriched microdomain“) genannt und setzt sich, abhängig von Zelltyp und –zustand, aus unterschiedlichen Tetraspaninen mit verschiedenen assoziierten Proteinen zusammen und trägt so zu den zelltypspezifischen Funktionen und deren Regulation bei [51].

Am besten untersucht ist die Assoziation verschiedener Tetraspanine mit Integrinen, den Rezeptoren für Komponenten der extrazellulären Matrix, die für Zell-Matrix- und Zell-Zelladhäsion auch in Zusammenhang mit Migration, Invasivität und Metastasierung maligner Zellen entscheidend sind. Vor allem β1-Integrine, aber auch die Integrine $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_M\beta_2$ sind in den Plasmamembranen verschiedener Zelltypen als Komponenten von Komplexen mit Tetraspaninen nachgewiesen worden [5].

Bis vor kurzem nahm man an, Tetraspanine übten ihre biologische Funktion allein indirekt durch Bildung einer Assoziationsmatrix für Partnerproteine in der Plasmamembran aus. Inzwischen konnte jedoch gezeigt werden, dass darüber hinaus die zu den gut untersuchten Tetraspaninen gehörenden Proteine CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 und CD82 auch in größeren Mengen in endozytotischen Membranen, z.B. von primären Lysosomen vorkommen. Eine Erklärung liefern Thyrosin enthaltende Sortiermotive, die man zumeist am C-Terminus in den Sequenzen von 13 Tetraspaninen fand [4]. Diese Sortiermotive haben eine Y-X-X-Φ-Konsensussequenz, wobei „X“ eine beliebige und „Φ“ eine hydrophobe Aminosäure mit raumerfüllender Seitenkette darstellt [64]. Das am besten untersuchte Beispiel ist die Interaktion der Sequenz G-Y-E-V-M am C-Terminus von CD63 mit verschiedenen Untereinheiten des Adapter-Proteinkomplexes Clathrin-abhängiger Signalwege, durch die CD63 von der Plasmamembran internalisiert wird und dann in Lysosomen vorliegt. Die subzelluläre Lokalisation des CD63 kann durch Mutation des Thyrosins zu Alanin auf die Plasmamembran beschränkt werden [70]. Ein von CD9 abgeleitetes Protein, an dessen Rückgrat das CD63-Sortierungsmotiv angehängt war, konnte jedoch stärker in der Plasmamembran nachgewiesen werden, als CD9-Derivate, bei denen die TM1 bis TM3 durch die entsprechenden Domänen aus CD63 ersetzt waren [74]. Offenbar reichen die Thyrosin enthaltenden Sequenzmotive nicht in jedem Kontext aus, um eine bestimmte subzelluläre Lokalisation eines Tetraspanins zu bestimmen, so dass weitere für die korrekte Verteilung der Proteine in Zellen nötige Information auch in anderen Domänen enthalten sein muss [4].

1.1.3 Tetraspanine und Krebs

Die Expression bestimmter Tetraspanine lässt sich bei vielen verschiedenen Arten von Krebserkrankungen zur Bewertung der Tumoreigenschaften und der klinischen Prognose heranziehen. In fast allen Fällen beobachtet man eine inverse Korrelation von Tetraspaninexpression und Tumorprogression bzw. Prognose. Bei dem in dieser Hinsicht am Besten untersuchten Tetraspanin CD9 ist ein solcher Zusammenhang für Blasenkrebs [54], das Cervixkarzinom [78], das Endometriumkarzinom [58], Gehirntumoren [39], Knochenkrebs [41], das Kolonkarzinom [22, 59], Kopf- und Nackenkarzinome [18, 53], Lungenkrebs [27, 28, 55], Magenkrebs [29, 61], das Mammakarzinom [32, 36, 56, 57, 82], das Melanom [85], Nierenkrebs [42], das Ovarialkarzinom [15, 30], das Pankreas-karzinom [84], Speicheldrüsenkrebs [75] und Speiseröhrenkrebs [83, 92] gezeigt worden, aber auch CD63, CD82 und einzelne andere Tetraspanine können bei bestimmten Arten maligner Erkrankungen als prognostische Marker dienen [7, 13, 35, 62, 79]. In einzelnen Fällen wurde auch eine direkte Korrelation zwischen Tetraspaninexpression und Malignität beschrieben, z.B. bei Lungenkrebs (nicht kleinzelliger Typ) und dem Leberzellkarzinom, bei denen starke Expression von CD151 [88] bzw. CO-029 [37] ein Zeichen fortgeschrittener Tumorprogression ist. Besonders interessant ist das Cervixkarzinom, bei dem CD9 im Verlauf der Tumorprogression meist herunterreguliert wird, aber eine starke Reexpression durch die Tumorzellen beobachtet wird, wenn diese durch transendotheliale Migration in Gefäße eindringen [78].

Mechanistisch verbindet man die in Tumorzellen veränderten zellulären Eigenschaften wie Motilität, Proliferation und Suszeptibilität für Apoptose mit der Funktion verschiedener Integrine, die mit Tetraspaninen Komplexe bilden. Als Beispiele seien hier die Integrine $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_6\beta_1$ erwähnt, die alle konstitutiv mit den Tetraspaninen CD9, CD53, CD63, CD81 und CD82 interagieren; CD151 scheint sich ebenfalls mit den genannten Integrinen (außer mit $\alpha_4\beta_1$) zu verbinden, bildet jedoch zusätzlich mit $\alpha_7\beta_1$ und $\alpha_6\beta_4$ Komplexe [24, 26]. Obwohl ein Zusammenhang zwischen der Malignität von Tumorzellen und einer durch Tetraspanine modulierten Integrinfunktion plausibel erscheint, ist im Einzelfall noch unklar, welche Bedeutung Tetraspanine für die Kanzerogenese und Tumorprogression haben und welche Mechanismen eine Rolle spielen.

1.1.4 Das Tetraspanin Tspan-1

In einem *in vitro*-Modell der durch das humane Papillomvirus induzierten malignen Transformation von Cervixepithelzellen wurde das Protein C4.8 als differenziell reguliert nachgewiesen und aufgrund seiner Sequenzhomologie der Tetraspaninfamilie zugeordnet [62]. Auf der Suche nach unbekannten Tetraspaninen in Expressionsdatenbanken auf Basis einer Homologie mit Konsensussequenzen aus gut untersuchten Tetraspaninen wurde C4.8 wiederentdeckt und Tspan-1 [87] bzw. NET-1 [81] genannt. Die Tspan-1 mRNA kodiert 241 AS, von denen 11 bzw. 9 die beiden in das Zytoplasma ragenden Enden bilden. Auf Basis der bekannten Topologie der Tetraspanine lassen sich vier je 21 AS umfassende Transmembrandomänen erkennen. Die intrazelluläre Schleife von Tspan-1 ist 15 AS lang, die kleine extrazelluläre Domäne wird von 20, die große extrazelluläre Domäne von 102 AS gebildet. Im EC2 wurden vier Asparagine an den Aminosäurepositionen 141, 154, 178 und 184 als mögliche N-Glykosylierungsstellen identifiziert [81, 87]. Auf Grund des Thyrosin enthaltenden Sortiermotivs mit der Sequenz Y-C-N-L am C-Terminus von Tspan-1 wurde auf seine Lokalisation in der Plasmamembran wie auch in endozytotischen Membranen geschlossen [4, 5]. Dies wurde nur teilweise durch Immunfluoreszenzanalysen transfizierter COS-Zellen bestätigt, bei denen sich mit polyklonalen anti-Tspan-1-Antikörpern eine gepunktete Membranfärbung zeigte, sich aber kein intrazellulär lokalisiertes Tspan-1 nachweisen ließ [95].

Beim Erstellen von Expressionsprofilen mit dem Ziel, Besonderheiten der malignen Phänotypen oder mit der Tumorprogression verbundene Änderungen zu identifizieren, wurde bei verschiedensten Krebsarten Tspan-1 auffällig häufig als differenziell exprimiert nachgewiesen. In Untersuchungen von malignen Tumoren oder daraus abgeleiteten Zelllinien wurde Tspan-1 im Vergleich zum Normalgewebe bzw. zu prämalignen Vorstufen bei Karzinomen aus folgenden Geweben als überexprimiert gefunden: Cervix [95], Kolon [96], Leber [14], Magen [49], Mamma [1, 63, 96], Lunge (nicht kleinzelliger Typ) [6], Ösophagus [8], Pankreas [9, 33, 34, 73] und Prostata [96]. Eine deutlich verstärkte Expression des Tspan-1 durch Ovarialkarzinomzellen wurde nach eigenen Vorarbeiten [19] und ersten Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen [76, 96] als möglicherweise für den malignen Phänotyp dieser Zellen wesentliche Eigenschaft vorgeschlagen.

1.2 Das Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom stellt als sechsthäufigste Krebsart und siebthäufigste Krebstodesart bei Frauen den am häufigsten zum Tod führenden Typ gynäkologischer Tumoren dar: Im Jahr 2002 erkrankten weltweit mehr als 200.000 Frauen (entspricht ca. 4% aller Krebsneuerkrankungen) an einem Ovarialkarzinom, etwa 125.000 Frauen (entspricht 4,2% aller Krebstodesfälle) starben an den Folgen der Krankheit. Inzidenz und Mortalität waren in Europa und Nordamerika am höchsten, in Afrika, China und in der Karibik am geringsten ([66], siehe auch Abbildung 2).

Die Entstehung eines Ovarialkarzinoms aus dem Oberflächenepithel des Eierstocks führt man auf die erhöhte Mutationswahrscheinlichkeit auf Grund von Zellproliferation im Rahmen der Wundheilung nach der Ovulation zurück. Dem entsprechend steigt mit zunehmender Zahl von erfolgten Eisprüngen (wachsendem Lebensalter) das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken. Daneben erhöhen Nulliparität, dauerhaft ovulatorische Zyklen und medikamentöse Ovulationsauslösung die Inzidenz. Im Gegensatz dazu scheinen ausgetragene Schwangerschaften und die Dauer der Einnahme von Ovulationshemmern (orale Kontrazeptiva) eine gewisse protektive Wirkung zu haben. Die Einstufung des Ovarialkarzinoms als Alterserkrankung unterstreicht der lineare Zusammenhang zwischen dem Durchschnittsalter am serösen Karzinom erkrankter Frauen und Tumorstadium bzw. Grading [17].

Mehr als 90% der Ovarialkarzinome tritt sporadisch auf, die verbleibenden 5-10% scheinen in Zusammenhang mit einer genetischen Prädisposition zu stehen. Beim Hereditären Ovarialkarzinom wurde die Tumorerkrankung kausal mit Mutationen in den auch für Brustkrebsprädisposition relevanten Genen BRCA-1 und BRCA-2, in den „mismatch repair“-Genen MLH-1 und MSH-2 und im Tumorsuppressorgen p53 in Verbindung gebracht.

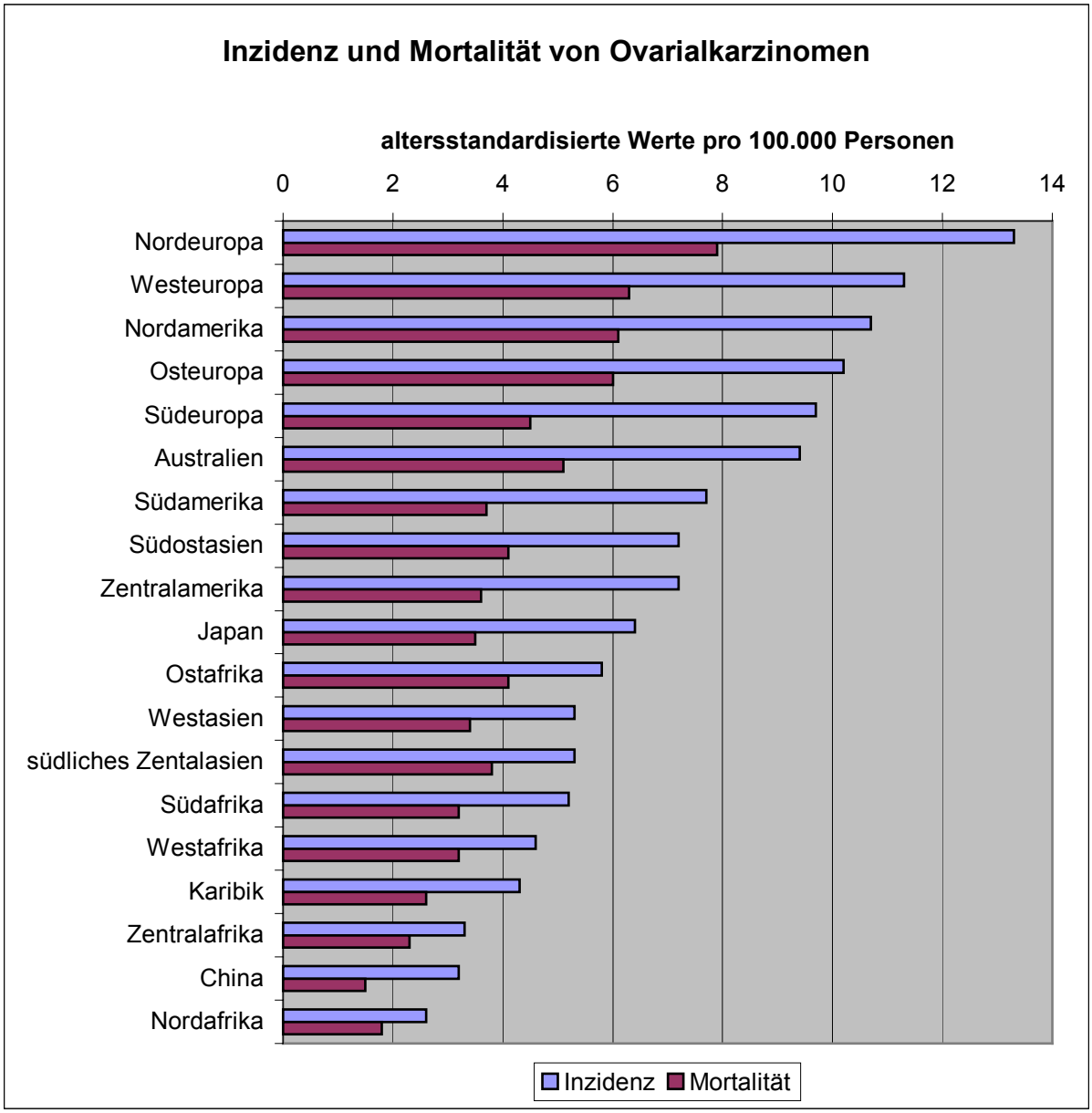


Abbildung 2: Übersichtsdarstellung zu Inzidenz und Mortalität von Ovarialkarzinomen. Die Werte entsprechen den altersstandardisierten Werten pro 100.000 Personen [66].

Tabelle 1: Verteilung von Ovarialkarinomen auf verschiedene Stadien und die durchschnittlichen Anteile der 5 Jahre überlebenden Patientinnen (http://www.dkfz.de/tzhdma/tr26.htm).

FIGO-Stadium	Anteil aller Tumoren	Anteil 5 Jahre Überlebender
I	26%	60-90%
II	15%	40-70%
III	43%	4-15%
IV	16%	0-5%

1.2.1 Histologische Klassifizierung und Stadieneinteilung

Die meisten malignen Ovarialtumoren entstehen aus Neoplasien des Oberflächenepithels, daneben gibt es noch Keimstrang- und Keimzelltumoren, die aber zusammen weniger als 10% der Fälle ausmachen. Die verschiedenen Typen epithelialer Tumoren und ihre Häufigkeiten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Typen epithelialer Ovarialtumoren und die relativen Häufigkeiten ihres Auftretens

Epitheliale Ovarialtumoren	Anteil
Seröses Karzinom	40-53%
Muzinöses Karzinom	7-15%
Endometrioides Karzinom	15-20%
Klarzelliges Karzinom	4-10%
Undifferenzierte Tumoren	5-17%

Die Stadieneinteilung von Ovarialkarzinomen gemäß FIGO („Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique“, Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtshilfe) ergibt sich aus der typischen Ausbreitung im Bauchraum. Die jeweils in genauer spezifizierte Subgruppen eingeteilte Skala reicht von Stadium I (Tumor auf die Ovarien begrenzt) über die Stadien II (bereits Ausbreitung im kleinen Becken) und III (bereits Peritonealmetastasen) bis Stadium IV, das durch das zusätzliche Auftreten von Fernmetastasen definiert ist.

Neben der Stadieneinteilung auf Grund primär klinischer Kriterien werden Ovarialkarzinome auf Basis des Differenzierungsgrades der den Tumor bildenden Zellen eingeteilt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Gradingsystem von Silverberg zur Bestimmung der Tumorzelldifferenzierung

Histopathologisches Grading	Definition
G_X	Differenzierungsgrad kann nicht beurteilt werden
GB	Karzinom mit niedrigem malignem Potential (früher "Borderline-Malignität")
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	undifferenziert

1.2.2 Therapieansätze

Die Standardtherapie des Ovarialkarzinoms umfasst die operative Entfernung eines Großteils der Tumormasse mit meist nachgeschalteter Platin- und Taxan-basierter Chemotherapie. Von Strahlentherapien wird wegen geringen Erfolgen bei starken Nebenwirkungen abgesehen.

Moderne Therapiestrategien richten sich zunehmend gegen definierte molekulare Angriffspunkte. Attraktive „targets“ sind bestimmte Thyrosinkinasen aus der erbB-Familie, vornehmlich der epidermelle Wachstumfaktor-Rezeptor EGFR („epidermal growth factor receptor“), deren Funktion in der Tumorzelle mit Kinaseinhibitoren (z.B. Erlotinib und Gefitinib) oder monoklonalen Antikörpern (z.B. EMD-72000) gestört werden soll. Für maligne Ovarialtumoren liegen für eine Reihe von neuen potentiell wirksamen Substanzen bereits Ergebnisse aus Phase-I- und Phase-II-Studien vor [43].

1.3 Ziele dieser Arbeit

Die für viele Krebsarten nachgewiesene Überexpression von Tspan-1 in malignen Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe oder prämalignen Vorstufen und erste Hinweise auf einen solchen Zusammenhang beim Ovarialkarzinom war der Ausgangspunkt für die Erforschung der Bedeutung von Tspan-1 für Ovarialkarzinomzellen.

Um die Expression und Lokalisation von Tspan-1 in serösen, muzinösen und endometrioiden Ovarialkarzinomen bestimmen zu können, sollten zunächst bis dahin nicht verfügbare anti-Tspan-1-Antikörper ausgehend von Peptiden hergestellt werden. Neben Untersuchungen der Tspan-1-Epression mit dem Ziel, einen mögliche Korrelation mit klinischen oder histologischen Parametern aufzudecken, sollte in einer grundlegenden biochemischen Charakterisierung Tspan-1 im Hinblick auf posttranslationale Modifikationen und seine subzelluläre Lokalisation untersucht werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme und Zelllinien

Escherichia coli (*E. coli*) XL1-Blue, Stratagene, Amsterdam, Niederlande

E. coli DH5α, Invitrogen, Karlsruhe

Ovarialkarzinomzelllinien MDAH-2774, OVCAR-3 und SKOV-3, Zellbank des Endokrinologischen und Onkologischen Labors der Universitätsfrauenklinik Ulm, ursprünglich von der Amerikanischen Zellkultursammlung („American Tissue Culture Collection“), Rockville, USA

2.1.2 Primär- und Detektionsantikörper

anti-GFP (ab290),	Abcam, Cambridge
anti-PentaHis (34660),	Qiagen, Hilden
Ziege-anti-Kaninchen-HRP-Konjugat,	Pierce, Bonn
Ziege-anti-Maus-HRP-Konjugat,	Pierce, Bonn

2.1.3 Plasmidvektoren

pDNR-Dual,	Clontech, Heidelberg
pDONR221,	Invitrogen, Karlsruhe
pLP-CMVneo,	Clontech, Heidelberg
pLP-EGFP-C1,	Clontech, Heidelberg
pLPS-3’-EGFP,	Clontech, Heidelberg
pIEx-8,	Novagen, Darmstadt

2.1.4 Synthetische Oligonukleotide

Alle unten aufgeführten synthetischen Oligonukleotide, die als PCR-Primer eingesetzt wurden, wurden von der Firma Thermo-Fisher (Ulm) synthetisiert.

Primername	Primersequenz
*Att*B1-Tspan-1-ATG	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTG AGC CAC CAT GCA GTG CTT C-3'
*Att*B2-Tspan-1_del-Stop	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTG TAG ATT GCA GTA CAG ATA CAT GGA CAC-3'
BamHI-EGFP-C1-ATG	5'-AAG GAT CCA ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG C-3'
BamHI-Tspan-1-ATG	5'-AAG GAT CCA ATG CAG TGC TTC AGC TTC ATT AAG ACC-3'
Dual-SF1	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGA TC-3'
Dual-SR1	5'-ACC AGG ATC TCC TAG GCT AGT TG-3'
IFF-Tspan-1-ATG	5'-GAA GTT ATC AGT CGA CAT GCA GTG CTT CAG CTT CAT TAA GAC C-3'
IFR-Tspan-1_del-Stop	5'-ATG GTC TAG AAA GCT TTG TAG ATT GCA GTA CAG ATA CAT GGA CAC-3'
IFR-Tspan-1-TAA	5'-ATG GTC TAG AAA GCT TTT ATT GTA GAT TGC AGT ACA GAT ACA TGG ACA CAA TC-3'
M13 Forward (-20)	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'
M13 Reverse	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
NotI-EGFP-C1_del-Stop	5'-AAG CGG CCG CTA ACT TCG TAT AAT GTA TGC TAT ACG AAG TTA TCG AAG C-3'
NotI-Tspan-1_dStop	5'-AAG CGG CCG CTT GTA GAT TGC AGT ACA GAT ACA TGG ACA CAA TC-3'
pIEx-8-SF	5'-TGG ATA TTG TTT CAG TTG CAA G-3'
pIEx-8-SR	5'-CAA CAA CGG CCC CTC GAT A-3'
Tspan-1_N141A_minus	5'-CTT TCA TGG TGG TGG CCC ACA CTT GAG TG-3'
Tspan-1_N141A_plus	5'-CAC TCA AGT GTG GGC CAC CAC CAT GAA AG-3'
Tspan-1_N154A_minus	5'-CAA AAT CCG TAT AGG CGG TGA AGC CAC AGC-3'
Tspan-1_N154A_plus	5'-GCT GTG GCT TCA CCG CCT ATA CGG ATT TTG-3'
Tspan-1_N178A_minus	5'-GCT GTG TTG GTG ACG GCG TCA TTG CAA C-3'
Tspan-1_N178A_plus	5'-GTT GCA ATG ACG CCG TCA CCA ACA CAG C-3'
Tspan-1_N184A_minus	5'-GTG CAG GTT TCA GCG GCT GTG TTG GTG-3'
Tspan-1_N184A_plus	5'-CAC CAA CAC AGC CGC TGA AAC CTG CAC-3'

2.1.5 Medien und Standardlösungen

5x PAGE-Ladepuffer:	375 mM Tris-Cl pH 6,8, 30% (v/v) Glyzerin, 15% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) Bromphenol-blau, optional 10% (v/v) β-Mercaptoethanol
6x-Ladepuffer mit EDTA:	10 mM Tris-Cl pH 7,6, 60 mM EDTA, 60% (v/v) Glyzerin, 0,03% (w/v) Bromphenol-blau, 0,03% (w/v) Xylencyanol
Blotpuffer I:	300 mM Tris pH 10,4, 20% (v/v) Methanol
Blotpuffer II:	25 mM Tris pH 10,4 20% (v/v) Methanol
Blotpuffer III:	25 mM Tris pH 9,4, 40 mM 6-Aminohexansäure, 0,02% (v/v) SDS, 20% (v/v) Methanol)
DMEM hoch-Glukose (4,5g/l) mit L-Glutamin,	PAA, Cölbe
Ethidiumbromid-Lösung,	TAE-Puffer, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid
Fötales Kälberserum Gold,	PAA, Cölbe
Grace's Insect Medium, supplementiert,	Gibco, Karlsruhe
Insect-Xpress Medium	Lonza, Wuppertal
LB (Luria-Bertani)-Medium:	5 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt

LB-Agar:	LB-Medium, 16 g/l Bakto-Agar
Optifreeze Einfriermedium,	ICN, Illkirch, Frankreich
PBS ohne Kalzium und Magnesium,	PAA, Cölbe
Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml),	Gibco, Karlsruhe
Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)/ Fungizone (250 µg/ml),	Gibco, Karlsruhe
SOC-Medium,	Invitrogen, Karlsruhe
TAE-Puffer:	40 mM Trisacetat, pH 8,3, 1 mM EDTA
TBS-Puffer:	40 mM Tris-Cl, pH 7,4 150 mM NaCl
TBST-Puffer:	TBS-Puffer, 0,04% (v/v) Tween-20
TE-Puffer:	10 mM Tris-Cl pH 7,5 1 mM EDTA
Tris-HEPES-SDS-Elektrophoresepuffer:	100 mM Tris, 100 mM HEPES, pH 8,0 3 mM SDS
Trypsin-EDTA in PBS,	PAA, Cölbe

2.1.6 Chemikalien

Basischemikalien und Puffersubstanzen wurden in der Regel in höchster Reinheit von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Fluka (Buchs, Schweiz) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Neben den im Methodenteil gesondert angegebenen Chemikalien wurden folgende spezielle Substanzen von den jeweils aufgeführten Lierferanten gekauft:

Ampicillin,	Sigma, Taufkirchen
Brij 97,	Sigma, Taufkirchen
CHAPS,	Sigma, Taufkirchen
Chloramphenicol,	Sigma, Taufkirchen
Ganciclovir,	Invitrogen, Karlsruhe
Kanamycin,	Sigma, Taufkirchen
Octylglucosid,	Sigma, Taufkirchen

Triton X-100,	Sigma, Taufkirchen
Tween-20,	Merck, Darmstadt

2.1.7 Spezielle Verbrauchsmaterialien und Sonstiges

Filterpapier 3MM Chr,	Whatman, Maidstone, England
FlashGel DNA Cassette,	Lonza, Basel, Schweiz
FlashGel DNA Marker,	Lonza, Basel, Schweiz
PageRuler Prestained Protein Ladder,	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler Prestained Protein Ladder Plus,	Fermentas, St. Leon-Rot
Peqgold O'Range 500 bp Marker	Peqlab, Erlangen
PVDF-Membran, 0,2 µm,	Pall, Portsmouth, England
Starting-Block™ (TBS) Blocking Reagent,	Pierce, Bonn

2.1.8 Geräte

ABI Prism 7700 Gene Analyzer,	Applied Biosystems, Weiterstadt
Biofuge 13,	Heraeus, Hanau
Cryo Einfrierbox,	Nalgene, Hereford, England
DU 640 Photometer,	Beckman, Krefeld
Inkubator Modell 3862 S/N,	Labotect, Göttingen
PCR-Gerät Primus Cycler,	MWG Biotech, Ebersberg
Gelelektrophoresekammer Mini-Protean II,	Bio Rad, München
MRX Mikrotiterplatten-Photometer,	Dynatech Laboratories, Chantilly, USA
Geldokumentationssystem MultiImage™ Light Cabinet,	Biozym, Hessisch Oldendorf
Multifuge 3 S-R,	Heraeus, Hanau
RunOne Elektrophoresekammer,	EmbiTec, San Diego, USA
Semi-Dry-Blotkammer,	Peqlab, Erlangen
Thermomixer 5436,	Eppendorf, Hamburg

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Grundlegende Arbeitstechniken

2.2.1.1 Transformation von Bakterien

Zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA wurden jeweils 50 µl hitzeschockkompetente *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) bzw. DH5α (Invitrogen) mit 1 µl Klonierungsansatz oder 1 ng reinem Plasmid (zur Retransformation) in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 45 Sekunden in einen auf 42°C vorgeheizten Heizblock gestellt und nachfolgend wieder 2 -3 min auf Eis gekühlt. Je Ansatz wurden dann 950 µl auf 37°C vorgewärmtes SOC-Medium (Invitrogen) zugegeben. Nach 45 min Schütteln bei 37°C und 225 Umdrehungen pro Minute (Upm) wurden die Transformanten auf LB-Platten mit den für die verwendeten Vektoren geeigneten Selektionsmarkern ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Bakterien

Zur Langzeitlagerung von *E. coli* –Klonen wurden 800 µl einer Übernachtkultur mit 400 µl Glyzerin in einem 2 ml-Einfrieröhrchen durch zweimaliges kurzes Vortexen gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung dieser Glycerinkulturen erfolgte bei –80°C.

Zum Auftauen eingefrorener Bakterien wurde mit einer sterilen Pipettenspitze ein kleines Stück der noch gefrorenen Glycerinkultur entnommen und diese, nach Auftauen, auf einer LB-Agar-Platte mit entsprechendem Selektionsmarker ausgestrichen.

2.2.1.3 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Zur ***Mini-Plasmidpräparation*** wurden je 5 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium mit einer *E. coli* –Transformantenkolonie beimpft und 15-18 Stunden bei 37°C und 225 Upm geschüttelt. Die Bakterien in 3 ml dieser Kultur wurden dann in zwei Schritten in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß durch Zentrifugieren (1 min bei 5000 x g) pelletiert. Aus dem vom Überstand befreiten Bakterienpellet wurde die Plasmid-DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

Zur ***Maxi-Plasmidpräparation*** wurden je 5 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium mit einer *E. coli* –Transformantenkolonie beimpft und für sieben bis acht Stunden bei 37°C und 225 Upm geschüttelt. Mit 100 – 1000 µl dieser Vorkultur wurden dann 100 ml auf 37°C vorgewärmtes, antibiotikumhaltiges LB-Medium angeimpft, das dann über Nacht bei 37°C und 225 Upm geschüttelt wurde. Die Bakterien wurden dann durch Zentrigugieren für 15 min bei 4°C und 10000 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet und die hochreine Plasmid-DNA zur photometrischen Quantifizierung und Lagerung bei -20°C in TE-Puffer gelöst.

2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen von Nukleinsäurelösungen wurden photometrisch bestimmt. Je nach Art der Probe und dem zu erwartenden Nukleinsäuregehalt wurden 1:30- oder 1:100-Verdünnungen im entsprechenden Lösungspuffer hergestellt und die Extinktionen bei 260 nm und 280 nm (OD_{260} bzw. OD_{280}) gegen den Lösungspuffer gemessen.

Maxi- und Mini-Plasmidpräparate, sowie Mini-RNA-Präparate wurden in der Regel 1:100 verdünnt gemessen, aufgereinigte PCR-Produkte und aus einem Agarosegel eluierte DNA-Fragmente1:30 verdünnt. Die Nukleinsäurekonzentration der Probe wurde unter der Annahme berechnet, dass 1 OD_{260} einer Konzentration von 50 mg/ml doppelsträngiger DNA und 40 mg/ml einzelsträngiger RNA entspricht.

Als Kriterium der Reinheit der Nukleinsäurelösung wurde der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} betrachtet: Werte größer 1,8 stehen für vernachlässigbare Kontamination durch Proteine.

2.2.1.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Klonierung in entsprechend vorbereitete Vektoren oder Charakterisierung von DNA-Fragmenten wurden diese mit ausgewählten Restriktionsenzymen behandelt. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 20 µl pro µg DNA im vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer angesetzt. Die DNA wurde mit einem Überschuss von 10 u Restriktionsenzym pro µg DNA 1-2 Stunden bei 37°C

inkubiert, sofern Herstellerangaben nicht andere Bedingungen nahe legten. Restriktionsenzyme in Ansätzen zur präparativen Spaltung für direkt nachfolgende Klonierungen wurden, wenn möglich, hitzeinaktiviert (üblicherweise Inkubation bei 65°C für 20 min), andernfalls wurden sie durch Reinigen der DNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) entfernt.

Im Fall einer auf die Restriktionsenzymspaltung folgender Agarose-Gelelektrophorese (analytisch und präparativ) wurde die Reaktion durch Zugabe von 20% des Reaktionsvolumens „6x-Ladepuffer mit EDTA“ gestoppt.

2.2.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Herstellung von DNA-Stücken zur Klonierung (siehe 2.2.2), gerichteten Mutagenese (siehe 2.2.2.4) oder zur Größen- und Orientierungsbestimmung klonierter DNA-Sequenzen wurden durch sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) eingegrenzte Regionen mittels PCR amplifiziert.

Dazu wurden pro Ansatz 5 µl 10x Pwo-Puffer (Peqlab), 1 µl 10 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate (Roche), je 3 µl 10 µM „forward“- und „reverse“-Primer und die zur Ergänzung auf ein Endvolumen von 50 µl nötige Menge Wasser in einem 300 µl PCR-Reaktionsgefäß (Eppendorf) auf Eis gemischt. Als „template“ für die Polymerase wurden entweder 0,5-1 ng Plasmid-DNA oder ein Abstrich einer Bakterienkolonie zugesetzt, bevor die Reaktionsmischung durch 2,5 u Pwo-Polymerase (Peqlab) vervollständigt wurde. Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermocycler unter folgenden, beispielhaft angeführten, aber für jedes Experiment optimierten, Reaktionsbedingungen inkubiert: 5 min Initial-denaturierung bei 95°C, 30 Wiederholungen von 30 s Denaturierung bei 95°C, 30 s “annealing“ bei 60°C und 1 min DNA-Synthese bei 72°C. Danach folgte eine 5-minütige terminale DNA-Synthesephase bei 72°C, bevor die Ansätze bis zur Analyse auf 4°C gekühlt wurden.

PCR-Produkte, die zur weiteren Verwendung in Klonierungsexperimenten oder als „templates“ für nachfolgende PCR-Reaktionen vorgesehen waren, wurden mit dem QIAquick PCR-Purification Kit (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt und üblicherweise in 30 µl Elutionspuffer (Tris-Cl, pH 8,5) aufgenommen.

2.2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente aus Restriktionsspaltungen (siehe 2.2.1.5) oder PCR-Produkte (siehe 2.2.1.6) wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Proben wurden mit 20% ihres Volumens 6x-Ladepuffer vermischt und in die Probentaschen eines Agarosegels (üblicherweise 1% Agarose in TAE-Puffer) geladen. Neben den Proben wurde eine Mischung aus DNA-Stücken bekannter Größe (DNA-Längenmarker) aufgetragen, um die Größen der in der Probe enthaltenen DNA-Stücke bestimmen zu können.

Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei 10 V/cm für 30-60 min, danach wurde das Agarosegel 15 min in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und 5 min in TAE entfärbt. Schließlich wurde die DNA im UV-Durchlicht (302 nm) sichtbar gemacht. Das Bandenmuster wurde mit Hilfe eines Video-Geldokumentationssystems (MultiImage™ Light Cabinet) dokumentiert.

Um schnell die Ergebnisse nach analytischen Restriktionsenzymspaltungen oder PCR-Analysen von Bakterienkolonien zu erhalten, wurde gelegentlich das FlashGel-System (Lonza) nach Angaben des Herstellers benutzt.

2.2.1.8 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Bestimmte DNA-Fragmente aus präparativen Restriktionsenzymspaltungen (siehe 2.2.1.5) oder PCR-Produkte (siehe 2.2.1.6) zur weiteren Verwendung in Folgeprozessen wurden nach der Trennung durch Agarose-Gelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstückchen wurde gewogen und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) den Herstellerangaben entsprechend aus der Agarosegelmatrix isoliert.

2.2.2 Herstellung rekombinanter DNAs

2.2.2.1 Klassische Klonierung

Zur Klonierung von DNA in den Vektor pIEx-8 (konstitutive Expression in Insektenzellen) wurden die zu klonierenden Bereiche durch PCR (siehe 2.2.1.6) mit speziellen Primern, an deren 5'-Enden Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen eingefügt waren, amplifiziert. Sowohl der Vektor wie

auch das gereinigte PCR-Produkt wurden (siehe 2.2.1.5) mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Das linearisierte Vektorplasmid und die geschnittene einzufügende DNA („Insert“) wurden durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und aus dem Gel extrahiert (siehe 2.2.1.8), bevor die DNA-Konzentrationen dieser Komponenten bestimmt wurden (siehe 2.2.1.4). In einer Ligationsreaktion mit der T4-DNA-Ligase (Fermentas) wurde das Insert gemäß Herstellerprotokoll in den Vektor eingefügt. Zur Vermehrung wurden kompetente Bakterien mit dem Ligationsansatz transformiert (siehe 2.2.1.1).

Gegenüber dem Selektions-Antibiotikum resistente Bakterienklone wurden durch Kolonie-PCR auf Vorhandensein und Orientierung des Inserts hin überprüft. In der Regel wurden vier als positiv getestete Klone in Glyzerinkulturen eingefroren (siehe 2.2.1.2) und parallel zu Mini-Plasmidpräparationen (siehe 2.2.1.3) herangezogen. Durch Sequenzierung der Plasmide (Seqlab, Göttingen) mit den Primern pIEx-8-SF und pIEx-8-SR wurde die Insertsequenz auf beiden Strängen bestimmt und ein ausgewählter fehlerfreier Klon zur Maxi-Plasmidpräparation (siehe 2.2.1.3) verwendet.

2.2.2.2 Klonierung mit den In-Fusion™- und Creator™-Systemen

Das Creator™-System erlaubt, ausgehend von einem Donorvektor eine DNA-Sequenz durch Wirkung einer Rekombinase einfach in Zielvektoren für verschiedenen Anwendungen zu übertragen [77]. Mit Hilfe des In-Fusion™-Verfahrens kann ein PCR-Produkt ebenfalls Rekombinase-basiert in einen Donorvektor für das Creator™-System kloniert werden.

Mit dem ***In-Fusion™-PCR-Kloniersystem*** (Clontech) wurden PCR-Produkte mit speziellen Sequenzüberhängen an beiden Enden gerichtet in den Donorvektor pDNR-Dual kloniert. An den „forward“-Klonierprimer wurde am 5’-Ende die Sequenz 5’-G AAG TTA TCA GTC GAC-3’, beim „reverse“-Klonierprimer die Sequenz 5’-ATG GTC TAG AAA GCT T-3’ ebenfalls am 5’-Ende angehängt. Die so eingefügten Sequenzüberhänge am PCR-Produkt sind homolog zu den Enden des linearisiert vorliegenden Donorvektors, der sich in *E. coli* nur replizieren kann,

wenn das In-Fusion™-Enzym die homologen Bereiche von PCR-Produkt und Vektor zu einem zirkulären Molekül verknüpft.

Zur Klonierung wurden 50-100 ng gereinigtes PCR-Produkt mit 100 ng linearisiertem pDNR-Dual in Anwesenheit von In-Fusion™-Puffer, BSA und In-Fusion™-Enzym in einem mit Wasser auf 20 µl aufgefüllten Reaktionsansatz vermischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Von der auf Eis zwischenlagerbaren Reaktionsmischung wurde 1 µl zur Transformation von *E. coli* (siehe 2.2.1.1) verwendet. Die Transformanten wurden auf LB-Agar (mit 50 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und 15-18 Stunden bei 37°C inkubiert. Bakterienkolonien wurden durch Kolonie-PCR mit insertspezifischen Primern (siehe 2.2.1.6) auf Vorhandensein der einklonierten DNA überprüft. In der Regel wurden von vier Klonen, die die erwarteten PCR-Produkte ergaben, Glycerinkulturen zur Langzeitlagerung angelegt (siehe 2.2.1.2) und Plasmid-DNA durch Minipräparation isoliert (siehe 2.2.1.3).

Durch Sequenzierung (Seqlab) der pDNR-Dual-Klone mit den Primern Dual-SF1 und Dual-SR1 wurde die Sequenz des Inserts in der multiplen Klonierungsstelle („multiple cloning site“, MCS) auf beiden DNA-Strängen ermittelt. Aus ausgewählten, fehlerfreien Klonen gewonnene Plasmid-DNA wurde für die Folgereaktionen zum Transfer des Inserts in Zielvektoren herangezogen.

Mit dem ***Creator™-System*** (Clontech) wurden die in pDNR-Dual klonierten DNA-Stücke in Akzeptorvektoren für spezielle Anwendungen subkloniert. Bei diesem Verfahren wird in einer durch die Cre-Rekombinase vermittelten Reaktion der Bereich zwischen den zwei *loxP*-Stellen in pDNR-Dual unter Beibehaltung der Orientierung ohne Sequenzverlust in die *loxP*-Stelle des entsprechenden Akzeptorvektors übertragen. Dabei wird nicht nur die MCS mit Insert, sondern auch das in pDNR-Dual promotorlose Chloramphenicol-Resistenzgen übertragen, welches dann durch einen prokaryontischen Promotor vom rekombinanten Akzeptorvektor exprimiert wird. Darüber hinaus kann das erneute Anwachsen von nur pDNR-Dual enthaltenden Klonen durch Selektion mit Saccharose wegen der von einem nicht übertragenen Teil dieses Plasmids exprimierten Saccharase unterdrückt werden.

Je nach Fragestellung dienten pLP-CMVneo (Vektor zur konstitutiven Proteinexpression in Säugerzellen), pLP-EGFP-C1 (Vektor zur konstitutiven Expression eines Fusionsproteins mit mit N-terminalem EGFP in Säugerzellen) und pLPS-3'-EGFP (Vektor zur konstitutiven Expression eines Fusionsproteins mit C-terminalem EGFP in Säugerzellen) als Akzeptorvektoren. Zur Erzeugung rekombinanter Expressionsvektoren wurden je 200 ng pDNR-Dual mit fehlerfreiem Insert und dem entsprechenden Akzeptorvektor mit BSA, Cre-Reaktionspuffer und Cre-Rekombinase (alles von Clontech) in einem mit Wasser auf 20 µl aufgefüllten Ansatz entsprechend den Herstellerangaben gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Enzymreaktion durch fünfminütige Inkubation bei 70°C inaktiviert. Vom Reaktionsansatz wurde 1µl zur Transformation von *E. coli* (siehe 2.2.1.1) verwendet, die auf LB-Agar mit 30 µg/ml Chloramphenicol und 7% (w/v) Saccharose ausplattiert wurden. Die nach 15-18 Stunden Inkubation bei 37°C erhaltenen Kolonien wurden durch Kolonie-PCR (siehe 2.2.1.6) mit insertspezifischen Primern überprüft. Positive Klone wurden eingefroren (siehe 2.2.1.2) und einer dieser Klone zur Plasmid-Maxipräparation (siehe 2.2.1.3) herangezogen.

2.2.2.3 Klonierung mit dem Gateway®-System

Zur Herstellung rekombinanter, Tspan-1 in Sf9-Zellen exprimierender Baculoviren wurde das BaculoDirect™ Baculovirus Expression System (Invitrogen) verwendet, welches auf der Gateway®-Technologie beruht. Ähnlich zum In-Fusion™-und Creator™-System (siehe 2.2.2.2) können PCR-Produkte mit bestimmten Sequenzüberhängen, den *att*B-Stellen, durch eine konservative Rekombinationsreaktion (BP-Reaktion) mit den *att*P-Stellen geeigneter „Entry"-Vektoren (hier pDONR221) gerichtet kloniert werden. Nach der BP-Reaktion enthält der „Entry"-Klon das durch die PCR-Primer definierte Insert flankiert von *att*L-Stellen. Diese erlauben bei der nachfolgenden LR-Reaktion, das Insert auf Zielsequenzen in „Destination"-Vektoren zu übertragen, welche durch die *att*R-Stellen eingegrenzt sind [21].

Mit den Primern *Att*B1-Tspan-1-ATG und *Att*B2-Tspan-1_del-Stop wurde die Tspan-1-CDS ohne Stop-Codon ausgehend von dem IMAGE („**I**ntegrated **M**olecular **A**nalysis of **G**enomes and their **E**xpression Consortium")-Klon 2959379

amplifiziert (siehe 2.2.1.6), das PCR-Produkt gereinigt und dessen Konzentration bestimmt (siehe 2.2.1.4). Zur Durchführung der ***BP-Reaktion*** wurden 100 fmol des ca. 800 bp großen PCR-Produkts (entsprechen 52,8 ng) mit 300 ng pDONR221 im mitgelieferten Reaktionspuffer mit dem BP-Clonase-Enzym in einem Endvolumen von 20 µl eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µg Proteinase K und zehnminütiger Inkubation bei 37°C gestoppt, bevor mit 1 µl der Reaktionsmischung *E. coli* transformiert (siehe 2.2.1.1) wurde. Aus den auf LB-Agar mit 30 µg/ml Kanamycin über Nacht bei 37°C gewachsenen Klonen wurde Plasmid-DNA durch Minipräparation isoliert (siehe 2.2.1.3). Positive pDONR221-Tspan-1 Klone (Sollgröße 3276 bp) konnten von nicht rekombinantem pDONR221 (4761 bp) direkt durch Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.1.7) der EcoRV-linearisierten Plasmide (siehe 2.2.1.5) unterschieden werden. Die Sequenz des Inserts wurde auf beiden Strängen mit den Primern M13 Forward (-20) bzw. M13 Reverse bestimmt (Seqlab). Ausgehend von einem der fehlerfreien Klone wurde hochreine Plasmid-DNA durch Maxipräparation (siehe 2.2.1.3) gewonnen.

Zur Durchführung der ***LR-Reaktion*** wurden in einem 20 µl-Reaktionsvolumen 300 ng pDONR221-Tspan-1, 300 ng linearisierte BaculoDirect™-DNA und TE-Puffer (10 mM Tris-Cl pH 8,0, 1mM EDTA) mit 4 µl LR-Clonase II durch leichtes Antippen gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Um rekombinanter Baculoviren herzustellen, wurde (abweichend vom Herstellerprotokoll) der gesamte Reaktionsansatz zur Transfektion von Sf9-Zellen mit Insect GeneJuice (Novagen) (siehe 2.3.2.2) eingesetzt. Die daraus erhaltene, wenig infektiöse Viren enthaltende Lösung wurde zur Infektion von Sf9-Zellen verwendet, um Viruslösungen mit hohem infektiösem Titer herzustellen (siehe 2.3.2.2).

2.2.2.4 Gerichtete Mutagenese

Um die N-Glykosylierung von rekombinant exprimiertem Tspan-1 an seinen potentiellen N-Glykosylierungsstellen unmöglich zu machen, wurden die Asparagine des N-Glykosylierungsmotivs N-X-T/S (X steht für eine beliebige Aminosäure außer Prolin) an den Aminosäurepositionen 141, 154, 178 und/oder 184 durch Alanine ersetzt. Für jede einzuführende Mutation wurde die für Tspan-1 kodierende Sequenz („coding sequence“, CDS) in zwei an der Mutationsstelle überlappenden Teilen mit mutationstragenden Primern amplifiziert (siehe 2.2.1.6).

Die beiden Amplikons wurden durch Agarose-Gelelektrophorese und nachfolgender Elution (siehe 2.2.1.8) gereinigt und in gleichen Stoffmengen als „templates“ zur PCR-Amplifikation der gesamten, nun mutierten CDS verwendet. Die Reaktion weicht von der in 2.2.1.6 beschriebenen Standard-PCR insofern ab, als dass zunächst ohne Primer zehn Wiederholungen des folgenden Prozesses vorgeschaltet waren: 30 s 95°C, 30 s 58°C, 45 s 72°C. Dabei wurden die überlappenden, mutationstragenden Bereiche beider Amplikons, die miteinander hybridisierten, durch DNA-Synthese zu einem die Mutation enthaltenden Doppelstrang vervollständigt. Nach 2-minütiger abschließender DNA-Synthese bei 72°C wurden In-Fusion™-kompatible Primer (siehe 2.2.2.2) zugegeben und die komplette CDS amplifiziert (siehe 2.2.1.6). Der Reaktionsansatz wurde einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen (siehe 2.2.1.7) und die Bande in der erwarteten Größe des Endprodukts ausgeschnitten, um daraus die DNA zu extrahieren (siehe 2.2.1.8). Nach der Bestimmung der DNA-Konzentration (siehe 2.2.1.4) wurde das die Mutation enthaltende PCR-Produkt mit dem In-Fusion™-System kloniert (siehe 2.2.2.2).

2.2.3 Bestimmung der relativen Expression spezifischer mRNAs in Säugerzellen

Zur ***Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen*** wurden pro Ansatz etwa 10^6 Zellen in eiskaltem PBS abgeschabt, für 5 min bei 300 x g und 4°C pelletiert. Das vom Überstand befreite Zellpellet wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) dem Herstellerprotokoll entsprechend aufgearbeitet und abschließend die RNA mit RNAse-freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (siehe 2.2.1.4).

Mittels einer ***reversen Transkription*** (RT) wurden zu den isolierten RNAs komplementäre einzelsträngige DNAs (cDNAs) hergestellt. Dazu wurden den Vorgaben des Herstellers der „TaqMan Reverse Transcription Reagents“ (Applied Biosystems) 200 ng RNA pro 10 µl Reaktionsvolumen in 1x TaqMan RT-Puffer mit 5,5 mM $MgCl_2$, je 500 µM dNTPs, 2,5 µM einer Mischung aller möglichen Hexanukleotidprimer, 4 u RNAseinhibitor und 12,5 u Multiscribe™ Reverse Transkriptase auf Eis gemischt. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei 25°C, 30 min bei 48°C und 5 min bei 95°C inkubiert und danach kurzzeitig bei 4°C gelagert.

Mit einer ***quantitativen Echtzeit-RT-PCR*** wurde die Menge bestimmter, durch RT erhaltener cDNAs bestimmt. In üblicherweise aus zwei- oder drei unabhängigen Experimenten hervorgegangenen Duplex-Ansätzen wurde mit einem transkriptspezifischen, eine FAM-markierte TaqMan-Sonde enthaltenden Assay (Hs00371661_m1 Tspan-1 Gene Expression Assay, Applied Biosystems) die Tspan-1-Expression und gleichzeitig, als endogene Kontrolle, mit einem eine VIC-Sonde enthaltenden Assay (Human B2M Endogenous Control 4310886E, Applied Biosystems) die Expression des β2-Mikroglobulins (B2M) gemessen. Hierfür wurden pro 25 µl-Reaktion 12,5 µl „2x TaqMan Gene Expression Master Mix“ (Applied Biosystems), je 1,25 µl „Tspan-1-Gene Expression Assay“ und „B2M-Endogenous Control“, sowie 1 µl cDNA-Lösung mit 9 µl Wasser vermischt und im „ABI Prism 7700 Gene Analyzer“ folgenden Bedingungen ausgesetzt: 2 min 50°C, 10 min 95°C, 40x (15 sec 95°C, 1 min 60°).

In der ***Auswertung*** der erhaltenen Fluoreszenzsignale wurde die Transkriptmenge von Tspan-1 auf die des als konstant exprimiert angenommenen β2-Mikroglobulins bezogen. Dazu wurden zunächst Mittelwerte der Ct-Werte (Zahl der PCR-Zyklen, bei der ein festgelegter Fluoreszensgrenzwert überschritten wird) aller zusammengehörigen Proben und die Standardabweichungen berechnet. Der ΔCt-Wert berechnet sich aus der Differenz der Ct-Werte von B2M und Tspan-1. Unter der Annahme, dass die Amplifikationen in beiden Assays mit gleichen Effizienzen verlaufen und diese im differenziellen Bereich eine dem theoretischen Wert (~ 2^n) entsprechenden Produktbildung erlaubt, entspricht $2^{\Delta Ct}$ dem Verhältnis der Expressionen von Tspan-1 und B2M. Zum Vergleich der Tspan-1-Expressionen verschiedener Proben wurden die so ermittelten ΔCt-Werte durch Differenzbildung mit dem größten ΔCt-Wert normiert ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{max}$) und die relativen Expressionen der Proben zueinander mit $2^{-\Delta\Delta Ct}$ berechnet [10]. Die Gesamtstandardabweichung wurde mit der üblichen Fehlerfortpflanzungs-rechnung ermittelt.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Zellkultur

2.3.1.1 Kultivierung von Säugerzellen

Alle in den Versuchen verwendeten Ovarialkarzinomzelllinien wurden in DMEM (mit Phenolrot, 4,5 g/l Glucose, 584 mg/l L-Glutamin; PAA), dem 10% (v/v) fötales Kälberserum („fetal calf serum“, FCS; Fetal Bovine Serum Gold, PAA) und 1% (v/v) Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)-Stammlösung (Gibco) zugesetzt worden waren, in Zellkulturflaschen der Firma BD-Falcon kultiviert. Die Kulturbedingungen von 37°C, 5% CO_2 und 90% wassergesättigter Luft wurden in Zellkultur-Brutschränken (Modell 3862 S/N, Labotect) konstant gehalten.

Kultivierte Zellen wurden täglich mikroskopisch begutachtet und bei etwa 95% Konfluenz passagiert. Dazu wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums mit auf 37°C vorgewärmtem PBS gewaschen und mit warmer Trypsinlösung (0,5 mg/ml Trypsin, 0,22 mg/ml EDTA in PBS ohne Kalzium und Magnesium; PAA) bis zur Ablösung vom Kulturgefäß bei 37°C inkubiert. Die Ablösereaktion wurde durch Zugabe von mindestens dem dreifachen Volumen der Trypsinlösung entsprechender Mengen Medium mit FCS abgestoppt und die Zellen darin resuspendiert. Etwa ein Fünftel dieser Zellsuspension wurde zum Animpfen frischen Mediums in neuen Zellkulturgefäßen gleicher Größe verwendet.

Zur Langzeitlagerung von Ovarialkarzinomzelllinien wurden etwa 10^7 Zellen wie oben beschrieben vom Zellkulturgefäß abgelöst, in ein steriles 50 ml-Gefäß (BD-Falcon) überführt und 5 min bei 300 x g und Raumtemperatur pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1,5 ml eiskaltem Einfriermedium (Optifreeze, ICN) resuspendiert. Die Suspension wurde in ein 2 ml-Einfrierröhrchen (Greiner, Nürnberg) überführt, kurz auf Eis vorgekühlt und zum verzögerten weiteren Herunterkühlen in einer Einfrierbox (Cryo, Nalgene) über Nacht in einen –80°C-Gefrierschrank gestellt. Die Röhrchen mit so eingefrorenen Zellen wurden dann in Lagerbehälter mit flüssigem Stickstoff zur langfristigen Bewahrung überführt.

Eingefrorene Ovarialkarzinomzelllinien konnten wieder in Kultur genommen werden, indem man die gefrorene Zellsuspension unter leichtem Schwenken in

einem 37°C-Wasserbad schnell fast vollständig auftaute und in ein 50 ml-Reaktionsgefäß mit 10 ml 37°C warmem Medium überführte. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 300 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und die Zellen nach Entfernen des Überstandes in 15 ml warmem Medium resuspendiert, das dann zur weiteren Kultivierung der Zellen in eine 75 cm^2-Zellkulturflasche überführt wurde.

2.3.1.2 Insektenzellen

Sf9-Zellen wurden in Grace's Insect Medium (Invitrogen), vervollständigt mit 10% (v/v) FCS + 1% (v/v) Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10000 µg/ml)/Fungizone (250 µg/ml) (PSF, Gibco) bei 27°C in Zellkulturflaschen der Firma BD-Falcon kultiviert. Die Zellen wurden täglich mikroskopisch begutachtet und bei etwa 95% Konfluenz passagiert. Dazu wurden die Zellen in frischem Medium mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht) vom Kulturgefäß abgelöst, resuspendiert und etwa 20% der Zellsuspension zum Animpfen frischen Mediums in einem Zellkulturgefäß gleicher Größe verwendet.

Zur Langzeitlagerung wurden Sf9-Zellen pelletiert und in eiskaltem Sf9-Einfriermedium, bestehend aus 60% (v/v) Grace's Insect Medium, 30% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO), mit einer Dichte von 10^7 Zellen/ml resuspendiert. Portionen von 1 ml wurden wie beschrieben (2.3.1.1) eingefroren und gelagert.

Zur Rekultivierung von Sf9-Zellen wurde ein Einfrierröhrchen aus dem Stickstoff entnommen und die Zellsuspension im 37°C-Wasserbad fast vollständig aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in eine 75 cm^2-Zellkulturflasche (BD Falcon) mit 14 ml auf 27°C vorgewärmtes Kulturmedium (s.o.) überführt und eine Stunde bei 27°C inkubiert. Um das im Sf9-Einfriermedium enthaltene DMSO weitgehend zu entfernen, wurde das Medium vor der weiteren Kultivierung erneuert.

2.3.2 Transfektion

2.3.2.1 Transfektion von Säugerzellen

Zur ***Transfektion mit GeneJuice*** (Novagen/Merck, Darmstadt) wurden (exemplarisch für eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte) ca. 2 x 10^5 OVCAR-3-Zellen in 3 ml DMEM mit 10% (v/v) FCS ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert, so dass zum Zeitpunkt der Transfektion die Zellen 30-50% konfluent

waren. Dann wurden zu 100 µl 37°C warmem DMEM 3 µl GeneJuice pipettiert und durch Vortexen mit dem Medium gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1 µg hochreine Plasmid-DNA (siehe 2.2.1.3) zugegeben, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und die Mischung weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Transfektionsgemisch in das Medium über den Zellen gemischt, die weitere 48 Stunden im Brutschrank inkubiert wurden.

Zur ***Transfektion mit Fugene HD*** (Roche) wurden MDAH-2774-, OVCAR-3- oder SKOV-3-Zellen in einer Vertiefung einer 6-Loch-Platte in 2 ml DMEM mit 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin-Stammlösung (s.o.) so ausgesät, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion 80-90% konfluent waren. Dann wurden in einem 15 ml-Polystyrol-Reaktionsgefäß (Falcon) 2 µg hochreine Plasmid-DNA in 100 µl 37°C warmem DMEM verdünnt, zu dem 5 µl auf Raumtemperatur vorgewärmtes, gut durchmischtes Fugene HD gemischt wurden. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die so bereitete Transfektionslösung mit dem Medium über den Zellen vermischt und die Zellen weitere 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

2.3.2.2 Transfektion von Insektenzellen

Die Plasmidtransfektion von Sf9-Zellen mit auf dem Expressionsvektor pIEx-8 (Novagen/Merck) basierenden Konstrukten wurde mit Insect GeneJuice (Novagen/Merck) durchgeführt. Exemplarisch für eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte wurden etwa 8 x 10^5 Sf9-Zellen in 2 ml serumfreiem Insect-XPress-Medium (Lonza) ausgesät und eine Stunde zum Adhärieren der Zellen bei 27°C inkubiert. Danach wurden je 2 µg hochreine Plasmid-DNA (siehe 2.2.1.3) und 10 µl Insect GeneJuice in jeweils 100 µl Insect-XPress-Medium aufgenommen und die verdünnte DNA langsam auf die Insect GeneJuice-Verdünnung aufgetropft und durch Antippen des Gefäßes vorsichtig gemischt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 800 µl Insect-XPress-Medium zum Transfektions-gemisch gegeben und dieses durch Invertieren des Gefäßes gemischt. Das Medium der zu einer Konfluenz von 70-80% ausgesäten Zellen wurde abgesaugt und das Transfektionsgemisch auf die Sf9-Zellen aufgetropft. Die transfizierten Zellen wurden 24 Stunden bei 27°C inkubiert, bevor das Transfektionsmedium durch 2 ml Grace's Insect Medium mit 10% (v/v) FCS + 1% (v/v)

Penicillin/Streptomycin/Fungizone-Lösung (s.o.) ersetzt wurde. Bis zur Ernte (üblicherweise 48 bzw. 72 Stunden nach Transfektion) wurden die Zellen weiter bei 27°C inkubiert.

Transfektionen rekombinanter Baculovirusgenome aus Gateway®-Klonierungen (siehe 2.2.2.3) wurden zur Virusprodukion in Sf9-Zellen abweichend vom Protokoll des Herstellers nicht mit Cellfectin (Invitrogen), sondern mit Insect GeneJuice durchgeführt. Die Vorgehensweise entsprach im Wesentlichen der oben beschriebenen Plasmidtransfektion mit 20 µl LR-Reaktionsansatz (siehe 2.2.2.3) anstelle der Plasmid-DNA. 24 Stunden nach Transfektion wurde das Transfektionsmedium durch 2 ml Grace's Insect Medium mit 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) PSF und 100 µM Ganciclovir ersetzt und die transfizierten Zellen zusammen mit einem angefeuchteten Papierhandtuch in Polyethylen-Folie eingeschweißt bei 27°C inkubiert. Sechs Tage nach der Transfektion wurden die infizierten Sf9-Zellen mitsamt Medium auf zwei Vertiefungen einer 6-Loch-Zellkulturplatte verteilt. Nach Auffüllen von Medium auf 2 ml pro Vertiefung wurden die Zellen bis zur Ernte der rekombinanten Baculoviren am Tag 15 nach Transfektion bei 27°C in feuchter Atmosphäre eingeschweißt inkubiert. Danach wurden die infizierten Sf9-Zellen abgeschabt und Zelltrümmer durch fünfminütige Zentrifugation bei 300 x g und Raumtemperatur pelletiert. Der virushaltige, niedrig infektiöse Überstand wurde in einfrisches Reaktionsgefäß überführt und im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Zur Herstellung einer hoch infektiösen Viruslösung wurden 8 x10^5 Sf9-Zellen in einer Vertiefung einer 6-Loch-Platte in 2 ml Grace's Insect Medium mit 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) PSF und 100 µM Ganciclovir ausgesät und eine Stunde bei 27°C inkubiert. Zu den dann adhärenten Zellen wurden 10 µl der niedrig infektiösen Viruslösung gegeben. Nach vier Tagen Inkubation der zusammen mit einem angefeuchteten Papierhandtuch eingeschweißten Platte bei 27°C wurde der hoch infektiöse Virusüberstand geerntet (siehe oben) und bei 4°C im Dunkeln gelagert. Zur Proteinproduktion wurden 8 x 10^5 Sf9-Zellen in gleicher Weise mit 5 µl der hoch infektiösen Viruslösung infiziert und nach 48 bis 72 Stunden geerntet.

2.3.3 Hemmung der Glykosylierung mit membranpermeablen Inhibitoren

Zur ***Inhibition der N-Glykosylierung*** von Proteinen [47] wurde der spezifische Inhibitor Tunicamycin (Sigma, Taufkirchen) aus *Streptomyces lysosuperficus* verwendet, der die Bildung des Dolichol-PP-N-Acetylglucosamin hemmt. Die Reinsubstanz wurde in 80% (v/v) Ethanol und 20% (v/v) 20 mM NaOH vollständig gelöst und eine Stammlösung der Konzentration 1 mg/ml angesetzt. In MDAH-2774- und OVCAR-3-Zellen wurde die N-Glykosylierung neu synthetisierter Proteine durch 24- bzw. 40-stündige Inkubation mit 2,5 µg Tunicamycin pro Milliliter Standard-Kulturmedium unterdrückt.

Die ***Inhibition der komplexen und hybriden Glykosylierung*** wurde durch Einsatz der Inhibitoren 1-Deoxymannojirimycin [16] und Mannostatin A [16, 89] (beide von Calbiochem, Darmstadt) erreicht. 1-Deoxymannojirimycin (Stammlösung 10 mg/ml in 10% (v/v) Ethanol und 90% (v/v) Wasser), das im Golgi-Apparat die α-Mannosidase I hemmt, wurde in einer Konzentration von 100-200 µg/ml 48 Stunden in Kulturmedien der MDAH-2774- und OVCAR-3-Zellen angewandt. Mannostatin A (Stammlösung 1 mg/ml in Wasser), das im Golgi die die α-Mannosidase II inhibiert, wurde in einer Konzentration von 2,5 µg/ml gleich lange eingesetzt.

2.3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Tspan-1 wurden MDAH-2774- und OVCAR-3-Zellen in 12-Loch-Zellkulturplatten (BD-Falcon) auf sterilen Deckgläschen (Menzel, Braunschweig) ausgesät. Die Transfektion der Zellen zur Expression von Fusionsproteinen aus Tspan-1 und N- bzw. C-terminalem EGFP (siehe 2.2.2.2) wurde mit Fugene HD durchgeführt (siehe 2.3.2.1). Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet. Dazu wurden sie zweimal in eiskaltem PBS gewaschen, 10 min in 4% (w/v) Paraformaldehyd bei 4°C fixiert und zwei weitere Male in eiskaltem PBS gewaschen. Die Proben wurden dann mit „Vectashield™ Hard Set Mounting Medium with DAPI“ (Vector) eingedeckt und dabei auf Objektträger aufgebracht. Aushärten des Eindeckmediums und Färbung der DNA mit DAPI fanden für 15-18 Stunden bei 4°C im Dunkeln statt.

Die Präparate wurden im BX51-Fluoreszenzmikroskop (Olympus) mit 1000-facher Vergrößerung unter Einstrahlung der geeigneten Anregungswellenlänge (DAPI=345 nm, EGFP=489 nm) angesehen und die Bilder mit Hilfe der Software AnalySIS (Version 5.1, Soft Imaging Systems, Münster) aufgezeichnet und bearbeitet.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Zelllyse und Solubilisierung der Membranproteine

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen in kaltem PBS abgeschabt und bei 4°C und 300 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde nochmals in kaltem PBS gewaschen und in 500 µl pro 10^7 Zellen kaltem Lysepuffer (siehe Tabelle 4) resuspendiert. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis, in der die Suspension mehrfach vorsichtig durchmischt wurde, wurden unlösliche Zelltrümmer durch zehnminütige Zentrifugation bei 14.000 x g und 4°C pelletiert. Die in ein frisches Reaktionsgefäß überführten Lösungen enthielten üblicherweise 3-5 mg/ml Gesamtprotein.

Tabelle 4: In Lysepuffern verwendete Detergenzien. Die Lysepuffer wurden mit einem Detergenz mit der angegebenen Konzentration in TBS (40 mM Tris-Cl pH 7,4, 150 mM NaCl) ausgehend von Stammlösungen in Wasser, die bei -20°C gelagert wurden, angesetzt. Proteaseinhibitoren wurden durch eine „Complete Mini EDTA-free"-Tablette (Roche) pro 10 ml Puffer zugegeben.

Detergenz	Konzentration	Stammlösung
Brij 97	1% (v/v)	10% (v/v)
CHAPS	10 mM	200 mM
Octylglucosid	50 mM	1000 mM
Triton X-100	1% (v/v)	20 %

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts in Zelllysaten (siehe 2.4.1) wurde mit dem „BCA™ Protein Assay" (Perbio, Bonn) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die photometrische Messung des gebildeten

Farbstoffs wurde mit dem Mikrotiterplatten-Photometer MRX (Dynatech Laboratories) bei 570 nm durchgeführt.

2.4.3 Immunpräzipitation

Zur selektiven Aufreinigung eines Proteins oder von Proteinkomplexen aus Solubilisaten (siehe 2.4.1) wurde zu 300-500 µl der erhaltenen Proteinlösung eine experimentell ermittelte oder vom jeweiligen Hersteller empfohlene Menge Primärantikörper (typischerweise 5 µg/ml) zugegeben und eine Stunde auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurden 15 µl einer Suspension von Protein G Plus/Protein A-Agarose (Calbiochem) pro µg Primärantikörper einmal in TBS und einmal in Lysepuffer (siehe Tabelle 4) gewaschen, wobei je 3 min bei 700 x g zentrifugiert wurde. Für diese und die nachfolgend erwähnten Waschschritte wurde mindestens das zehnfache Volumen der ursprünglichen Protein A/G-Suspension eingesetzt.

Die präequilibrierten Protein A/G-Partikel wurden in dem mit dem Antikörper versetzten Solubilisat resuspendiert und eine Stunde bei 4°C langsam bewegt, um ihr Sedimentieren zu verhindern. Danach wurden die „beads“ mit gebundenem Antikörper-Antigen-Komplex abzentrifugiert und unspezifisch gebundene Proteine durch dreimaliges Waschen mit Lysepuffer entfernt. Die Elution des Antikörper-Antigen-Komplexes erfolgte in, bezogen auf die „beads“, doppeltem Volumen Lysepuffer mit 2% (w/v) SDS durch zehnminütige Inkubation bei 60°C. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.

2.4.4 Enzymatische Deglykosylierung von Proteinen

Zum enzymatischen Entfernen von N-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden von Glykoproteinen wurden durch Immunpräzipitation (siehe 2.4.3) gereinigte Proteine laut Herstellerangaben (New England Biolabs, Frankfurt) zunächst 10 min bei 95°C in Anwesenheit von 40 mM DTT denaturiert. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C mit dem Enzym Endo H_f, das die β-1-4-Bindung zwischen den zwei N-Acetylglucosaminen der Kernregion von mannosereichen und manchen hybriden Kohlehydratstrukturen spaltet.

2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Größentrennung von Proteinen erfolgte durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS in einem grundsätzlich auf dem Laemmli-System [46] basierenden, aber modifizierten Verfahren.

Zu einer zu analysierenden Proteinlösung wurden 25% des Probenvolumens 5x PAGE-Ladepuffer (375 mM Tris-Cl pH 6,8, 30% (v/v) Glyzerin, 15% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) Bromphenolblau; falls die Reduktion der Proteine erforderlich war, wurde der Ladepuffer frisch mit zusätzlich 10% (v/v) β-Mercaptoethanol angesetzt) zugemischt. Nach Erhitzen (2 min bei 95°C) wurden die Proben neben einem aus farbstoffmarkierten Proteinen bestehenden Größenstandard (PAGE-Ruler bzw. PAGE-Ruler Plus, Fermentas) in die Probentaschen vorgefertigter Precise™-Proteingele (Pierce, Bonn) mit Acrylamidpolymeranteilen von 12%, 8-16% oder 4-20% aufgetragen. Die Elektrophorese fand in dem für die verwendeten Gele vorgesehenen Tris-HEPES-SDS-Puffer (100 mM Tris, 100 mM HEPES, 3 mM SDS, pH 8,0) nach zehnminütigem Vorlauf bei 5 V/cm bei einer Feldstärke von 10 V/cm bis zu optimaler Bandentrennung der vorgefärbten Markerproteine in einer Mini-Protean II-Kammer (Bio Rad) statt.

2.4.6 Western Blot und Immundetektion

Zum Übertragen der durch SDS-PAGE (siehe 2.4.5) nach Molekülgrößen aufgetrennten Proteine auf PVDF-Membranen unter Erhalt des Bandenmusters wurde das „Semi-Dry“-Blotverfahren angewandt [44]. Der elektrophoretische Transfer erfolgte in der im Wesentlichen aus zwei planaren Elektroden bestehenden Blot-Apparatur (Peqlab, Erlangen) von oben (Kathode) nach unten (Anode) in einer wie folgt aufgebauten Transfereinheit: Vier Filterpapiere getränkt in Blotpuffer I (300 mM Tris, pH 10,4, 20% (v/v) Methanol), zwei Filterpapiere getränkt in Blotpuffer II (25 mM Tris, pH 10,4, 20% (v/v) Methanol), PVDF-Membran, Polyacrylamidgel, vier Filterpapiere getränkt in Blotpuffer III (25 mM Tris, 40 mM 6-Aminohexansäure, pH 9,4, 0,02% (v/v) SDS, 20% (v/v) Methanol). Die verwendeten PVDF-Membranen wurden zunächst in Methanol durchfeuchtet, durch viermaliges kurzes Waschen in Wasser hydrophilisiert und, genau wie die Polyacrylamidgele, durch fünf Minuten Inkubation in Blotpuffer II präequilibriert. Der Proteintransfer erfolgte in 60 min bei einem konstanten Strom von 1,5 mA/cm^2

Membranfläche. Das vollständige Übertragen der gefärbten Markerproteine wurde als Indikator für gute Blotbedingungen betrachtet.

Zur Immundetektion transferierter Proteine wurden zunächst die noch freien Proteinbindungsstellen der PVDF-Membran durch etwa 60-minütige Inkubation mit Blockierpuffer (StartingBlock™ (TBS), Pierce) abgesättigt. Danach wurde der Blockierpuffer erneuert, eine experimentell ermittelte oder vom Hersteller angegebene Menge Primärantikörper zugegeben und die Membran für 15-18 Stunden bei 4°C und leichtem Schütteln inkubiert. Überschüssige, ungebundene Primärantikörper wurden durch fünf je fünfminütige Waschschritte (2x TBS, 1x TBST, 2x TBS) entfernt. Zur Detektion des gebundenen Primärantikörpers wurde die Membran eine Stunde mit einem von der Art des Primärantikörpers abhängigen Sekundärantikörper-Peroxidase (HRP)-Konjugat (meist 1:100.000 verdünnter anti-Maus-HRP oder anti-Kaninchen-HRP, Pierce) in Blockierpuffer inkubiert und wie nach Inkubation mit dem Primärantikörper gewaschen.

Gebundene HRP-Sekundärantikörper wurden mit dem SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (Pierce) nach Anweisung des Herstellers in Form von Chemilumineszenzsignalen, die nach Entwickeln der im Dunkeln auf die Membran gelegten Röntgenfilme (Hyperfilm, Amersham, Buckinghamshire, England) als Schwärzungen erkennbar waren, sichtbar gemacht.

2.4.7 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen Tspan-1-Peptide

2.4.7.1 Immunisierung von Kaninchen mit synthetischen Peptiden

Die Herstellung polyklonaler Antikörper gegen Tspan-1 wurde von der Firma Charles River (Kissleg) durchgeführt. Als Immunogene wurden synthetische Peptide aus 12-15 Aminosäuren verwendet, die Teile der Primärstruktur von Tspan-1 repräsentierten. Wo erforderlich wurde ein N-terminales Cystein angehängt, um über eine reaktive Thiol-Seitengruppe die durch einen Quervernetzer („Crosslinker“) vermittelte Bindung an das Trägerprotein „keyhole limpet hemocyanin“ (KLH) zu ermöglichen.

In je zwei weibliche, mindestens 3,5 kg schwere Kaninchen des Stammes NZW, wurden zur Erstimmunisierung 0,6 mg des an KLH gekoppelten Peptids subkutan injiziert, bei den nachfolgenden Auffrischungen an den Tagen 28, 42 und 56 nur noch je 0,4 mg. Bei der Erstimmunisierung wurde Vollständiges

Freundsches Adjuvans (CFA, „complete Freund's adjuvant") verwendet, bei den nachfolgenden Immunisierungen Unvollständiges Freundsches Adjuvans (IFA, „incomplete Freund's adjuvant"). Serumproben der Tiere wurden unmittelbar vor der Erstimmunisierung (Präimmunserum) und an den Tagen 38 und 52 entnommen und die spezifische Immunantwort der Tiere im ELISA („Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay") gegen die zur Immunisierung eingesetzten Peptide bestimmt. Am Tag 70 wurden die Tiere entblutet, das antikörperhaltige Serum gewonnen und in Portionen bei –20°C gelagert.

2.4.7.2 Reinigung der Antikörper aus Kaninchenserum

Zur Verminderung unspezifischer Hintergrundsignale in experimentellen Anwendungen wurden die in den anti-Tspan-1-Kaninchenseren enthaltenen Antikörper (siehe 2.4.7.1) gereinigt. Im Gegensatz zum klassischen Verfahren der Protein A/G-Affinitätschromatographie wurden stark vertretene, aber für die spezifische Immunreaktion irrelevante, Proteine aus dem Serum entfernt. Dafür wurde das Melon™ Gel IgG Spin Purification Kit (Pierce) entsprechend Herstellerprotokoll verwendet.

2.4.8 Immunhistochemische Färbung

Zur immunhistochemischen Färbung verschiedener Ovaralkarzinomgewebe wurden 2-2,5 µm dicke Schnitte der in Paraffin eingebetteten Tumorproben mit einem Rotationsmikrotom (Leica, Wetzlar) angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden durch 5 min Waschen in Xylol (3x), Ethanol (2x) und 90% (v/v) Ethanol (1x) entparaffiniert. Nachfolgend wurden die Schnitte 10 min in 3% (v/v) H_2O_2 in 70% (v/v) Ethanol inkubiert, kurz mit destilliertem Wasser gespült und 2 x 5 min in TBS-Tween (DAKO) gewaschen. Die durch die Paraformaldehydfixierung querveretzten Proteine wurden durch 20 min Inkubation der Schnitte bei 96°C in „Target Retrieval Solution, pH 6" (DAKO) demaskiert. Nach Abkühlen in 30 min wurden die Proben 2x 5 min in TBS-Tween gewaschen.

Anschließend wurde zunächst die endogene alkalische Phosphatase durch 10 min Inkubation mit „Dual Endogenous Enzyme Block" (DAKO) blockiert, danach endogenes Biotin mit dem „Biotin/Avidin Blocking Kit" (Vector, Burlingame, USA) und abschließend die unspezifische Proteinbindung durch 30 min Inkubation

mit „Protein-Block“ (BioGenex, La Hague, Niederlande). Nach Zugabe einer experimentell ermittelten Menge Primärantikörper wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C in einem geschlossenen Gefäß mit hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen (je 5 min in TBS-Tween) entfernt und die Detektion der auf den Schnitten gebundenen Antikörper nach Herstellerangaben mit dem „Super Sensitive Link-Label ICH Detection System“ und dem „Fast-Red Substrate Pack“ (beides BioGenex) durchgeführt. Abschließend wurde mit Hämatoxlin gegengefärbt und die Schnitte mit Aquatex (Merck) eingedeckt.

Die Präparate wurden lichtmikroskopisch (BX 51 Mikroskop, Olympus) betrachtet und ausgewertet.

2.5 Auswahl der Patientenproben und statistische Auswertung

Die Expression von Tspan-1 in menschlischen Ovarialkarzinomen wurde immunhistochemisch an Gewebeproben untersucht, die zwischen 1996 und 2004 in der Universitätsfrauenklinik operiert wurden. Nach histopathologischer Bewertung (Dr. K. Koretz, Institut für Pathologie der Universität Ulm) waren die untersuchten Ovarialkarzionome vom serös-papillären (44/72), mucinösen (15/72) und endometrioiden (11/72) Typ. Zwei der 72 Tumoren enthielten gemischt serös-papilläre und endometrioide Anteile. Hinsichtlich histopathologischem Grading verteilten sich die Ovarialkarzinome auf die Klassen 1 (25/72), 2 (17/72), 3 (26/72) und 4 (4/72).

Zur statischen Prüfung, ob die erhaltenen Färbeintensitäten mit Tumortyp, Grading oder klinischen Parametern korreliert werden können, wurden unter Einsatz der „Statistica“-Software (Version 7.1, StatSoft, Tulsa, USA) Vierfeldertafeln mit dem Fisher-Exakt-Test berechnet oder Rangsummentests wie beispielsweise der nach Mann-Whitney durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Tspan-1-Expression von Ovarialkarzinomzelllinien

Als Ausgangspunkt für die biochemische Charakterisierung des Tetraspanins Tspan-1 wurden die Ovarialkarzinomzelllinien MDAH-2774, OVCAR-3, OVMZ-1a, OVMZ-1c, OVMZ-4, OVMZ-6, OVMZ-7a, OVMZ-8, OVMZ-9, OVMZ-14, OVMZ-16, OVMZ-19, OVMZ-20, OVMZ-26, OVMZ-30 und SKOV-3 durch quantitative RT-PCR mit spezifischen „TaqMan-Assays“ hinsichtlich ihrer Expression von Tspan-1 und β2-Mikroglobulin (B2M; Kontrolle) untersucht. Die Zelllinien wurden in Bezug auf die Expression des Referenzgens in die Kategorien schwach (< 1% der B2M-Expression), mittel und stark (> 50% der B2M-Expression) Tspan-1 exprimierend eingeordnet. Nach dieser Einteilung exprimieren die Linien MDAH-2774, OVMZ-7a, OVMZ-14 und OVMZ-16 die Tspan-1-mRNA stark, die Linien OVMZ-1a, OVMZ-4, OVMZ-6, OVMZ-9, OVMZ-20 und SKOV-3 zeigten eine mittlere Tspan-1-Expression, während die Linien OVCAR-3, OVMZ-1c, OVMZ-8, OVMZ-19, OVMZ-26 und OVMZ-30 Tspan-1 nur schwach exprimieren. Von allen untersuchten Ovarialkarzinom-zelllinien zeigten MDAH-2774 die stärkste (7-fache B2M-Expression) und OVCAR-3 die schwächste Tspan-1-Expression nahe der Nachweisgrenze des Verfahrens.

3.2 Herstellung und Charakterisierung von Tspan-1-spezifischen anti-Peptidantikörpern

3.2.1 Auswahl der Tspan-1-Peptide zur Immunisierung von Kaninchen

Um immunhistochemische und biochemische Untersuchungen zu ermöglichen, wurden polyklonale Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen mit synthetischen Peptiden aus den extrazellulären Schleifen des Tspan-1 hergestellt. Eine starke Immunantwort der Kaninchen und eine starke Antikörper-Antigen-Wechselwirkung wurde ausgehend von Peptiden aus hydrophilen Domänen erwartet, die im homologen Zielprotein des Wirtsorganismus nicht vorkommen und daher als fremd einstuft werden.

Um die zwischen humanem und Nager-Tspan-1 weniger konservierteren Sequenzbereiche zu finden, wurde mit mit dem Programm ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw) ein Vergleich der Sequenzen der Tspan-1-Proteine aus Mensch (hTspan-1, NCBI-„accession number“ AAC17119), Maus (mTspan-1, NP_598442) und Ratte (rTspan-1, NP_001004236) durchgeführt. Eine entsprechende Sequenz des Kaninchenproteins war nicht verfügbar; wegen des hohen Verwandtschaftsgrades der Nager untereinander wurde jedoch angenommen, dass die in Maus- und Rattensequenzen identifizierten Unterschiede zur hTspan-1-Sequenz wahrscheinlich auch beim Kaninchenprotein abweichen. Um die Konserviertheit der unterschiedlichen Bereiche von Tspan-1 grafisch zu veranschaulichen, wurde jeder Aminosäure je nach Übereinstimmung ein ganzzahliger Wert zwischen 0 (alle Aminosäuren verschieden) und 3 (alle identisch) zugewiesen und in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 3).

Die Hydrophobizität über die Sequenz des humanen Tspan-1 wurde mit dem Algorithmus von Kyte und Doolitte [45] mit einem neun Aminosäuren großen Fenster berechnet (http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl) und die numerische Ausgabe des Programms mit der Darstellung der zwischen den betrachteten Spezies konservierten Bereiche überlagert (Abbildung 3), um beide Kriterien zur Auswahl der Peptide berücksichtigen zu können.

Die 12-15 Aminosäuren langen Sequenzbereiche, in denen sowohl Konserviertheit als auch Hydrophobizität minimal waren, wurden durch Homologiesuche in Sequenzdatenbanken (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST, [2]) auf zufällige Übereinstimmungen mit anderen Proteinen untersucht. Die Aminosäuresequenzen FEDSPYFKENSAFP (Aminosäurepositionen 158-171 in hTspan-1, nachfolgend auch „SPY“ genannt), CNDNVTNTANET (Positionen 175-186, „NET“) und CFNQLLYDIRTNAVT (Positionen 200-214, „DIRT“) hatten keine signifikante Ähnlichkeit zu anderen Proteinen und wurden daher als Grundlage zur Herstellung synthetischer Peptide verwendet. An den N-Terminus des FEDSPYFKENSAFP-Peptids wurde ein Cystein angehängt, um über die reaktive Thiolgruppe die N-terminale Kopplung an das Schlüssellochschnecken-Hämocyanin („keyhole limpet hemocyanin“, KLH) zu ermöglichen. Die Immunisierungen von je zwei Kaninchen mit diesen drei verschiedenen, an KLH-gekoppelten Peptiden wurde von der Firma Charles River (Kissleg) durchgeführt. Durch ELISAs auf den jeweiligen zur Immunisierung eingesetzten immobilisierten

Peptiden wurden Serumproben, die an den Tagen 38 und 52 nach der ersten Injektion genommen wurden, im Vergleich zum Präimmunserum getestet, um die peptidspezifische Immunantwort der Tiere zu bestätigen. In allen Fällen konnte schließlich durch Entblutung des Kaninchens eine ausreichende Menge eines peptidspezifisches Antiserums gewonnen werden.

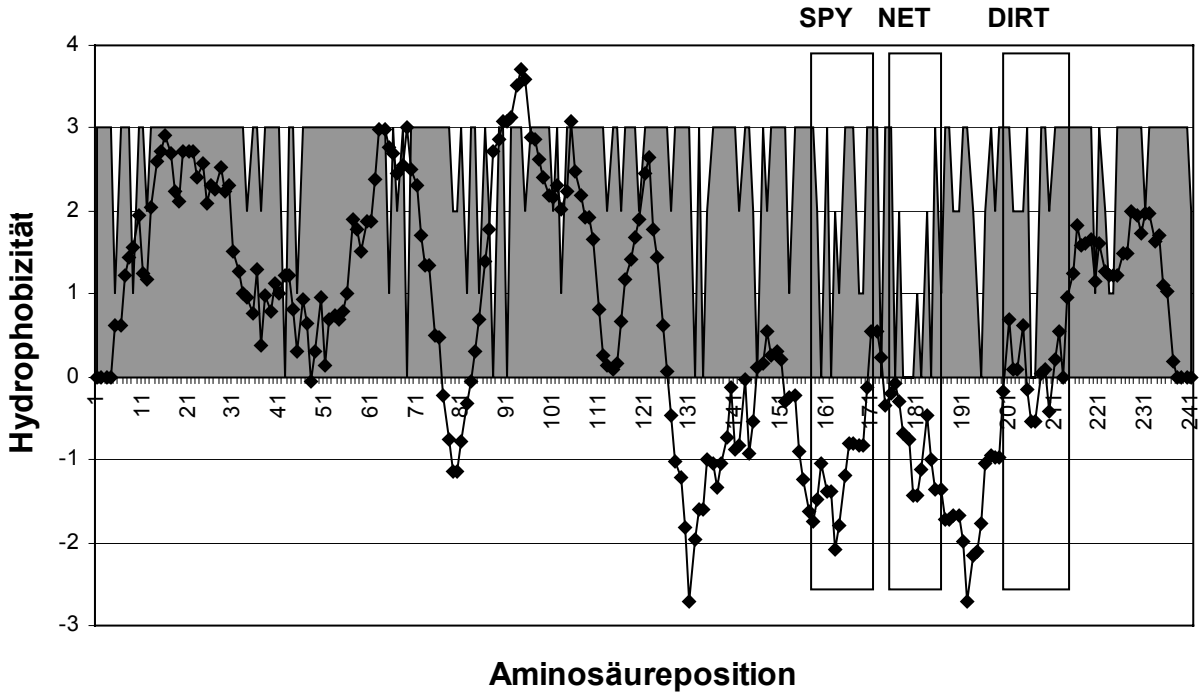


Abbildung 3: Diagramm zur Auswahl der Peptide zur Immunisierung von Kaninchen. Grau unterlegt gezeichnet ist der Graph, der anzeigt, wie hoch die Aminosäuren in den Sequenzen von Tspan-1 aus Mensch, Maus und Ratte konserviert sind. Darüber gelegt ist die Hydrophobizitätskurve (schwarze Quadrate) über die Länge der humanen Tspan-1-Sequenz. Die zur Immunisierung verwendeten Sequenzbereiche sind durch transparente Rechtecke gekennzeichnet.

3.2.2 Spezifität der Signale im Western Blot

Zur Charakterisierung der erhaltenen Antiseren wurden im Western Blot je 30 µg Gesamtprotein enthaltende Octylglucosid-Solubilisate der Ovarialkarzinomlinien MDAH-2774 (starke Tspan-1-Expression) und OVCAR-3 (schwache Tspan-1-Expression) mit reduzierten als auch nicht reduzierten Proben analysiert und die von allen Anti- und zugehörigen Präimmunseren (alle zunächst 1:1000 verdünnt eingesetzt) hervorgerufenen Signale detektiert.

Das Serum des zweiten mit dem „NET“-Peptid immunisierten Kaninchens (NET#2) erzeugte unter reduzierenden Bedingungen eine spezifische, bei MDAH-2774 starke und bei OVCAR-3 schwache, Bande bei ca. 26 kDa in Relation zu den verwendeten Markerproteinen. Darüber hinaus trat bei etwa 60 kDa bei Solubilisaten beider Linien unter reduzierenden wie auch nicht-reduzierenden Bedingungen eine spezifische schwache Bande auf. Unspezifische Hintergrundsignale waren vernachlässigbar schwach (Abbildung 4).

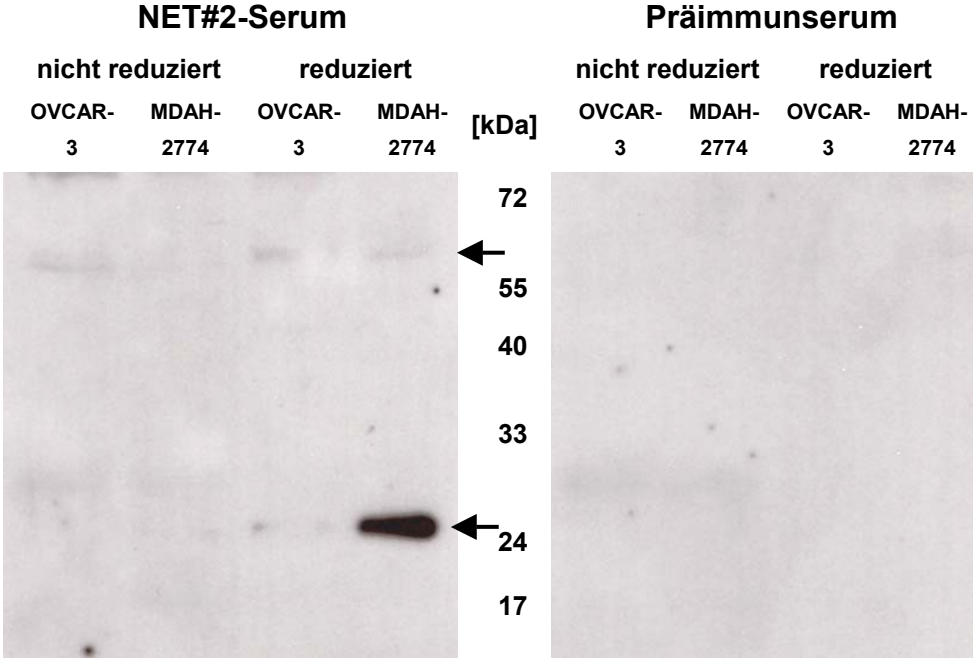


Abbildung 4: Spezifische Signale beim Western Blot mit NET#2-Serum. In jeder Spur wurden 30 µg Gesamtprotein in Octylglucosid-Solubilisaten von OVCAR-3-Zellen und MDAH-2774-Zellen nicht reduziert und reduziert in einem 8-16%-SDS-PAGradientengel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit NET#2-Serum und mit NET#2-Präimmunserum. Die Pfeile zeigen auf die spezifischen Banden bei ca. 26 und 60 kDa.

Das Serum DIRT#2 erzeugte eine spezifische Bande von ca. 60 kDa, die sowohl unter reduzierenden wie auch unter nicht reduzierenden Bedingungen bei OVCAR-3-Solubilisaten stark und solchen aus MDAH-2774-Zellen nur wenig stärker auftrat. Daneben wurden durch dieses Serum auch unspezifische Banden mit der Intensität der spezifischen Signale detektiert, die auch mit dem zugehörigen Präimmunserum auftraten und daher auf eine unspezifische Immunreaktion des Tieres zurückgeführt werden können (nicht gezeigt).

Mit den Antiseren SPY#1, SPY#2, NET#1 und DIRT#1 wurden keine spezifischen Signale erhalten (nicht gezeigt), weswegen sie für Western Blot-Analysen nicht zum Einsatz kamen.

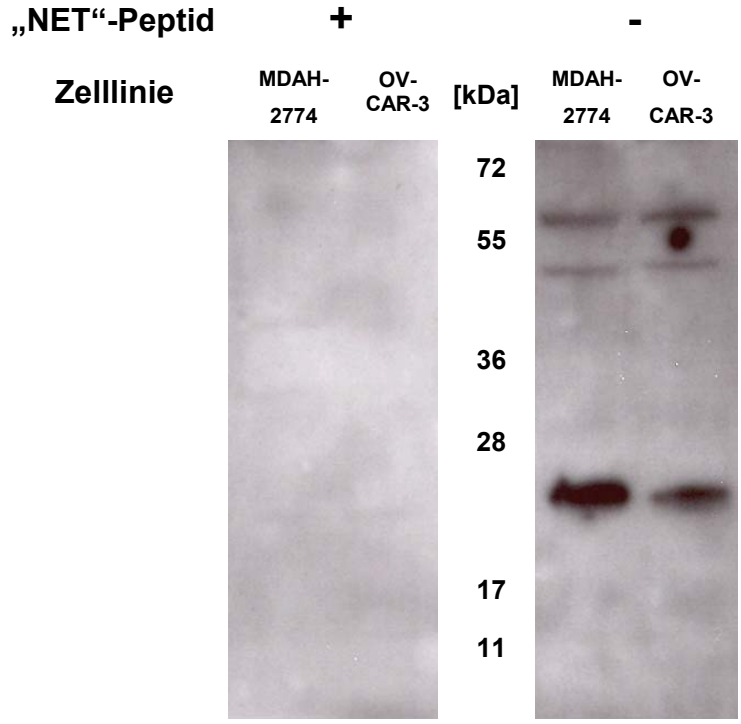


Abbildung 5: Unterdrückung der NET#2-spezifischen Signale im Western Blot durch Kompetition der Antikörperbindung mit Peptiden. Je 40 µg Gesamtprotein aus Triton X-100-Solubilisaten von MDAH-2774- und OVCAR-3-Zellen wurden unter reduzierenden Bedingungen in einem 12%-SDS-PAGel aufgetrennt. Detektiert wurde mit 1:1000 verdünntem Antiserum NET#2 mit oder ohne 1 µg/ml „NET“-Peptid.

Um die Spezifität der von NET#2 hervorgerufenen Signale weiter zu bestätigen, wurden geprüft, ob sich diese mit dem zur Immunisierung eingesetzten Peptid kompetitiv hemmen lassen. Dazu wurden je 40 µg Gesamtprotein enthaltende Triton X-100-Solubilisate der Zelllinien MDAH-2774 und OVCAR-3 unter reduzierenden Bedingungen getrennt und das Bandenmuster auf zwei PVDF-Membranen übertragen. Diese Membranen wurden mit verdünntem NET#2-Serum, das eine Stunde mit 1 µg/ml „NET“-Peptid vorinkubiert worden war, bzw. mit diesem Serum ohne Peptidzusatz als Kontrolle unter Western Blot-Standardbedingungen inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper führte bei der mit NET#2 inkubierten Membran zum beschriebenen Bandenmuster, bei

der mit NET#2 und „NET“-Peptid inkubierten Membran fehlten jedoch die 26 kDa- und 60 kDa- Banden (Abbildung 5). Die beobachtete Unterdrückung der spezifischen Signale durch Zugabe des Immunisierungspeptids bestätigte die Spezifität der im NET#2-Serum enthaltenen Antikörper.

3.2.3 Immunpräzipitation mit den NET#2- und DIRT#2-Seren

Ausgehend von je 400 µl Solubilisaten aus MDAH-2774-Zellen, die mit Brij97, Octylglucosid oder Triton X-100 als Detergenzien enthaltenden Puffern hergestellt worden waren, wurden mit je 5 µl der Antiseren NET#2 und DIRT#2, sowie den zugehörigen Präimmunseren Immunpräzipitationen durchgeführt. Der nachfolgende Western-Blot zum Nachweis der präzipitierten Proteine mit Detektion durch die jeweiligen zur Immunpräzipitation verwendeten Antiseren ergab keine Hinweise auf die spezifische Anreicherung des nativen Tspan-1 unter den gewählten Bedingungen.

3.2.4 Nachweis von rekombinant exprimiertem Tspan-1 mit den Antiseren NET#2 und DIRT#2

3.2.4.1 Nachweis nach Expression in Säugerzellen

Zur Herstellung von Plasmidkonstrukten, die eine Expression von Tspan-1 in Säugerzellen ermöglichen, wurde zunächst die für dieses Protein kodierende Sequenz (CDS) aus dem IMAGE-Klon 2959379 sowohl mit als auch ohne terminales Stoppcodon mit dem In-Fusion™-Kloniersystem in pDNR-Dual kloniert. Ausgehend von den so entstandenen Donorvektoren (pDNR-Dual-Tspan-1 und pDNR-Dual-Tspan-1-delStop) wurde die Tspan-1-CDS mit Stoppcodon durch die Cre-Rekombinase-vermittelte Reaktion in die Akzeptorvektoren pLP-CMVneo (ergab pLP-CMVneo-Tspan-1) und pLP-EGFP-C1 (resultierte in pLP-EGFP-C1-Tspan-1) umkloniert und das Insert ohne Stoppcodon in pLPS-3’-EGFP (führte zu pLPS-3’-EGFP-Tspan-1) übertragen.

Um einen eindeutigen Beweis für die Spezifität der Antikörpersignale von NET#2 und DIRT#2 zu erbringen, wurden OVCAR-3-Zellen mit den Plasmiden pLP-CMVneo-Tspan-1, pLP-EGFP-C1-Tspan-1 und pLP-EGFP-C1 (als Negativ- und Transfektionskontrolle) transfiziert und 48 Stunden weiter kultiviert. Mit

Triton X-100 enthaltendem Puffer hergestellte Extrakte der transfizierten Zellen wurden unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE analysiert und im sich anschließenden Western Blot auf Immunreaktivität mit einem anti-GFP-Antikörper und den Antiseren NET#2 und DIRT#2 geprüft. Nur mit dem anti-GFP-Antikörper konnte das EGFP-Tspan-1-Fusionsprotein nachgewiesen werden (Abbildung 6), nicht aber mit NET#2 und DIRT#2.

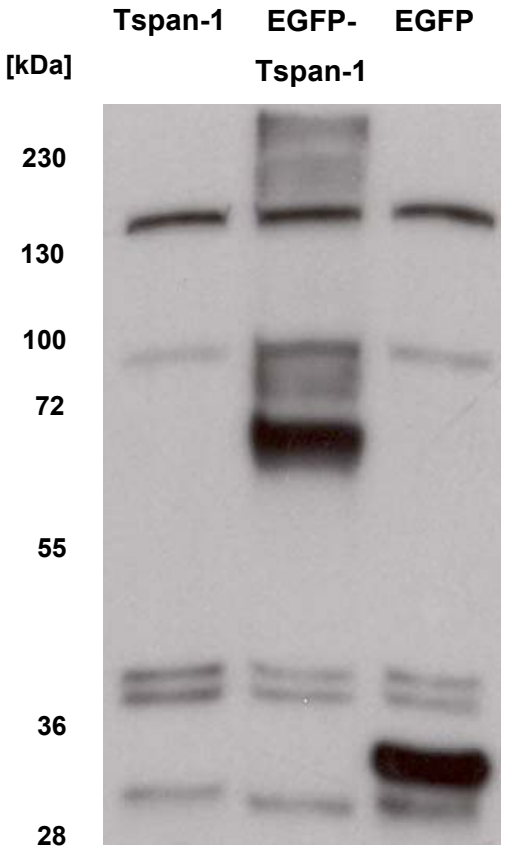


Abbildung 6: Nachweis von rekombinant exprimierten Fusionsproteinen mit dem anti-GFP-Antikörper ab290. Reduzierte Triton X-100-Solubilisate von OVCAR-3-Zellen, transfiziert mit pLP-CMVneo-Tspan-1, pLP-EGFP-C1-Tspan-1 und pLP-EGFP-C1 wurden mit einem 12%-SDS-PAGel analysiert die Proteine im Western Blot auf Immunreaktivität mit dem anti-GFP-Antikörper geprüft. Die Signale zeigen den unspezifischen Hintergrund, eine dominante ~64 kDa-Bande, sowie diffusere, höhermolekulare Banden des EGFP-Tspan-1-Fusionsproteins und das EGFProtein bei ca. 31 kDa.

3.2.4.2 Nachweis nach Expression in Insektenzellen

Die Tspan-1-CDS wurde (aus dem IMAGE-Klon 2959379) ohne Stoppcodon mit Gateway®-kompatiblen Sequenzüberhängen amplifiziert. Durch eine darauf folgende BP-Reaktion wurde das PCR-Produkt in pDONR221 kloniert und dann das Insert aus dem entstandenen pDONR221-Tspan-1 mittels LR-Reaktion in lineare BaculoDirect™-DNA übertragen. Rekombinante Baculoviren zur Expression von Tspan-1 mit C-terminalem „His-Tag“ wurden in Sf9-Zellen vermehrt und hochinfektiöse Viruslösungen hergestellt. 96 Stunden nach Infektion von Sf9-Zellen mit der hochinfektiösen Baculo-Tspan-1-Lösung konnte die maximale Proteinexpression mit dem anti-PentaHis-Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 7).

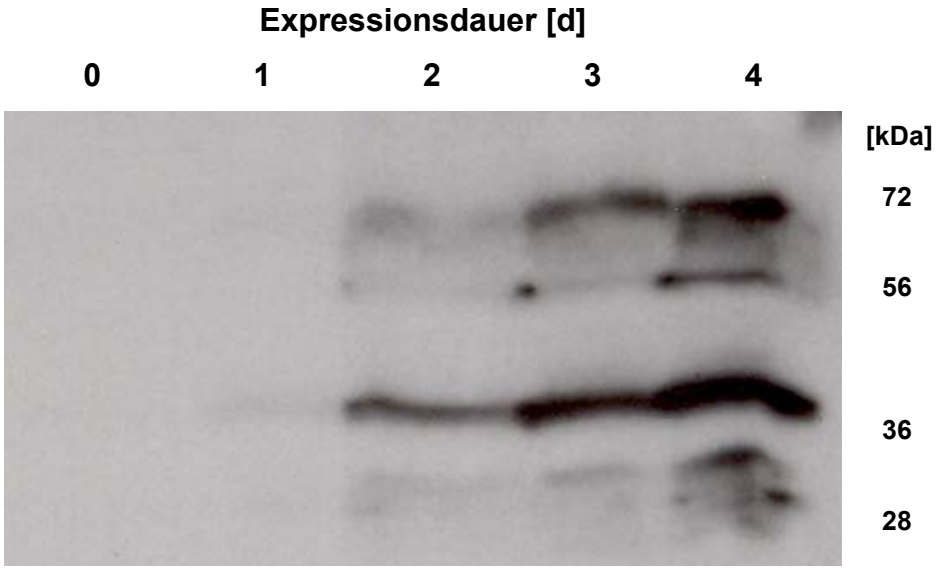


Abbildung 7: Baculovirus-vermittelte Expression von Tspan-1 in Sf9-Zellen. Sf9-Zellen wurden vor (0) und 1, 2, 3 und 4 Tage nach Infektion mit Baculo-Tspan-1 aufgearbeitet: Triton X-100-Solubilisate wurden unter reduzierenden Bedingungen in einem 12%-SDS-PAGel analysiert und im Western Blot die getrennten Proteine auf Bindung des PentaHis-Antikörpers hin untersucht. Spezifische Banden sind bei ~32, ~38, ~ 58 und ~70 kDa erkennbar. Ein C-terminal an Tspan-1 fusioniertes Peptid u.a. zur Bereitstellung eines „His-Tags“ erhöht das Molekulargewicht von Tspan-1 um ca. 4 kDa.

Parallel dazu wurden die Tspan-1-CDS und die EGFP-CDS (aus pLP-EGFP-C1) ohne Stoppcodons mit jeweils überhängenden BamHI- und NotI-Schnittstellen amplifiziert und in die MCS des Insektenexpressionsvektors pIEx-8 eingefügt. Die

mit den erhaltenen Plasmiden pIEx-8-Tspan-1 und pIEx-8-EGFP exprimierten Proteine hatten durch entsprechende Vektorsequenzen zusätzlich N-terminal einen „Strep-Tag“ und C-terminal einen „His-Tag“. 72 Stunden nach Transfektion von Sf9-Zellen mit pIEx-8-Tspan-1 konnten mit dem anti-PentaHis-Antikörper schwache Banden im Western-Blot nachgewiesen werden, die denen mit Baculoviren exprimiertem Tspan-1 ähnelten (nicht gezeigt), aber in ihrer Intensität nicht der des mit pIEx-8-EGFP erzeugte PentaHis-EGFP vergleichbar waren. Die durch Fluoreszenzmikroskopie abgeschätzte Transfektionseffizienz (mit Insect GeneJuice) lag bei diesem Experimenten bei 50-60%.

Mit den Seren NET#2 und DIRT#2 konnte auch in Sf9-Zellen mit Baculoviren oder Plasmidvektor exprimiertes Tspan-1 im Western Blot nicht nachgewiesen werden.

3.2.5 Nachweis von unglykosyliertem Tspan-1 mit NET#2

Da in der „NET“-Peptidsequenz zwei Konsensussequenzen für N-glykosylierbare Asparagine vorkommen, wurde als Möglichkeit in Betracht gezogen, dass modifiziertes Tspan-1 wegen einer Maskierung des Epitops durch Asparagin-verknüpfte Oligosaccharide nicht mit dem NET#2-Serum nachweisbar war. Um eine mögliche N-Glykosylierung zu unterdrücken, wurden MDAH-2774-Zellen mit Tunicamycin kultiviert und CHAPS-Solubilisate daraus (im Vergleich mit unbehandelten Zellen) unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE analysiert und die Proteine nach Blotten auf eine PVDF-Membran auf spezifische Immunreaktivität mit dem NET#2-Serum untersucht. Falls das in MDAH-2774 endogen exprimierte Tspan-1 überwiegend glykosyliert („unsichtbar“ mit NET#2), aber zu einem kleinen Teil auch unglykosyliert („sichtbar“ mit NET#2) vorgelegen hätte, hätte das Hemmen der N-Glykosylierung die 26 kDa-Bande im Vergleich zu dem Signal der unbehandelten Zellen verstärken müssen.

Dieser Vergleich zeigte jedoch keinen Intensitätsunterschied der 26 kDa-Banden und eine nur leichte Intensivierung der 60 kDa-Bande bei den mit Tunicamycin behandelten Zellen (Abbildung 8).

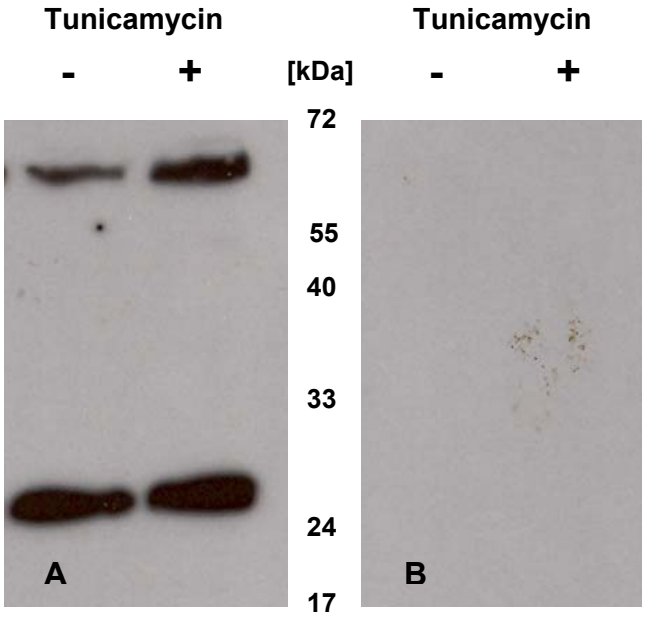


Abbildung 8: Einfluss von Tunicamycin auf NET#2-spezifische Western Blot-Signale. CHAPS-Solubilisate von unbehandelten und 24 Stunden mit 2,5 µg/ml Tunicamycin behandelten MDAH-2774-Zellen wurden unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-PAGE analysiert und im Western Blot mit A) NET#2-Serum und B) NET#2-Präimmunserum auf immunreaktive Proteine geprüft.

3.2.6 Tspan-1-spezifische immunhistochemische Färbung

Die erhaltenen Antiseren NET#2 und DIRT#2 waren sehr gut geeignet um Tspan-1 in Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten nach Entparaffinierung und Demaskierung vernetzter Proteine mit Standardverfahren nachzuweisen. Die deutlich angefärbten Strukturen waren nicht nach stets parallel durchgeführten Färbungen mit den zugehörigen Präimmunseren sichtbar und übereinstimmend für die beiden Antiseren, die gegen zwei verschiedene Peptide aus der großen extrazellulären Schleife des Tspan-1 gerichtet waren. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Immunreaktivität spezifisch für Tspan-1 ist. Die Qualität der immunhistochemischen Färbungen konnte durch Entfernen von Begleitproteinen aus den Seren (siehe 2.4.7.2) verbessert werden, so dass schließlich kontrastreiche und hintergrundfreie Tspan-1-Signale erhalten wurden. Dies erlaubte die immunhistochemische Reihenuntersuchung von Ovarialkarzinomschnitten und die Bewertung dieses Tetraspanins als möglichen Indikator klinisch relevanter Eigenschaften dieser Tumoren.

3.3 Molekulare Charakterisierung des Tspan-1-Proteins

3.3.1 Expression von Tspan-1 als N- und C-terminale EGFP-Fusionsproteine

Um bei der molekularen Charakterisierung von Tspan-1 und glykosylierungsdefizienter Mutanten auf einen robusten anti-GFP-Antikörper zurückgreifen zu können, wurden Tspan-1-Fusionsproteine mit N-terminalem und C-terminalem EGFP in OVCAR-3-Zellen durch Transfektion mit den Plasmiden pLP-EGFP-C1-Tspan-1 und pLPS-3'-EGFP-Tspan-1 exprimiert. Die beiden Fusionsproteintypen wurden 48 Stunden nach Transfektion in Triton X-100-Solubilisaten durch Western Blot-Analysen miteinander verglichen. Die mit dem anti-GFP-Antikörper erhaltenen spezifischen Signale von beiden Fusionsproteinen stimmten im Wesentlichen überein, lediglich bei den Intensitäten der Banden gab es deutliche Unterschiede: Bei den pLP-EGFP-C1-Tspan-1-Transfektanten wurden die stärksten Signale im hochmolekularen (größer als 230 kDa) Bereich nachgewiesen, wohingegen bei den pLPS-3'-EGFP-Tspan-1-Transfektanten die Banden bei ~62 und ~71 kDa besonders intensiv waren (Abbildung 9). Berücksichtigt man das in Relation zu den Markerproteine abgeschätzte Molekulargewicht des in den Kontrollansätzen exprimierten EGFP (~31 kDa), ergibt sich rechnerisch für den Tspan-1-Anteil der Fusionsproteine ~31 und 40 kDa als bei SDS-PAGE zu erwartende scheinbare Größen.

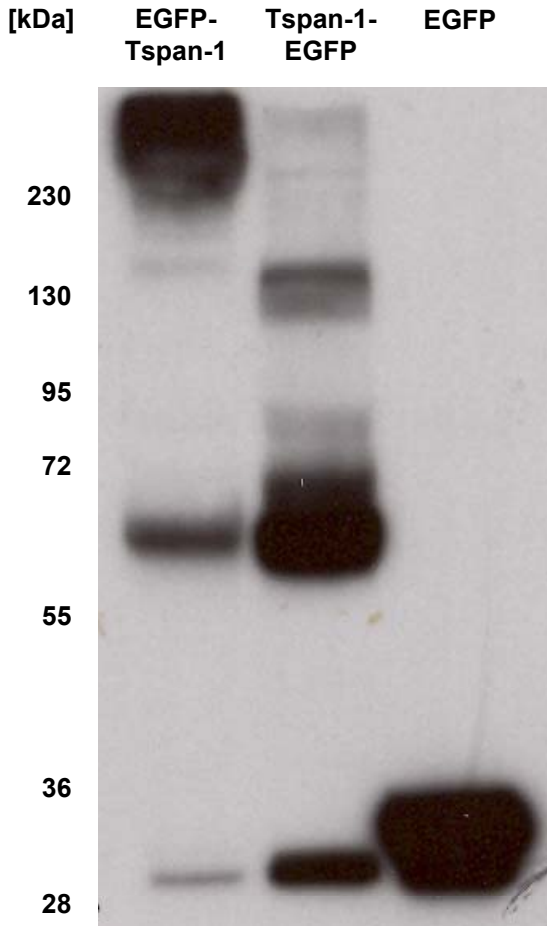


Abbildung 9: Vergleich von Tspan-1-Fusionsproteinen mit N- oder C-terminalen EGFP. Reduzierte Proteine in Triton X-100-Solubilisaten von OVCAR-3-Zellen, die mit pLP-EGFP-C1-Tspan-1 (ergibt N-terminales EGFP), pLPS-3'-EGFP-Tspan-1 (ergibt C-terminales EGFP) oder pLP-EGFP-C1 (Kontrolle, ergibt EGFP) transfiziert wurden, wurden nach Auftrennung in einem 12%-SDS-PAGel im Western Blot mit einem anti-GFP-Antikörper (ab290) detektiert.

3.3.2 Unterdrückung der N-Glykosylierung von Tspan-1 durch Tunicamycin

Zur Beantwortung der Frage, ob die durch das Bandenmuster bei Detektion von Tspan-1-EGFP-Fusionsproteinen mit dem anti-GFP-Antikörper offenkundige Heterogenität durch die variable Modifikation des Proteins an N-Glykosylierungsstellen im Tspan-1-Teil hervorgerufen wird, wurde die N-Glykosylierung mit pLP-EGFP-C1-Tspan-1 und pLPS-3'-EGFP-Tspan-1 transfizierter OVCAR-3-Zellen mit Tunicamycin gehemmt. Die Tunicamycin-Behandlung reduzierte das bei Solubilisaten aus unbehandelten Zelllen reproduzierte Bandenmuster auf eine einzige, weniger intensive ~53 kDa-Bande (Abbildung 10). Daraus ergibt sich für

unglykosyliertes Tspan-1 (ohne EGFP-Anteil) eine Größe von ca. 22 kDa. Die den unglykosylierten EGFP-Fusionsproteinen zugeordneten schwachen Banden ließen sich jedoch mit NET#2 im Western Blot unter Standardbedingungen nicht detektieren (nicht gezeigt).

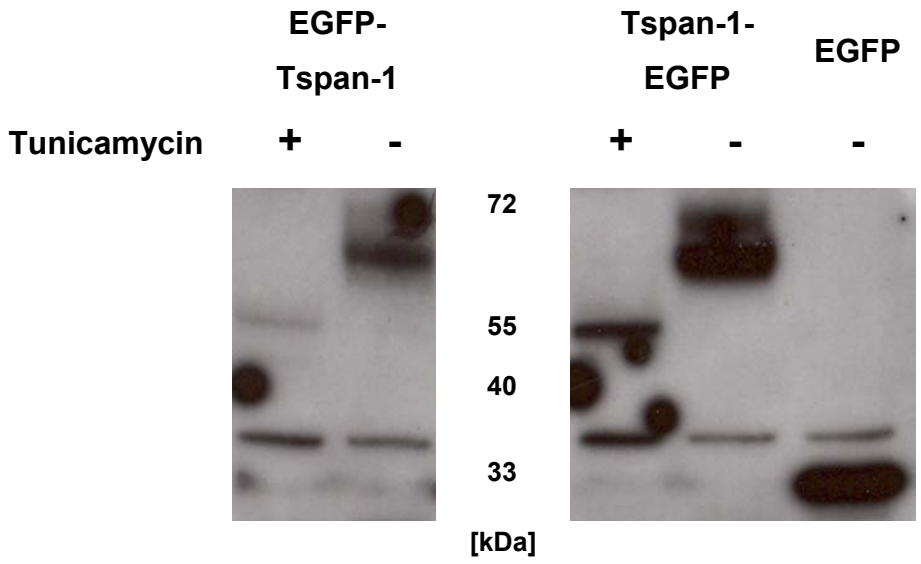


Abbildung 10: Tspan-1 ist ein Glykoprotein. In OVCAR-3-Zellen wurden das EGFP-Tspan-1-Fusionsprotein, das Tspan-1-EGFP-Fusionsprotein und EGFP durch Transfektion mit den entsprechenden Plasmiden exprimiert. Die Inkubation der Zellen nach Transfektion erfolgte in Abwesenheit bzw. in Anwesenheit von Tunicamycin. Der mit dem anti-GFP-Antikörper ab290 entwickelte Western Blot zeigt aufgetrennte Proteine in Triton X-100-Solubilisaten. Die Inhibierung der N-Glykosylierung durch Tunicamycin in diesem Experiment verringerte das Molekulargewicht der Tspan-1-EGFP-Fusionsproteine.

3.3.3 Mutation der potentiellen N-Glykosylierungsstellen in Tspan-1

Die Inhibition der N-Glykosylierung von Tspan-1 durch Tunicamycin erlaubte keine Aussagen über die Anzahl der modifizierten Asparagine im Protein. In der Tspan-1-Aminosäuresequenz wurden vier Asparagine im Kontext potentieller Glykosylierungsstellen in den Positionen 141, 154, 178 und 184 identifiziert. Um den Beitrag jeder dieser Stellen zur Gesamtglykosylierung des Tspan-1 zu untersuchen, wurden durch gerichtete Mutagenese Expressionsvektoren hergestellt, in denen durch Aminosäureaustausche in der Tspan-1-Sequenz eines oder mehrere der vier möglicherweise modifizierten Asparagine durch Alanine ersetzt waren.

An den Mutationsstellen überlappende DNA-Fragmente der Tspan-1-CDS, die durch Verwendung sequenzveränderter PCR-Primer die einzuführende Mutation trugen (Abbildung 11 A), wurden durch Hybridisieren der überlappenden Bereiche und Kettenverlängerung am freien 3'-Ende zu einem mutierten DNA-Stück vereinigt, welches durch spezifische, In-Fusion™-kompatible Primer amplifiziert wurde (Abbildung 11 B). Durch die Anwendung des In-Fusion™- und Creator™-Systems entstanden daraus die von pLP-EGFP-C1 und pLPS-3'-EGFP abgeleiteten Expressionskonstrukte, die die Tspan-1-CDS mit den Mutationen N141A, N154A, N178A oder N184A enthielten.

An mehreren der potentiellen Glykosylierungsstellen Mutationen in der Tspan-1-Sequenz enthaltende Expressionsplasmide wurden durch schrittweises Hinzufügen weiterer Mutationen zu bereits veränderter Tspan-1-CDS in gleicher Weise erzeugt. So entstanden entsprechende Konstrukte zur Expression der Tspan-1-Fusionsproteinen, die alle Asparagine der vier mutmaßlichen N-Glykosylierungsstellen (4xNA-Tspan-1) bzw. die beiden Asparagine 178 und 184 zu Alaninen mutiert (2xNA-Tspan-1) enthielten.

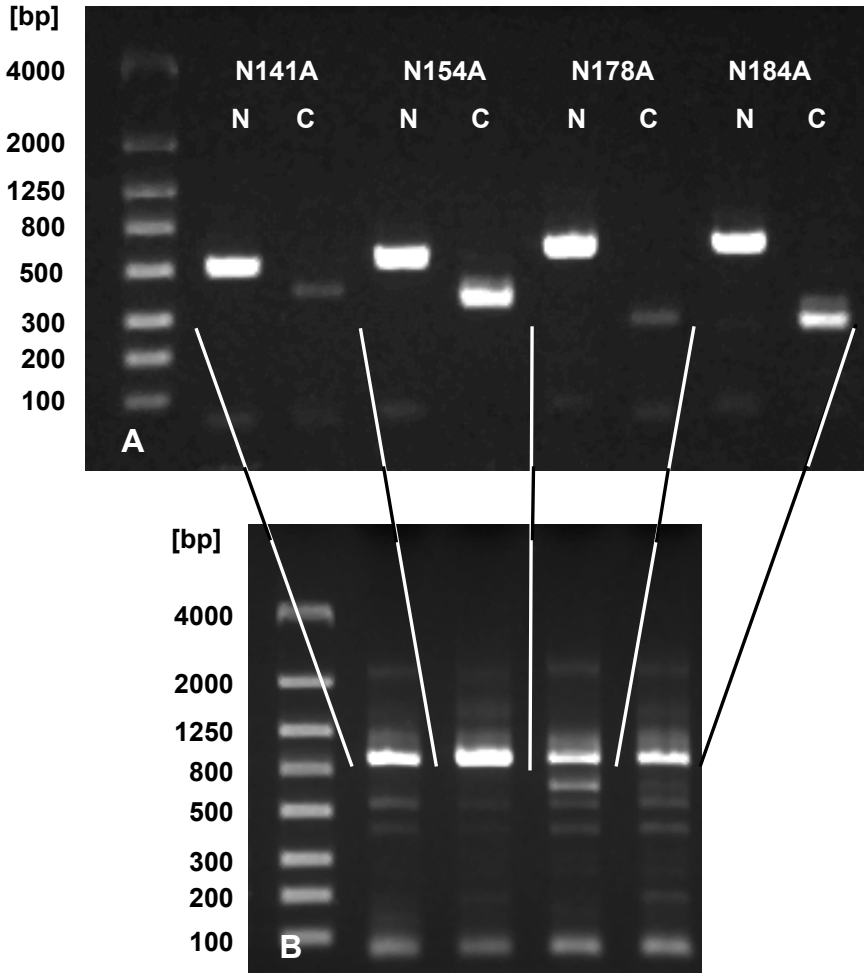


Abbildung 11: Mutation einzelner Asparagine in der für Tspan-1 kodierenden Sequenz zu Alaninen.

A) Den N- und C-terminalen Enden des Proteins entsprechende DNA-Stücke, die an der Mutationsstelle überlappen. Die die Mutation enthaltenden Amplikons sind für jeden Fall gezeigt.

B) Die durch PCR zusammengefügte, die Mutationen in der kompletten Tspan-1-CDS enthaltenden DNA-Stücke sind im Agarose-Gel bei ~800 bp der erwarteten Größe entsprechend sichtbar.

3.3.4 Das N-Glykosylierungsmuster von Tspan-1

Um den Beitrag jeder der vier N-Glykosylierungsstellen zur Gesamtglykosylierung des Tspan-1-Proteins zu untersuchen, wurden die Ovarialkarzinomzelllinien MDAH-2774, OVCAR-3 und SKOV-3 mit den Plasmiden pLPS-3'-EGFP-Tspan-1 (Wildtyp) und den mutationstragenden Versionen N141A, N154A, N178A, N184A, 2xNA und 4xNA transfiziert. Die mit dem anti-GFP-Antikörper in Western Blots detektierten Proteine in Triton X-100-Solubilisaten der transfizierten Zellen bildeten ein bei allen untersuchten Zelllinien übereinstimmendes Bandenmuster; bei den (außer bei 2xNA und 4xNA) nachgewiesenen Doppelbanden variierten lediglich die relativen Intensitäten. Die erhaltenen spezifischen Signale sind in Tabelle 5 zusammengefasst (siehe auch Abbildung 12).

Tabelle 5: Rekombinant exprimiertes Tspan-1-3'-EGFP-Fusionsprotein mit verschiedenen Mutationen der potentiellen Glykosylierungsstellen wurde mit einem anti-GFP-Antikörper nach Western Blotting spezifisch nachgewiesen. Aufgeführt sind Lage und relative Intensitäten (schwach (+), stark (++), sehr stark (+++)) spezifischer Banden für drei Ovarialkarzinomzelllinien.

Zelllinie	Tspan-1-Sequenz in den 3'-EGFP-Fusionsproteinen						
	Wildtyp	N141A	N154A	N178A	N184A	2xNA	4xNA
MDAH-2774	~62 (++) und ~71 kDa (++)	~60 (++) und ~69 kDa (++)	~60 (++) und ~69 kDa (++)	~60 (++) und ~66 kDa (++)	~60 (++) und ~67 kDa (++)	~56 kDa (++)	~52 kDa (++)
OVCAR-3	~62 (+++) und ~71 kDa (+)	~60 (+++) und ~69 kDa (+)	~60 (+++) und ~69 kDa (+)	~60 (+++) und ~66 kDa (+)	~60 (+++) und ~67 kDa (+)	~56 kDa (++)	~52 kDa (++)
SKOV-3	~62 (+) und ~71 kDa (+)	~60 (+) und ~69 kDa (+)	~60 (+) und ~69 kDa (+)	~60 (+) und ~66 kDa (+)	~60 (+) und ~67 kDa (+)	-	~52 kDa (+)

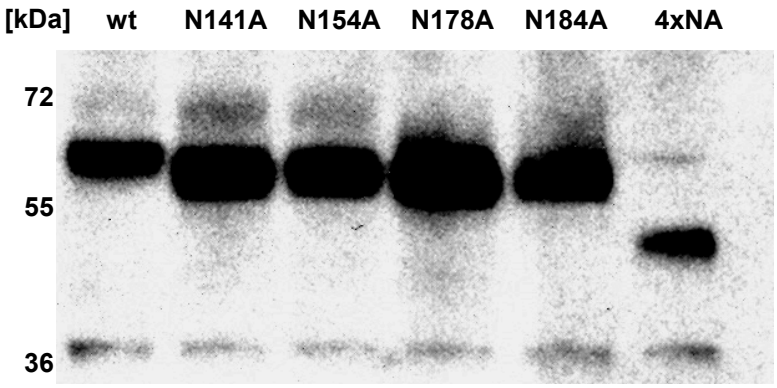


Abbildung 12: Beitrag jeder N-Glykosylierungsstelle zur Glykosylierung von Tspan-1. Gezeigt sind die Banden der den anti-GFP-Antikörper ab290 bindenden Proteine aus OVCAR-3-Zellen, die mit Expressionskonstrukten transfiziert worden waren, die folgende Tspan-1-kodierende Sequenzen enthielten: Wildtyp (wt), Mutante N141A, Mutante N154A, Mutante N178A, Mutante N184A und Mutante 4xNA. Es zeigte sich, dass alle vier N-Glykosylierungsstellen in Tspan-1 durch Oligosaccharide modifiziert werden.

Die durch Mutationen hervorgerufenen Unterschiede in den ermittelten Molekulargewichten der Fusionsproteine im Vergleich zur Wildtypsequenz belegen, dass alle vier N-Glykosylierungsstellen in Tspan-1 mit Oligosacchariden modifiziert sind. Darüber hinaus ist ersichtlich, dass Tspan-1 in zwei verschieden glykosylierten Formen vorkommt. Die Mutationen N141A und N154A reduzierten das Molekulargewicht der langsam migrierenden Bande im Vergleich zum Wildtyp weniger stark als die Aminosäurenaustausche N178A und N184A. Nach Expression der Doppelmutante Tspan-1-2xNA (N178A+N184A) in OVCAR-3- und MDAH-2774-Zellen lässt sich im Western-Blot nur noch eine diskrete ~56 kDa-Bande nachweisen (nicht gezeigt), die heterogene Glykosylierung von Tspan-1 betrifft also nur die Asparagine an den Positionen 178 und 184.

Um die Art der Kohlehydratmodifikation von Tspan-1 näher bestimmen zu können, wurde durch Transfektion von MDAH-2774 mit pLPS-3'-EGFP-Tspan-1 (Wildtyp) rekombinantes Tspan-1-EGPF-Fusionsprotein exprimiert und durch eine Immunpräzipitation aus Triton X-100-Solubilisaten mit dem anti-GFP-Antikörper selektiv angereichert. Diese Präparationen wurden enzymatischen Deglykosylierungen mit Endo H_f unterzogen, worauf eine Western Blot-Analyse im Vergleich der (reduzierten) Proben im Vergleich zu einem Kontrollansatz erfolgte.

Varianten des Tspan-1-Fusionsprotein im unbehandelten Immunpräzipitat führten zu der typischen Doppelbande (~62 und ~71 kDa), während durch Deglykosylierung mit Endo H_f sich die scheinbaren Molekulargewichte auf ~58 und ~67 kDa verringerten. Dass nach Endo H_f-Spaltung weiterhin eine Doppelbande auftrat, weist auf komplexe oder hybride Kohlehydratstrukturen als Bestandteil der Tspan-1-Glykosylierung hin. Die deutliche Reduzierung der Proteingrößen macht zudem das Abspalten von mannosereichen Oligosaccharid-Strukturen vom Tspan-1-Molekül deutlich (Abbildung 13).

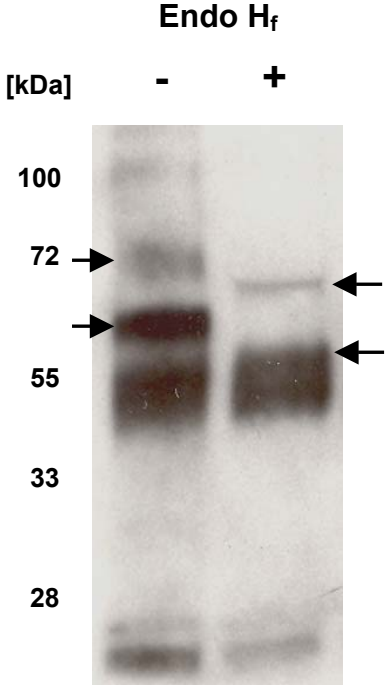


Abbildung 13: Bestimmung der Kohlehydratmodifikationsform von Tspan-1. Durch Immunpräzipitation mit dem anti-GFP-Antikörper ab290 gereinigtes Tspan-1-EGFP wurde unbehandelt und nach Deglykosylierung mit Endo H_f nachgewiesen. Tspan-1-EGFP-spezifische Signale sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Endo H_f reduziert die Molekulargewichte von ~62 und ~71 kDa auf ~58 und ~67 kDa.

3.4 Subzelluläre Lokalisation des Tspan-1-Proteins

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Tspan-1 wurde das mit EGFP fusionierte Protein in Zellen exprimiert und fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Dabei ergaben Transfektionen von MDAH-2774 und OVCAR-3 mit pLP-EGFP-C1-Tspan-1 und pLPS-3'-EGFP-Tspan-1 grundsätzlich übereinstimmende, von der des in Kontrollansätzen exprimierten EGFP verschiedene subzelluläre Lokalisationen der N- und C-terminalen EGFP-Fusionsproteine. Auffällig war allerdings, dass das Fusionsprotein mit N-terminalem EGFP stärker in intrazellulären Vesikeln lokalisiert war, das mit C-terminalem EGFP hingegen deutlicher in der Plasmamembran und etwas weniger stark in intrazellulären Vesikeln sichtbar war. Da es Hinweise auf eine „natürlichere" Proteinkonformation beim C-terminalen EGFP-Tspan-1 (siehe auch 3.3.1) gab, wurden alle weiteren Experimente zur subzellulären Lokalisation mit pLPS-3'-EGFP-basierten Plasmiden durchgeführt.

Nach der Transfektion von MDAH-2774- und OVCAR-3-Zellen war kein deutlicher Unterschied hinsichtlich der subzellulären Lokalisationen zwischen Wildtyp-Tspan-1 und Varianten mit einzelnen mutierten Glykosylierungsstellen ersichtlich. Alle Proteine waren in MDAH-2774 stets in der Plasmamembran und intrazellulären Vesikeln nachweisbar. Bei der Zelllinie OVCAR-3 traf dies nur auf etwa 75% der transfizierten Zellen zu, bei den restlichen 25% war das Wildtyp-Tspan-1-EGFP-Fusionsprotein, wie die Variante mit Mutationen sämtlicher potentieller Glykosylierungsstellen, assoziiert mit netzartigen intrazellulären Strukturen (Abbildung 14 und Tabelle 6). Der wesentliche Unterschied zwischen rekombinant exprimiertem Tspan-1-EGFP-Fusionsprotein aus den Zellen der Linien MDAH-2774 und OVCAR-3 ist die unterschiedliche Intensität der Bande der langsamer im Gel migrierenden Variante im Vergleich zur Bande der leichteren Form (siehe auch 3.3.4). Diese Beobachtung wurde als Hinweis darauf gewertet, dass komplexe oder hybride Glykosylierung eine bestimmende Rolle für die Lokalisation entweder assoziiert mit intrazellulärer Netzstruktur oder in der Plasmamembran und intrazellulären Vesikeln spielt. Nach Kultivierung transfizierter MDAH-2774-Zellen in Anwesenheit der Inhibitoren für die komplexe und hybride Glykosylierung Deoxymannojirimycin und Mannostatin A konnte keine

signifikante Zunahme in der Zahl der Zellen festgestellt werden, in welchen die auf das Tspan-1-EGFP-Fusionsprotein zurückzuführende Fluoreszenz ausschließlich als netzartige intrazelluläre Struktur dargestellt werden kann. Darüber hinaus konnte in MDAH-2774- und OVCAR-3-Zellen nach Transfektion mit dem 2xNA-Konstrukt, welches die Bildung der größeren Tspan-1-Variante unterdrückt, die spezifische Fluoreszenz nicht in den netzartigen Strukturen, sondern deutlich in der Plasmamembran und in intrazellulären Vesikeln nachgewiesen werden.

Tabelle 6: Subzelluläre Lokalisation und detektierte Intensität von Tspan-1-Fusionsproteinen mit C-terminalem EGFP. Fluoreszenzsignale konnten in intrazellulären netzartigen Strukturen (INS), in intrazellulären Vesikeln (IV) und in der Plasmamembran (PM) mit den Abstufungen sehr stark (+++), stark (++), schwach (+) oder nicht nachweisbar (-) detektiert werden.

Variante / Inhibitoren	MDAH-2774-Zellen	OVCAR-3-Zellen
Wildtyp +/- Deoxymannojirimycin oder +/- Mannostatin A	PM: +	PM: + oder -
	IV: +++	IV: +++ oder -
	INS: -	INS: - oder +++
N141A, N154A, N178A oder N184A (Einzelmutanten)	PM: +	PM: ++
	IV: +++	IV: +++
	INS: -	INS: -
2xNA (N178A + N184A-Doppelmutante)	PM: ++	PM: ++
	IV: ++	IV: ++
	INS: -	INS: -
4xNA (Vierfachmutante)	PM: -	PM: -
	IV: -	IV: -
	INS: +++	INS: +++

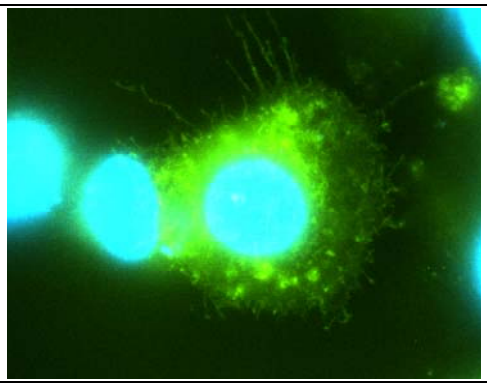
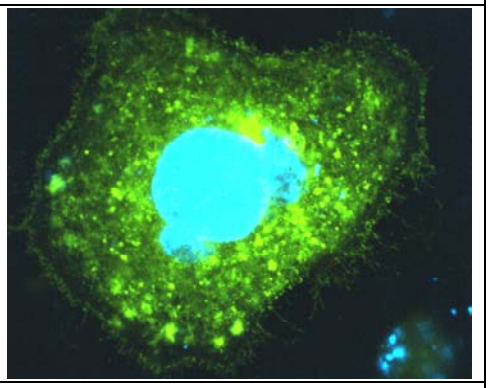
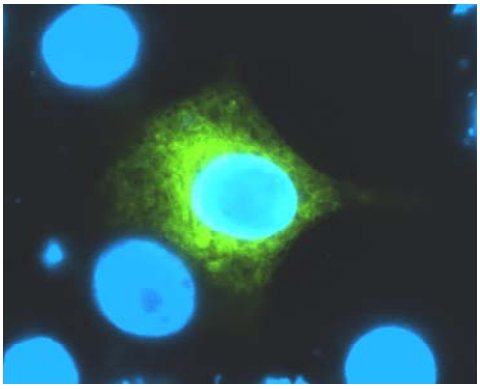
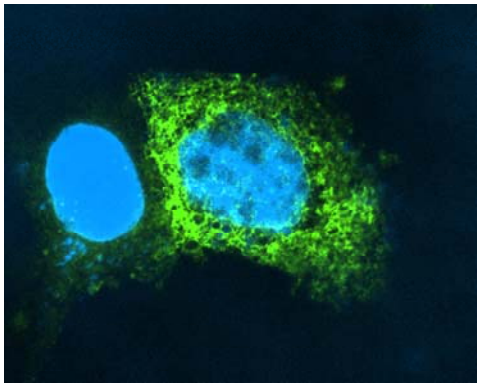
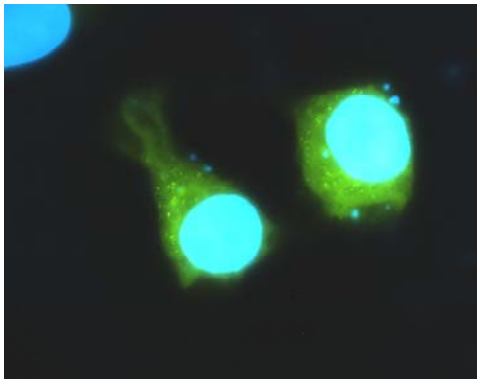
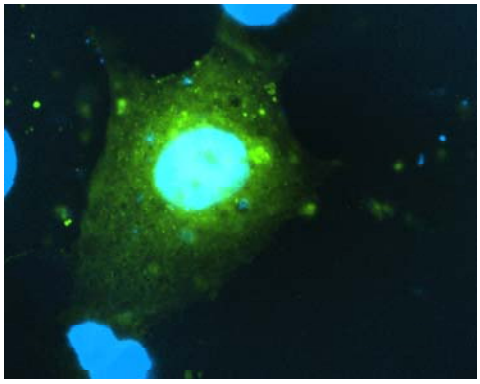
	MDAH-2774	OVCAR-3
wt-Tspan-1-EGFP		
4xNA-Tspan-1-EGFP		
EGFP-mock		

Abbildung 14: Subzelluläre Lokalisation von Tspan-1-Fusionsproteinen mit C-terminalem EGFP. MDAH-2774- und OVCAR-3-Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch charakterisiert nach Transfektion mit pLPS-3'-EGFP-Tspan-1, pLPS-3'-EGFP-Tspan-1-4xNA und pLP-EGFP-C1. Das Wildtyp-Tspan-1 ist in der Plasmamembran und in intrazellulären Vesikeln lokalisiert, die Glykosylierungsmutante 4xNA dagegen fast ausschließlich intrazellulär in netzartigen Strukturen.

3.5 Immunhistochemische Analyse der Tspan-1-Expression in Ovarialkarzinomen

Die hergestellten, gegen Peptide aus der Tspan-1-Sequenz gerichteten Antiseren eigneten sich gut, um entparaffinierte Gewebeschnitte immunhistochemisch zu färben. Die beobachtete Immunreaktivität wurde als spezifisch für Tspan-1 betrachtet, da die jeweiligen Präimmunseren keine entsprechende Färbung hervorriefen und die durch Immunisierung mit den Peptiden „NET“ und „DIRT“ erzeugten Seren übereinstimmende Ergebnisse ergaben. Untersucht wurden Gewebeschnitte von 44 serös-papillären, 15 mucinösen und 11 endometrioiden Ovarialkarzinomen. Spezifisch angefärbt waren nur in einzelnen Fällen die Plasmamembranen der Tumorzellen, wogegen häufig intrazellulär eine für Vesikel charakteristische körnige Anfärbung und manchmal eine diffuse zytoplasmatische Immunreaktivität auftrat. Stromazellen waren sehr schwach gefärbt, während von den Gefäßen ein Teil deutlich, ein anderer Teil aber gar nicht angefärbt wurde. Alle Gewebe wurden mit den beiden Antiseren NET#2 und DIRT#2, sowie den zugehörigen Präimmunseren als Kontrollen gefärbt, die spezifische Bindung getrennt für die verschiedenen Zellkompartimente beurteilt und als Wert auf einer semiquantitativen Skala (0-3) erfasst. Zudem wurden die Gesamtanteile Tspan-1-positiver Zellen ermittelt und ein „Score“ aus der Summe der Färbeintensitäten (Vesikel, diffus intrazellulär und Membranen) berechnet, der mit dem Anteil der positiven Zellen multipliziert wurde.

Die Auswertung der erfassten Daten hinsichtlich der Unterscheidung zwischen den verschieden histopathologischen Gruppen der Ovarialkarzinome ist in Tabelle 7 zusammengefasst. Gegenüber den serös-papillären Tumoren exprimieren die anderen Typen signifikant mehr Tspan-1. Dabei ist der Unterschied zu den mucinösen Karzinomen vor allem auf eine intensivere Vesikelfärbung zurückzuführen, während bei den endometrioiden Tumoren zudem der Anteil der positiven Zellen deutlich erhöht war. Zur Abgrenzung der anderen Typen von serös-papillären Tumoren ist die Vesikelanfärbung am Besten geeignet (Tabelle 7, Abbildung 15).

Tabelle 7: Vergleiche der Tspan-1-spezifischen Immunreaktivitäten von Ovarialkarzinomen mit histopathologischem Tumortyp. a) Auswertung nach Anteilen Tspan-1-positiver Zellen; b) Auswertung nach Anfärbung intrazellulärer Vesikel (semiquantitative Skala), c) Auswertung nach berechnetem „Score" aus Färbeintensitäten und Anteil der positiven Zellen. Die Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney-Test auf statistische Signifikanz geprüft (n.s.=nicht signifikant).

a)

Vergleich	Antikörper	Mittelwerte [%] positive Zellen	Fallzahlen	p (Mann-Whitney)
serös-papillär / mucinös	NET#2	51,1 / 70,3	44 / 15	n.s.
	DIRT#2	57,0 / 69,7		n.s.
serös-papillär / endometrioid	NET#2	51,1 / 94,5	44 / 11	0,0013
	DIRT#2	57,0 / 90,9		0,0062
mucinös / endometrioid	NET#2	70,3 / 94,5	15 / 11	0,028
	DIRT#2	69,7 / 90,9		0,0028

b)

Vergleich	Antikörper	Mittelwerte Intensität	Fallzahlen	p (Mann-Whitney)
serös-papillär / mucinös	NET#2	0,85 / 1,60	44 / 15	0,0033
	DIRT#2	0,83 / 1,60		0,0044
serös-papillär / endometrioid	NET#2	0,85 / 1,91	44 / 11	0,0009
	DIRT#2	0,83 / 1,50		0,012
mucinös / endometrioid	NET#2	1,60 / 1,91	15 / 11	n.s.
	DIRT#2	1,60 / 1,50		n.s.

c)

Vergleich	Antikörper	Mittelwerte Score	Fallzahlen	p (Mann-Whitney)
serös-papillär / mucinös	NET#2	95 / 173	44 / 15	0,038
	DIRT#2	77 / 168		0,012
serös-papillär / endometrioid	NET#2	95 / 225	44 / 11	0,0027
	DIRT#2	77 / 186		0,0038
mucinös / endometrioid	NET#2	173 / 225	15 / 11	n.s.
	DIRT#2	168 / 186		n.s.

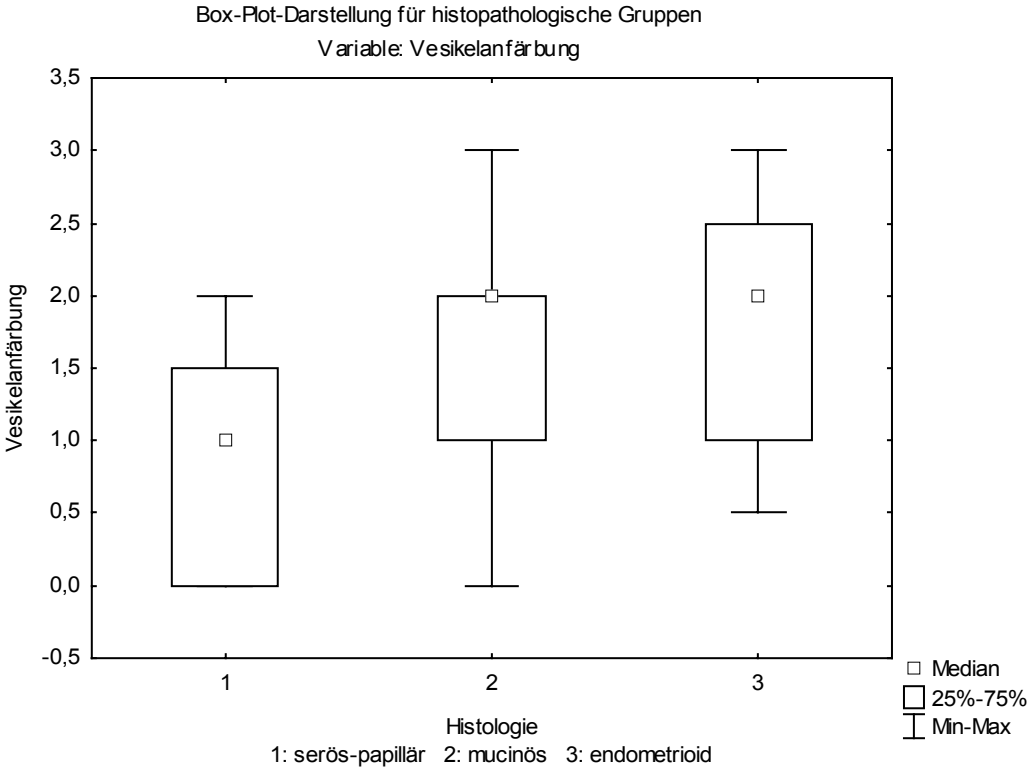


Abbildung 15: Unterschiedliche Immunreaktivität intrazellulärer Vesikel in Tumorzellen serös-papillärer, mucinöser und endometrioider Ovarialkarzinome.

Scheinbar besteht auch ein Zusammenhang zwischen Grading und Tspan-1-Expression, denn es lassen sich hochsignifikante Unterschiede zwischen G1- und G2-Tumoren, sowie zwischen G2- und G3-Tumoren mit dem Mann-Whitney-Test berechnen, ebenso wie eine signifikant erhöhte Tspan-1-Expression der Karzinome des FIGO-Typs IIIC. Allerdings ergab eine genauere Datenanalyse, dass diese scheinbaren Zusammenhänge sich nur aus der Ungleichverteilung dieser Parameter in den verschiedenen histopathologischen Gruppen ergeben und daher nur die Expressionsunterschiede zwischen den drei untersuchten Typen widerspiegeln.

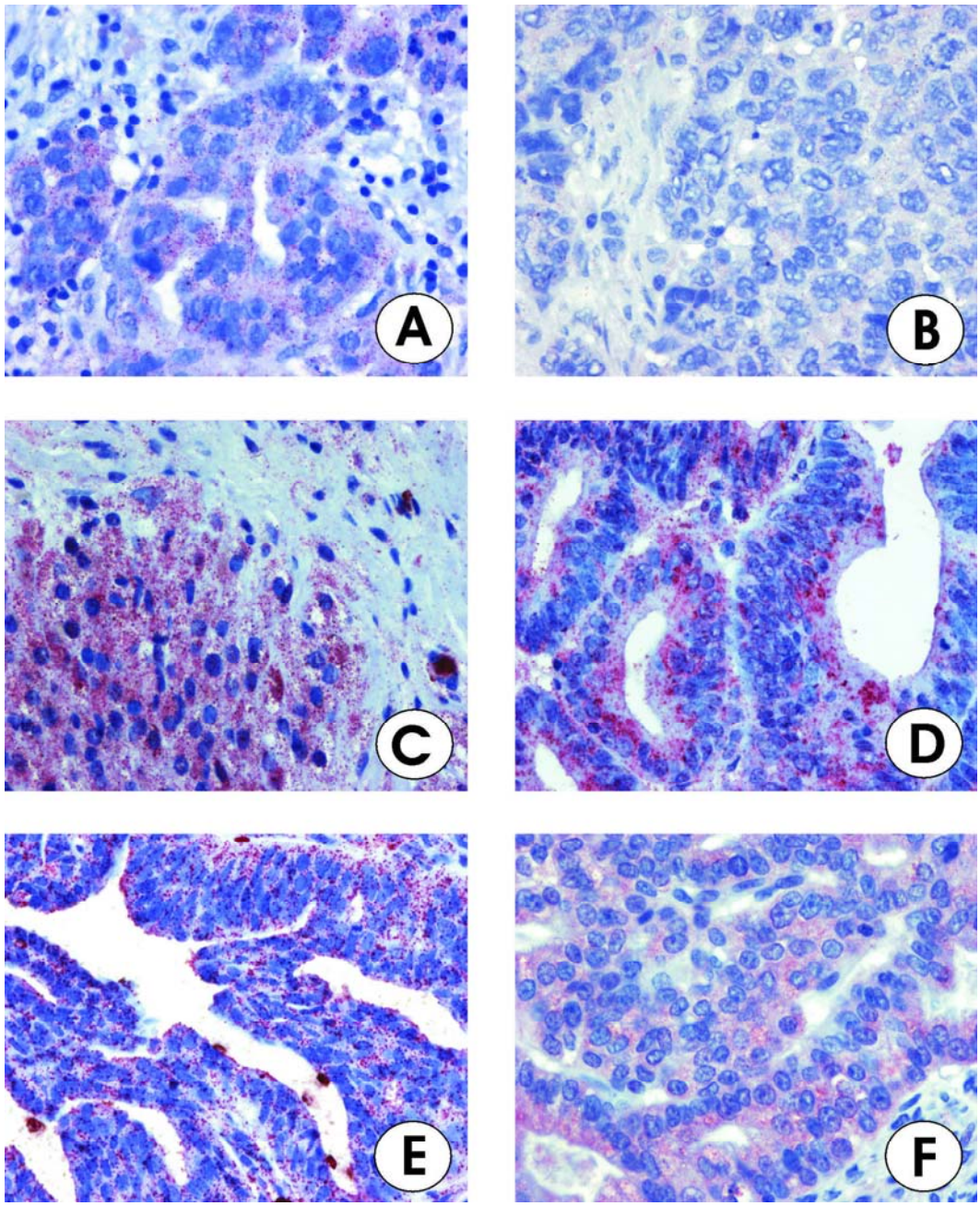


Abbildung 16: Immunhistochemische Färbungen von Ovarialkarzinomschnitten mit dem Tspan-1-spezifischen Antiserum anti-NET#2. Immunreaktivität ist durch rote Färbung zu erkennen, Zellkerne wurden blau gegengefärbt.

A,B: Serös-papilläre Karzinome, mittelstark bzw. nur sehr schwach angefärbt.

C,D: Mucinöse Karzinome. Bei Schnitt D ist starke Immunreaktivität bei den äußeren Zellen des Epithels apikal konzentriert. Diese bei Tumorepithel oft stark ausgeprägt zu beobachtende Anfärbung möglicherweise sektretorischer Vesikel kommt auch in nicht entarteten Bereichen des Epithels vor.

E, F: Endometrioide Karzinome: Bei Schnitt E ist die typische granuläre Anfärbung besonders deutlich, die Zellen des durch Schnitt F repräsentierten Tumors zeigen dagegen eine eher diffuse intrazelluläre Färbung.

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung der anti-Tspan-1-Antiseren und mögliche Anwendungen

Zur Herstellung polyklonaler Antikörper gegen Tspan-1 wurden je zwei Kaninchen mit drei verschiedenen Peptiden aus der großen extrazellulären Schleife des Tspan-1 immunisiert. Um eine hohe Antigenizität in den Kaninchen und gute Zugänglichkeit des Epitops sicherzustellen, wurden Peptidsequenzen geringer Hydrophobizität mit minimaler Homologie zu Tspan-1-Sequenzen aus Nagern ausgewählt, Die meisten der bereits verfügbaren spezifischen Antikörper gegen Tetraspanine binden in der großen extrazellulären Schleife, weil dort die größte Sequenzvariabilität unter den Mitgliedern der Tetraspanin-Proteinfamilie besteht und diese Domäne die größte antigene Determinante vieler Zellen darstellt [3]. Trotz Berücksichtigung dieser Faktoren waren von den sechs erhaltenen Antiseren nur zwei (NET#2 und DIRT#2) für immunhistochemische Untersuchungen und nur NET#2 für Western Blot-Analysen sinnvoll einsetzbar.

Durch Vergleich der Signale der jeweiligen Paare von Antiserum und Präimmunserum, sowie durch kompetitive Hemmung mit dem jeweiligen Immunisierungspeptid konnte die Spezifität der von NET#2 und DIRT#2 hervorgerufenen Signale für die sich als grundsätzlich möglich erwiesenen Anwendungen belegt werden. Dennoch begegnete man bei NET#2 im Western Blot der Einschränkung, dass anscheinend nur unglykosyliertes Tspan-1 mit diesem Antikörper nachweisbar ist. Dies erscheint plausibel, weil zwei der vier N-Glykosylierungsstellen von Tspan-1 in dem Sequenzabschnitt liegen, der als Grundlage für die Synthese des „NET“-Peptids verwendet wurde. Allerdings ließ sich ein spezifisches Signal nachweisen, dessen Lage in Übereinstimmung mit dem aus der Aminosäuresequenz von Tspan-1 berechneten Molekulargewicht war. Rekombinant exprimiertes Tspan-1 lässt sich jedoch weder in der glykosylierten noch in der unglykosylierten Form mit NET#2 im Western Blot detektieren. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der zu hohen Nachweisgrenze der verwendeten Antikörper bei nur mäßiger Expression des Transgens. Für den zur Detektion von rekombinant exprimiertem Tspan-1-EGFP

verwendeten anti-GFP-Antikörper (ab290) wurde eine sehr geringe Nachweisgrenze beschrieben (5 ng EGFP), die aber selbst von in Ovarialkarzinomzelllinien exprimiertem Tspan-1-EGFP nur knapp überschritten wird.

In immunhistochemischen Verfahren liegen die Proteine dagegen wegen der Behandlung der Proben wahrscheinlich in einem für NET#2 und DIRT#2 besser zugänglichen Zustand vor, was die Unterschiede in der Anwendbarkeit der Antiseren im Vergleich zu Western Blot-Analysen erklärt. Zur Reduktion unspezifischer Hintergrundsignale wurden häufige Serumproteine aus dem Antiserum entfernt; dieser Reinigungsschritt hatte keine Auswirkungen auf die spezifischen Antikörpersignale.

4.2 Tspan-1 ist ein heterogen glykosyliertes Protein

Durch Western Blot-Analysen mit dem anti-GFP-Antikörper (ab290) konnte rekombinant exprimiertes Tspan-1 in Form N- bzw. C-terminaler EGFP-Fusionsproteine in Solubilisaten von MDAH-2774-, OVCAR-3- und SKOV-3-Zellen nachgewiesen werden. In allen drei Ovarialkarzinomzelllinien wurden übereinstimmend spezifische Banden bei ~62 kDa und ~71 kDa nachgewiesen, EGFP ohne Tspan-1 migrierte bei ca. 31 kDa. Abgeleitet aus der Differenz der beobachteten Molekulargewichte könnten Tspan-1-Varianten ohne Fusionspartner im SDS-Gel bei etwa 31 kDa und ca. 40 kDa wandern. Das aus der Aminosäuresequenz von Tspan-1 berechnete, theoretische Molekulargewicht von 26,3 kDa (http://www.expasy.org/uniprot/O60635) weicht davon um ca. 4,7 bzw. 13,7 kDa ab.

Abgesehen davon, dass die SDS-PAGE kein exaktes Verfahren zur Bestimmung des Molekulargewichtes eines Proteins ist und anormales Laufverhalten in Abhängigkeit von Aminosäurezusammensetzung und Anteil nicht vollständig denaturierter übergeordneter Strukturen nicht selten beobachtet wird, können die Abweichungen vom theoretischen Molekulargewicht sich auch durch posttranslationale Modifikation ergeben. Eine bei Tetraspaninen häufige Modifikation stellt die N-Glykosylierung dar, die unter anderem in CD9 [80], CD63 [69], CD82 [48], CD151 [20] und CO-029 [86] nachgewiesen wurde. Dem entsprechend ließ sich die bei Tspan-1 stets beobachtete Doppelbande durch

Tunicamycinbehandlung der Zellen während der Proteinexpression auf eine einzelne Bande mit verringertem Molekulargewicht reduzieren.

Das gleiche Ergebnis wurde auch durch Mutation aller möglicherweise N-glykosylierten Asparagine zu Alaninen erreicht. Weil beim Nachweis des Tspan-1-EGPF-Fusionsproteins sowohl die schnell migrierende Form (~62 kDa-Bande), wie auch die langsamer migrierende Variante (~71 kDa-Bande) in ihren Molekulargewichten deutlich von dem des unglykosylierten Fusionsproteins (~52-53 kDa) abwichen, kann davon ausgegeangen werden, dass es sich um verschieden glykosylierte Formen des Tspan-1-Proteins handelt.

4.3 Tspan-1 ist an seinen N-Glykosylierungsstellen unterschiedlich modifiziert

Um den Beitrag jeder der vier potentiellen N-Glykosylierungsstellen in Tspan-1 zur Gesamtglykosylierung zu ermitteln, wurden Tspan-1-EGFP-Fusionsproteine mit den Einzelmutationen N141A, N154A, N178A oder N184A in Ovarialkarzinom-zelllinien exprimiert. Jedes der so veränderten Proteine zeigte bei der leichten Glykosylierungsform im Vergleich zum Wildtyp ein um ca. 2 kDa reduziertes scheinbares (SDS-PAGE) Molekulargewicht, während die beobachteten Verschiebungen der Banden der schweren Tspan-1-Variante bei den untersuchten mutanten Proteinen unterschiedlich waren. Einen geringen Einfluss hatten die Aminosäureaustausche N141A und N154A (bei beiden wurde die schwere Tspan-1-Variante um ca. 2 kDa leichter), bei N178A wurde mit einem Unterschied von ca. 5 kDa und bei N184A von etwa 4 kDa die schwere Glykoform deutlich leichter. Die Ergebnisse zeigten klar, dass alle vier möglichen N-Glyko-sylierungsstellen in Tspan-1 durch Oligosaccharide modifiziert sind. Die an die modifizierten Asparagine angehängten Kohlehydratstrukturen haben offenbar in der leichten Tspan-1-Variante ähnliche bzw. identische Molekulargewichte und könnten deswegen auch strukturell nahe verwandt sein.

Verhältnismäßig geringe Variabilität im Molekulargewicht zeigen mannosereiche Oligosaccharide, die in ihrer Grundform bereits co-translational, d.h. während der Entstehung der Polypeptidkette im ER, an Asparagin gekoppelt werden [40]. Wenn die Synthese von mannosereich N-glykosylierten Proteinen im

ER die Prozessierung der Oligosaccharide im Golgi-Apparat übertrifft, könnte die Menge eines Glykoproteins in der mannosereich modifizierten Form größer sein als die des komplex oder hybrid glykosylierten Proteins. Beim Nachweis von rekombinant exprimiertem Tspan-1-EGFP (Wildtyp und mit einzelnen Aminosäureaustauschen) in OVCAR-3-Zellen war die schneller migrierende Bande deutlich intensiver als die langsam migrierende Bande (Abbildung 12), weswegen vermutet werden kann, dass die leichte Tspan-1-Form an allen vier N-Glykosylierungsstellen mit mannosereichen Oligosacchariden modifiziert ist.

Der Nachweis des Tspan-1-EGFP-Fusionsproteins als Doppelbande wurde durch eine heterogene Glykosylierung an den Aminosäurepositionen 178 und 184 erklärt, eine Annahme, die durch das Auftreten einer einzelnen, schneller migrierenden Bande bei Expression des an diesen Positionen veränderten Tspan-1 mit Hilfe des 2xNA (N178A+N184A)-Konstrukts bestätigt werden konnte. An diesen beiden N-Glykosylierungsstellen ist die schwere Tspan-1-Glykosylierungsform vermutlich durch komplexe oder hybride Oligosaccharide modifiziert, die in ihrer Ausdehnung und Struktur deutlich variabler sind als die an Proteine gebundenen mannosereichen Oligosaccharide [40].

Die offenbar ausschließliche Modifikation mit mannosereichen Oligosacchariden der N-Glykosylierungsstellen an den Aminosäurepositionen 141 und 154 deutet auf eine Unterbrechung der Reaktionssequenz der Oligosaccharidprozessierung an diesen Stellen hin. Die räumliche Struktur von Tspan-1 könnte die Zugänglichkeit der mannosereichen Oligosaccharide für die prozessierenden Enzyme des Golgi-Apparates beschränken und so die Umwandlung in hybride oder komplexe Formen unterbinden [31]. Das Hydrophobizitätsprofil von Tspan-1 (Abbildung 3) stützt diese Vermutung, da der Bereich zwischen den Aminosäurepositionen 141 und 154 hydrophober und damit wahrscheinlich schlechter zugänglich erscheint als die unmittelbar umgebenden Domänen.

Die Folgerungen zur wahrscheinlichen Natur der Kohlehydratmodifikationen von Tspan-1 wurden durch die enzymatische Deglykosylierung des Tspan-1-EGFP-Fusionsproteins mit der Glykosidase Endo H_f bestätigt. Nach Abspaltung mannosereicher Oligosaccharide durch die Endo H_f–Behandlung wurde die schneller migrierende Tspan-1-Variante auf ein Molekulargewicht reduziert, das leicht über dem des unglykosylierten Proteins (siehe 3.3.2) liegt. Die verbliebene

Abweichung davon erklärt sich aus Kohlehydratresten, die auch nach EndoH_f – Spaltung noch das Asparagin modifizieren.

Auch die langsam migrierende Tspan-1-Form wurde durch Deglykosylierung durch Endo H_f im Molekulargewicht reduziert, was im Rahmen des abgeleiteten Modells auf der Abspaltung der mannosereichen Oligosaccharide an den Asparaginen 141 und 154 beruht. Die komplexen oder hybriden Oligosaccharide an den Aminosäurepositionen 178 und 184 der Tspan-1-Sequenz dagegen sind resistent gegen die Endo H_f –Behandlung, weswegen die Doppelbande nach Detektion im Western Blot erhalten blieb.

4.4 Die Lokalisation von Tspan-1 in der Plasmamembran und in Lysosomen

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Tspan-1 wurden in Ovarialkarzinomzelllinien rekombinant exprimierte EGFP-Fusionsproteine fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Rekombinant exprimiertes Tspan-1-EGFP ist vorwiegend in intrazellulären Vesikeln und in der Plasmamembran sichtbar. Unabhängig von den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde durch Immunfluoreszenzfärbungen mit polyklonalen Antikörpern gegen Tspan-1 die Lokalisation in der Plasmamembran [95] und in intrazellulären Kompartimenten [14] erkannt. Darüber hinaus zeigte sich bei bei einem Teil der analysierten Zellen spezifische Fluoreszenzsignale von Tspan-1-EGFP auch in netzartigen intrazellulären Strukturen, deren Natur noch ungeklärt ist. Es könnte sich um eine Assoziation mit dem Zytoskelett handeln oder um eine sich so darstellende starke Anreichung im Endoplasmatischen Retikulum.

In Zellen der Mammakarzinomline MDA-MB157 wurden meisten der durch EGFP-Tspan-1 fluoreszierenden intrazellulären Vesikel durch Anfärbung mit LysoTracker® als Lysosomen identifiziert [94].

Eine subzelluläre Lokalisation in Lysosomen und in der Plasmamembran wurde auch für das Tetraspanin CD63 nachgewiesen, welches am C-Terminus das durch das enthaltene Tyrosin geprägte Sortiermotiv G-Y-E-V-M enthält. Durch Interaktion des Sortiermotivs mit der µ3-Untereinheit des Adapter-Protein-Komplexes AP-3 wird der Großteil der neu synthetisierten CD63-Moleküle vom

trans-Golgi-Netzwerk auf direktem Weg zu den Lysosomen transportiert. Wegen der eher schwachen Bindung von G-Y-E-V-M an µ3 werden jedoch auch CD63-Moleküle in die Plasmamembran abgeführt, wo sie durch Bindung an die µ2-Untereinheit von AP-2 durch Endozytose indirekt zu Lysosomen transportiert werden. Diese Annahme wurde dadurch bestätigt, dass eine durch gerichtete Mutagenese hervorgerufene Veränderung des Sortiermotivs zu G-Y-V-E-I die Bindung an µ3A verstärkt und gleichzeitig die Bindung an µ2 schwächt, weswegen die exprimierte CD63-Mutante ausschließlich in Lysosomen nachweisbar war [70].

Tyrosin enthaltende Sortiermotive wurden auch in den Sequenzen von 12 anderen Tetraspaninen gefunden; bei Tspan-1 entspricht die C-terminale Aminosäureabfolge Y-C-N-L der Konsensussequenz Y-X-X-Φ (4, 5), wobei Φ eine hydrophobe Aminosäure mit raumerfüllender Seitenkette darstellt. Allein aus der Sequenz des Sortiermotivs lässt sich die spezifische Bindung an eine bestimmte Untereinheit der verschiedenen Adapter-Protein-Komplexe aber nicht eindeutig ableiten, denn Peptide mit der Konsensussequenz X-X-Y-X-X-Φ binden mit wenigen Ausnahmen an sämtliche Untereinheiten µ1, µ2, µ3A und µ3B [64]. Abgeleitet aus dem ermittelten bevorzugten Vorkommen einzelner Aminosäuren an bestimmten Positionen im X-X-Y-X-X-Φ-Motiv sollte für Tspan-1 (mit M-Y-L-Y-C-N-L) die Bindung an die µ1-Untereinheit am wahrscheinlichsten sein, was einen AP-1-abhängigen direkten Transportweg vom trans-Golgi-Netzwerk über Endosomen in Lysosomen nahelegt [64]. Des weiteren können die Nähe zum C-Terminus und der Abstand des Sortiermotivs zur Membran die lysosomale Sortierung entscheidend beeinflussen; der optimale Abstand zwischen Membran und dem entscheidenden Tyrosin liegt bei 7-10 Aminosäuren [65, 68]. Sowohl bei CD63 als auch bei Tspan-1 liegen die Sortiermotive im C-terminalen Bereich; in CD63 trennen zehn Aminosäuren die Y-X-X-Φ-Sequenz von der Membran während es bei Tspan-1 nur vier sind. Die Abweichung der C-terminalen Tspan-1-Sequenz vom optimalen Lysosomen-Sortiermotiv könnte einen funktionellen Unterschied bedingen. Durch die nur schwache Bindung der Y-X-X-Φ-Sequenz an die entsprechende Untereinheit des Adapter-Protein-Komplexes (in diesem Fall möglicherweise µ1) könnten manche Tspan-1-Moleküle dem direkten Transport über Endosomen in Lysosomen entgehen und, in ähnlicher Weise wie für CD63 beschrieben [70], die Lysosomen auf dem indirekten Weg über die Plasmamembran erreichen. Diese Annahmen über den Einfluss der Y-X-X-Φ-

Sortiersequenz auf die lysosomale Lokalisation von Tspan-1 müssen in Folgeuntersuchen selbstverständlich experimentell überprüft werden.

4.5 Die subzelluläre Lokalisation von Tspan-1 wird nicht von der hybriden oder komplexen N-Glykosylierung beeinflusst

Das Tspan-1-EGFP-Fusionsprotein wurde, neben der vorherrschenden Lokalisation in Plasmamembran und Lysosomen, auch assoziiert mit netzartigen intrazellulären Strukturen nachgewiesen. Weil in OVCAR-3- und MDAH-2774-Zellen exprimiertes 4xNA-Tspan-1-EGFP ausschließlich in der netzartigen Struktur nachgewiesen werden konnte, wurde diese retikuläre Lokalisation von Tspan-1-EGFP auf Veränderungen im Glykosylierungsmuster zurückgeführt. Eine Fehllokation, die ausschließlich auf Konformationsänderungen auf Grund der in 4xNA-Tspan-1-EGFP im Vergleich zu Wildtyp-Tspan-1-EGFP veränderten Aminosäuren beruht, wurde ausgeschlossen, weil in einer Subpopulation transfizierter OVCAR-3-Zellen auch Wildtyp-Tspan-1-EGFP in den netzartigen Strukturen auftrat.

Der Vergleich der Tspan-1-EGFP-Signale nach Transfektion von MDAH-2774- und OVCAR-3-Zellen mit entsprechenden Konstrukten und Analyse im Western-Blot ergab einen vom Zelltyp abhängigen Unterschied zwischen den Intensitäten der schnell und der langsam migrierenden spezifischen Banden: Bei MDAH-2774-Zellen waren diese etwa gleich intensiv, wogegen bei Zellen der Linie OVCAR-3 die leichte Tspan-1-Form dominierte. Da für den Transport eines anderen Membranproteins, der β-Untereinheit der H,K-ATPase, zur Plasmamembran eine Abhängigkeit vom Vorhandensein komplex modifizierter N-Glykosylierungsstellen nachgewiesen worden war [93], wurde überprüft, ob Vorliegen hybrider oder komplexer Glykosylierung die Voraussetzung für die Lokalisation des Tspan-1 in Plasmmembran und intrazellulären Vesikeln ist. MDAH-2774- und OVCAR-3-Zellen, die mit Deoxymannojirimycin oder Mannostatin A kultiviert wurden, zeigten allerdings keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation von Tspan-1-EGFP zu Zellen, die ohne diese Inhibitoren der Oligosaccharid-prozessierung im Golgi-Apparat kultiviert wurden. Analog dazu konnte auch nach

Expression von 2xNA-Tspan-1-EGFP, bei dem wegen Mutation der heterogen glykosylierten Asparagine 178 und 184 nur die leichte Tspan-1-EGFP-Bande im Western Blot nachweisbar war, die EGFP-Fluoreszenz nur deutlich in der Plasmamembran und in intrazellulären Vesikeln detektiert werden. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die hybride oder komplexe Oligosaccharidmodifikation von Tspan-1 nicht die Voraussetzung für die Lokalisation in Plasmamembran und Lysosomen ist.

4.6 Von der N-Glykosylierung abhängige ER-Retention des Tspan-1

Nach der co-translationalen N-Glykosylierung einer Polypeptidkette im ER erfolgt die Prozessierung mannosereicher Oligosaccharide zu hybriden und komplexen Formen im Golgi-Apparat [40]. Daher erlaubt die Unterscheidung zwischen mannosereichen (Endo H_f –spaltbaren) und hybriden oder komplexen (Endo H_f –resistenten), an Asparagin gekoppelten Oligosacchariden Rückschlüsse auf die subzelluläre Lokalisation eines Proteins [93]. Die leichte, ausschließlich mannosereiche Glykoform von Tspan-1-EGFP sollte demnach im ER lokalisiert sein, wogegen die schwere, teilweise hybrid oder komplex glykosylierte Variante aus post-ER-Kompartimenten stammen sollte.

Calnexin ist ein im ER lokalisiertes, membranständiges Chaperon, das die korrekte Faltung von Membranproteinen überwacht [72], was entweder in Abhängigkeit von der Bindung an asparagingekoppelte Oligosaccharide oder unabhängig von Kohlehydratmodifikation geschieht [12]. Für die Tetraspanine CD9 und CD82 wurde eine Assoziation mit Calnexin nachgewiesen [11, 71], weswegen verallgemeinernd angenommen werden kann, Calnexin überwache möglicherweise die Faltung der Transmembrandomänen aller Tetraspanine [4].

Der Nachweis von Calnexin in COS-7-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz färbt das ER als eine netzartige intrazelluläre Struktur [11], die der subzellulären Verteilung von 4xNA-Tspan-1-EGFP in MDAH-2774- und OVCAR-3-Zellen sehr ähnelt. Wegen dieser Übereinstimmung wurde vermutet, dass das EGFP-Fusionsprotein im ER zurückgehalten wird. Bei den Einzelmutanten wie auch bei 2xNA-Tspan-1-EGFP konnte dagegen keine ER-Anreicherung beobachtet werden, was die Annahme einer Oligosaccharid-abhängigen Bindung von Calnexin an Tspan-1

stützt. In diesem Konzept könnte das Ausbleiben der Calnexin-Bindung an das vierfach mutierte, unglykosylierte Protein die Fehlfaltung der Transmembrandomänen von Tspan-1 fördern und so das Zurückhalten von 4xNA-Tspan-1-EGFP im ER hervorrufen. Ein Verbleiben neu synthetisierter Tetraspanine im ER aufgrund fehlgefalteter Transmembrandomänen wurde bereits für CD82 [11] und für Uroplakin Ib [90] nachgewiesen.

Für das Tetraspanin Uroplakin Ia wurde gezeigt, dass seine primäre Assoziation mit seinem Interaktionspartner Uroplakin II erforderlich für das Verlassen des ER ist [91]. Falls das Vorhandensein von asparagingebundenen Oligosacchariden in Tspan-1 Auswirkungen auf seine Bindung an Proteine dieser Art hätte, könnte die ER-Retention von 4xNA-Tspan-1-EGFP mit der schwächeren oder ausbleibenden einer solchen Assoziation erklärt werden.

Ein nahezu vollständiger Rückhalt von Wildtyp-Tspan-1-EGFP im ER wurde in einer Subpopulation von transfizierten OVCAR-3-Zellen beobachtet, nicht jedoch in das gleiche Konstrukt enthaltenden MDAH-2774-Zellen. Mit dieser Beobachtung einhergehend dominiert beim Western Blot-Nachweis aus Solubilisaten von OVCAR-3-Zellen die dem mannosereich N-glykosylierten Tspan-1-EGFP zugeordnete Bande, wogegen in Solubilisaten von MDAH-2774-Zellen die mannosereiche und die hybride oder komplexe Glykoform mit gleichen Intensitäten detektiert wurden. Der in manchen Zellen beobachtete vollständige Rückhalt von Wildtyp-Tspan-1-EGFP im ER könnte auf eine in OVCAR-3-Zellen besonders starke Proteinexpression zurückzuführen sein. Durch die im ER lokalisierten Protein-Disulfid-Isomerasen [72] könnten durch intermolekulare Bildung von Disulfidbrücken quervernetzte Tspan-1-EGFP-Homooligomere entstehen. So erzeugte Proteinaggregate werden im ER zurückgehalten [67]. Bedeutsam wäre dieser Mechanismus allerdings nur bei einer stärkeren Proteinexpression von Wildtyp-Tspan-1-EGFP gegenüber den veränderten Varianten, wofür es jedoch keine experimentellen Belege gibt.

Ein plausibler Mechanismus als Grundlage einer Erklärung für die selektive ER-Retention beruht auf der Rolle von Glukoseeinheiten im modifizierenden Oligosaccharid. Die im ER an Asparagin gekoppelte Kohlehydratstruktur trägt initial am äußeren Ast drei Glukoseeinheiten, von denen zwei durch die Glukosidasen I und II co-translational abgespalten werden [40], was die Voraussetzung für die Bindung von Calnexin an das Oligosaccharid darstellt [72].

Nach der Translation dissoziiert Calnexin als Folge der durch die Glukosidase II vermittelten Entfernung der letzten Glukoseeinheit vom Glykoprotein und leitet - bei korrekter Proteinfaltung - das Verlassen des ER ein [23]. Werden die Glukosidasen I und II durch Inhibitoren wie Castanospermin oder Deoxynojirimycin gehemmt, ist der ER-Export von Glykoproteinen deutlich verlangsamt [16]. Auf Grund starker Proteinexpression könnten nicht auseichende Aktivitäten der Glukosidasen I und II die Ursache für die ER-Retention von Wildtyp-Tspan-1-EGFP in einzelnen OVCAR-3-Zellen sein. Die mutierten Tspan-1-EGFP-Moleküle könnten wegen der reduzierten Zahl an asparagingekoppelten Oligosacchariden weniger stark von einer solchen Limitierung durch die Aktivitäten der glukoseprozessierenden Enzyme betroffen sein. Diese Annahme wird gestützt von der Beobachtung, dass die auf 2xNA-Tspan-1-EGFP zurückzuführende Fluoreszenz deutlicher in der Plasmamembran auftrat als bei Expression der Einfachmutanten oder bei Wildtyp-Tspan-1-EGFP. Der von der Glukose-prozessierung abhängige ER-Rückhalt könnte einen Mechanismus darstellen, um co- bzw. posttranslational die Oberflächenexpression von Tspan-1 und damit verbundene Funktionen zu regulieren.

4.7 Die Expression und Lokalisation von Tspan-1 in Gewebeproben von verschiedenen Ovarialkarzinomen

Entparaffinierte Gewebeschnitte von Tumorproben aus serös-papillären, mucinösen und endometrioiden Ovarialkarzinomen wurden mit den Tspan-1-Antiseren NET#2 und DIRT#2 immunhistochemisch angefärbt, um die Expressionsstärke und subzelluläre Lokalisation des Tspan-1-Proteins in diesen verschiedenen Subtypen zu bestimmen.

Die verschiedenen histologischen Typen exprimierten Tspan-1- unterschiedlich stark, mucinöse und vor allem endometrioide Tumoren deutlich stärker als die serös-papillären, was wahrscheinlich auf einen mit erhöhter Tspan-1-Expression einhergehenden höheren Anteil sektretorisch aktiver Zellen bei mucinösen und endometrioiden Ovarialkarzinomen zurückzuführen ist. Von den beobachteten Immunreaktivitäten in Plasmamembran, intrazellulären Vesikeln und als diffuse, zytoplasmatische Anfärbung war die Vesikelfärbung am besten geeignet, um die verschiedenen Tumortypen voneinander abzugrenzen. Eine verlässliche Aussage

über eine Korrelation zwischen Tspan-1-Expression und Tumorprogression konnte in der durchgeführten Pilotstudie mit einer begrenzten Fallzahl noch nicht getroffen werden. Zwar konnte mit dem Mann-Whitney-Test eine hochsignifikante Korrelation zwischen Tspan-1-Expression und Grading ausgehend von der Gesamtheit der untersuchten Tumoren berechnet werden; wegen des unterschiedlichen Beitrags der verschiedenen Tumortypen zu den Fallgruppen mit bestimmtem Grading spiegelt die berechnete Signifikanz jedoch lediglich die Tspan-1-Expression der einzelnen histopathologischen Gruppen wider und nicht eine unabhängige Korrelation.

Bei cervikalen intraepithelialen Neoplasien und Cervixkarzinomen zeigten erste Untersuchen eine direkte Korrelation von Tspan-1-Expression und Tumorprogression [95]. Wegen dieses Befundes und der bei vielen Arten menschlicher Tumoren nachgewiesenen direkten oder – in der Mehrzahl der Fälle – indirekten Korrelation zwischen der Expression von Tetraspanien und Malignität der Tumoren, erscheint das Fortsetzen der begonnen Untersuchungen bis zum Erreichen einer Zahl von 200 serös-papillären Ovarialkarzinome sinnvoll, bevor für diesen Tumortyp in dieser Hinsicht eine endgültige Bewertung erfolgen kann.

Die in Ovarialkarzinomproben nachgewiesene subzelluläre Lokalisation von Tspan-1 in der Plasmamembran oder im Zytoplasma wurde mittels immunhistochemischen Färbungen ebenfalls bei Cervix- [95] und Leberkarzinomen [14], sowie bei Prostatatumoren [96] gezeigt. Darüber hinaus bestätigen die immunhistochemischen Daten die Ergebnisse aus der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Tspan-1-EGFP exprimierenden Transfektantenzellen (Tabelle 6). Besonders interessant ist der Aspekt, dass bei endometrioiden Ovarialkarzinomen, die Tspan-1 am stärksten exprimieren (Abbildung 15), auch eine diffuse, zytoplasmatische Immunreaktivität nachweisbar ist. Wie im Fall der in OVCAR-3-Zellen exprimierten Tspan-1-EGFP-Fusionsproteine, kann vermutet werden, dass es sich dabei um eine Anfärbung des ER handelt, die bei starker Expression des Tspan-1 oder Störungen der Prozessierung bzw. der intrazellulären Transportvorgänge auch in Tumorzellen besonders ausgeprägt sein kann.

In Gewebeproben von Ovarialkarzinomen verschiedener Tumorstadien konnten die Tetraspanine CD9 und CD82 in Abhängigkeit vom Grading unterschiedlich lokalisiert nachgewiesen werden. Bei den eher stark exprimierenden Grading 1-Tumoren wurden CD9 und CD82 vor allem in der Plasmamembran detektiert, wogegen in schwach exprimierenden Grading 3-Tumoren die Immunreaktivität verstärkt im Zytoplasma gefunden wurde [30]. Eine solche Korrelation mit der Tumorprogression konnte für Tspan-1 jedoch aufgrund der noch zu kleinen Fallzahlen in den einzelnen Fallgruppen durch die bisherige Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Die zytoplasmatische Immunreaktivität bei CD9 und CD82 wurde im Gegensatz zu Tspan-1 nicht bei starker, sondern bei schwacher Expression der Tetraspanine beobachtet, weswegen dem ER-Rückhalt von CD9 und CD82 möglicherweise andere Mechanismen zugrunde liegen als bei Tspan-1.

Im histologischen Kontext betrachtet wird eine mögliche funktionelle Beteiligung von Tspan-1 am sekretorischen System deutlich: Bei mucinösen Ovarialkarzinomen und ebenso, nur weniger stark ausgeprägt, beim nicht entarteten Normalgewebe werden neben der deutlichen Vesikelanfärbung auch die apikalen Membranbereiche der Epithelzellen der obersten Schicht spezifisch angefärbt. Ein ähnliches Färbemuster mit Betonung der sekretorisch aktiven Bereiche konnte auch bei benignen Prostatahyperplasien und Prostatatumoren beobachtet werden [96]. Tspan-1 könnte Bestandteil der Membran von sekretorischen Vesikeln sein und nach der Membranfusion in lokal erhöhter Konzentration im apikalen Bereich der Epithelzellmembran vorkommen.

4.8 Ausblick

Neben den Ergebnissen dieser Arbeit bieten publizierte Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen interessante Ansatzpunkte für Folgeuntersuchungen zur Bedeutung von Tspan-1 in normalen Zellen und malignen Tumoren:

Im Mammakarzinom wurde in Östrogen-Rezeptor alpha (ERα)-positiven Tumoren eine im Vergleich zu ERα-negativen Läsionen deutlich erhöhte Tspan-1-Expression nachgewiesen. Darüber hinaus weisen zwei hochaffine ERα-Bindungsstellen im *tspan-1*-Gen auf eine direkte transkriptionelle Regulation von Tspan-1 durch den Östrogenrezeptor hin [1]. Ein in der Mammakarzinomzelllinie

MCF-7 durch Exposition mit Rapamycin oder Cotylenin A ausgelöster G_1-Arrest verstärkt die Tspan-1-Expression, wobei sich der Effekt durch Kombination der beiden Agenzien potenziert [38]. Wegen der Hemmung der Serin/Threonin-Kinase mTOR durch Rapamycin weisen diese Ergebnisse auf eine Inhibition der Tspan-1-Expression durch mTOR hin.

In einer entwicklungsbiologischen Arbeit [97] wurde für Tspan-1 aus *Xenopus laevis* auf transkriptioneller Ebene eine Inhibition durch das Knochen-morphogenetische Protein („bone morphogenetic protein“, BMP) und eine Induktion durch Notch gezeigt. Darüber hinaus wurde bei Überexpression von Tspan-1 eine Reduktion der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion nachgewiesen [97].

Die bisherigen Arbeiten zu Tspan-1 weisen auf eine Rolle von Tspan-1 in der frühen Embryonalentwicklung wie auf eine Bedeutung in der Kanzerogenese bestimmter Zelltypen hin. Zudem wird eine komplexe Regulation auf der transkriptionellen Ebene deutlich. Ein detaillierteres Verständnis der Regulation der Tspan-1-Expression und Kenntnis molekularer Interaktionspartnern wird helfen, die in verschiedenen Krebsarten beobachtete differentielle Expression von Tspan-1 in einen mechanistischen Zusammenhang zu bringen und die Rolle von Tspan-1 zu erklären. Die vorliegende Arbeit liefert mit der grundlegenden molekularbiologisch-biochemischen Charakterisierung, der Bestimmung der subzellulären Lokalisation und Untersuchungen zur Expression und Lokalisation von Tspan-1 in verschiedenen histologischen Typen menschlicher Ovarialkarzinome mit neuen anti-Tspan-1-Antikörpern eine wichtige Grundlage zur weiteren Erforschung dieses bisher wenig untersuchten Tetraspanins.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bis dahin nicht verfügbare anti-Tspan-1-Antikörper hergestellt und auf ihre Eignung für bioanalytische Verfahren überprüft. Die Kaninchen-Antiseren wurden nach Immunisierungen mit verschiedenen synthetischen Peptiden aus der großen extrazellulären Domäne des Tspan-1 gewonnen und zur Bestimmung der spezifischen Antigenbindungen mit verschiedenen Methoden mit den jeweiligen Präimmunseren verglichen. Zwei Antiseren aus Immunisierungen mit verschiedenen Peptiden erzeugten übereinstimmende, spezifische Signale bei immunhistochemischen Färbungen, die sich durch Präinkubation des Antiserums mit dem jeweiligen Immunisierungspeptid unterdrücken ließen. Die beiden Antiseren ergaben auch im Western Blot teilweise übereinstimmende, spezifische Banden, konnten aber wegen Hinweisen auf die Maskierung der Epitope durch posttranslationale Modifikation und zu hoher Nachweisgrenze nicht zur molekularen Charakterisierung von Tspan-1 herangezogen werden. Dazu wurde stattdessen Tspan-1 als EGFP („enhanced green fluorescent protein“, verstärkt grün fluoreszierendes Protein)-Fusionsprotein rekombinant in verschiedenen Ovarialkarzinomzelllinien exprimiert und durch einen robusten anti-GFP-Antikörper nachgewiesen. Spezifische Signale bei ~62 und ~71 kDa ließen sich durch Tunicamycin-Behandlung während der Proteinexpression auf eine ~53 kDa-Bande reduzieren. Durch gerichtete Mutagenese wurden daraufhin einzelne oder mehrere der vier potenziellen N-Glykosylierungsstellen in der Tspan-1-Sequenz entfernt und diese glykosylierungsdefizienten Derivate als Fusionsproteine exprimiert. Es zeigte sich, dass alle vier möglichen N-Glykosylierungsstellen von Tspan-1 durch Oligosaccharide modifiziert sind. Darüber hinaus wurde als Ursache für das Auftreten einer spezifischen Tspan-1-Doppelbande die heterogenen Modifikation der beiden C-terminalen N-Glykosylierungsstellen ermittelt. Die enzymatische Deglykosylierung von immunaffinitätschromatographisch gereinigtem Tspan-1-EGFP mit Endo H_f zeigte, dass die leichte Tspan-1-Variante ausschließlich durch mannosereiche Oligosaccharide modifiziert ist, wogegen bei der schweren Form die Kohlehydratestrukturen an den beiden C-terminalen N-Glykosylierungsstellen zu hybriden oder komplexen Oligosacchariden prozessiert werden.

Tspan-1 konnte nach der Expression als EGFP-Fusionsprotein in verschiedenen Ovarialkarzinomzelllinien sowohl in intrazellulären Vesikeln wie auch in der Plasmamembran nachgewiesen werden. In einer Subpopulation der Tspan-1-exprimierenden Zellen war das Protein ausschließlich in einer intrazellulären, netzartigen Struktur lokalisiert, die das Endoplasmatische Retikulum darstellt. Das an allen potentiellen Glykosylierungsstellen mutierte Derivat ließ sich in allen exprimierenden Zellen nur dort nachweisen. Aus den Veränderungen der subzellulären Lokalisation von Wildtyp-Tspan-1 und glykosylierungsdefizienten Derivaten wurde auf eine Beteiligung von Calnexin, einem kohlehydratbindenden Chaperon, an der Überwachung der Faltung von Transmembrandomänen geschlossen. Darüber hinaus wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, mit dem die glykosylierungsabhängige Bindung von Calnexin an Tspan-1 und somit die korrekte Proteinfaltung unterdrückt werden kann, um so die Oberflächenexpression von Tspan-1 zu modulieren.

Durch immunhistochemische Färbungen von Ovarialkarzinomschnitten serös-papillärer (n=44), mucinöser (n=15) und endometrioider (n=11) Tumoren mit den anti-Tspan-1-Antiseren wurde die Expression und Lokalisation von Tspan-1 ermittelt. Dabei wurde die subzelluläre Lokalisation in Plasmamembran, intrazellulären Vesikeln und dem Endoplasmatischen Retikulum bestätigt, wobei sich auf Basis der Vesikelfärbung die verschiedenen Typen der Ovarialkarzinome am besten klassifizieren ließen. Die beobachtete Stärke der Immunreaktivität nimmt von serös-papillären über mucinöse zu endometrioiden Tumoren zu. Auf Grund der begrenzten Fallzahlen konnte für die untersuchten Subtypen die Tspan-1-Expression noch nicht signifikant mit dem Grading korreliert werden. Aus der Stärke der Vesikelfärbung und Immunreaktivität in apikalen Membranbereichen von Tumorepihelzellen bei mucinösen Ovarialkarzinomen ergab sich ein Hinweis auf eine Beteiligung von Tspan-1 an Sekretionsprozessen.

Mit der grundlegenden molekularbiologisch-biochemischen Charakterisierung, der Bestimmung der subzellulären Lokalisation und Untersuchungen zur Expression und Lokalisation von Tspan-1 in verschiedenen histologischen Typen menschlicher Ovarialkarzinome mit neuen anti-Tspan-1-Antikörpern stellt diese Arbeit eine wichtige Grundlage zur weiteren Erforschung dieses bisher wenig untersuchten Tetraspanins dar.

6. Literatur

1) Abba MC, Hu Y, Sun H, Drake JA, Gaddis S, Baggerly K, Sahin A, Aldaz CM: Gene expression signature of estrogen receptor alpha status in breast cancer. BMC Genomics 11: 37-49 (2005)

2) Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215: 403-410 (1990)

3) Azorsa DO, Moog S, Cazenave JP, Lanza F: A general approach to the generation of monoclonal antibodies against members of the tetraspanin superfamily using recombinant GST fusion proteins. J Immunol Methods 229: 35-48 (1999)

4) Berditchevski F, Odintsova E: Tetraspanins as regulators of protein trafficking. Traffic 8: 89-96 (2007)

5) Berditchevski F: Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. J Cell Sci 114: 4143-4151 (2001)

6) Borczuk AC, Gorenstein L, Walter KL, Assaad AA, Wang L, Powell CA: Non-small-cell lung cancer molecular signatures recapitulate lung developmental pathways. Am J Pathol 163: 1949-1960 (2003)

7) Boucheix C, Duc GH, Jasmin C, Rubinstein E: Tetraspanins and malignancy. Expert Rev Mol Med 1: 1- 17 (2001)

8) Brabender J, Marjoram P, Salonga D, Metzger R, Schneider PM, Park JM, Schneider S, Holscher AH, Yin J, Meltzer SJ, Danenberg KD, Danenberg PV, Lord RV: A multigene expression panel for the molecular diagnosis of Barrett's esophagus and Barrett's adenocarcinoma of the esophagus. Oncogene 23: 4780-4788 (2004)

9) Buchholz M, Braun M, Heidenblut A, Kestler HA, Kloppel G, Schmiegel W, Hahn SA, Luttges J, Gress TM: Transcriptome analysis of microdissected pancreatic intraepithelial neoplastic lesions. Oncogene 24: 6626-6636 (2005)

10) Bustin SA: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J Mol Endocrinol 29: 23-39 (2002)

11) Cannon KS, Cresswell P: Quality control of transmembrane domain assembly in the tetraspanin CD82. EMBO J 20: 2443-2453 (2001)

12) Cannon KS, Hebert DN, Helenius A: Glycan-dependent and -independent association of vesicular stomatitis virus G protein with calnexin. J Biol Chem 271: 14280-14284 (1996)

13) Chao A, Wang TH, Lee YS, Hsueh S, Chao AS, Chang TC, Kung WH, Huang SL, Chao FY, Wei ML, Lai CH: Molecular characterization of adenocarcinoma and squamous carcinoma of the uterine cervix using microarray analysis of gene expression. Int J Cancer 119: 91-98 (2006)

14) Chen L, Shen AG, Wang GL, Lu P, Li XY: Expression of NET-1 gene and protein in hepatocellular carcinoma and related tissues. Ai Zheng 25: 320-325 (2006)

15) Drapkin R, Crum CP, Hecht JL: Expression of candidate tumor markers in ovarian carcinoma and benign ovary: evidence for a link between epithelial phenotype and neoplasia. Hum Pathol 35: 1014-1021 (2004)

16) Elbein AD: Glykosidase inhibitors: inhibitors of N-linked oligosaccharide processing. FASEB J 5: 3055-3063 (1991)

17) Engel J, Hölscher G, Schubert-Fritschle G: Epidemiologie. In: Tumorzentrum München (Hrsg) Manual Maligne Ovarialtumoren, W. Zuckschwerdt München, S. 1-11 (2004)

18) Erovic BM, Neuchrist C, Kandutsch S, Woegerbauer M, Pammer J: CD9 expression on lymphatic vessels in head and neck mucosa. Mod Pathol 16: 1028-1034 (2003)

19) Euer NI, Kaul S, Deissler H, Mobus VJ, Zeillinger R, Weidle UH: Identification of L1CAM, Jagged2 and Neuromedin U as ovarian cancer-associated antigens. Oncol Rep 13: 375-387 (2005)

20) Fitter S, Tetaz TJ, Berndt MC, Ashman LK: Molecular cloning of cDNA encoding a novel platelet-endothelial cell tetra-span antigen, PETA-3. Blood 86: 1348-1355 (1995)

21) Hartley JL, Temple GF, Brasch MA: DNA cloning using in vitro site-specific recombination. Genome Res 20: 1788-1795 (2000)

22) Hashida H, Takabayashi A, Tokuhara T, Hattori N, Taki T, Hasegawa H, Satoh S, Kobayashi N, Yamaoka Y, Miyake M: Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer. Br J Cancer 89: 158-167 (2003)

23) Helenius A, Aebi M: Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. Annu Rev Biochem 73: 1019-1049 (2004)

24) Hemler ME: Tetraspanin functions and associated microdomains. Nat Rev Mol Cell Biol 6: 801-811 (2005)

25) Hemler ME: Specific tetraspanin functions. J Cell Biol 155: 1103-1107 (2001)

26) Hemler ME, Mannion BA, Berditchevski F: Association of TM4SF proteins with integrins: relevance to cancer. Biochim Biophys Acta 1287: 67-71 (1996)

27) Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Adachi M, Huang CL, Taki T, Kasugai T, Ishiguro S, Nakamori S, Miyake M: Immunohistochemically

detected expression of motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) in lung adenocarcinoma and its relation to prognosis. Int J Cancer 74: 205-211 (1997)

28) Higashiyama M, Taki T, Ieki Y, Adachi M, Huang CL, Koh T, Kodama K, Doi O, Miyake M: Reduced motility related protein-1 (MRP-1/CD9) gene expression as a factor of poor prognosis in non-small cell lung cancer. Cancer Res 55: 6040-6044 (1995)

29) Hori H, Yano S, Koufuji K, Takeda J, Shirouzu K: CD9 expression in gastric cancer and its significance. J Surg Res 117: 208-215 (2004)

30) Houle CD, Ding XY, Foley JF, Afshari CA, Barrett JC, Davis BJ: Loss of expression and altered localization of KAI1 and CD9 protein are associated with epithelial ovarian cancer progression. Gynecol Oncol 86: 69-78 (2002)

31) Hsieh P, Rosner MR, Robbins PW: Selective cleavage by endo-beta-N-acetylglucosaminidase H at individual glykosylation sites of Sindbis virion envelope glykoproteins. J Biol Chem 258: 2555-2561 (1983)

32) Huang H, Groth J, Sossey-Alaoui K, Hawthorn L, Beall S, Geradts J: Aberrant expression of novel and previously described cell membrane markers in human breast cancer cell lines and tumors. Clin Cancer Res 11: 4357-4364 (2005)

33) Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Maitra A, Adsay NV, Shen-Ong GL, Berg K, Hollingsworth MA, Cameron JL, Yeo CJ, Kern SE, Goggins M, Hruban RH: Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies. Cancer Res 63: 8614-8622 (2003)

34) Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Olsen M, Lowe AW, van Heek NT, Rosty C, Walter K, Sato N, Parker A, Ashfaq R, Jaffee E, Ryu B, Jones J, Eshleman JR, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH, Brown PO, Goggins M:

Exploration of global gene expression patterns in pancreatic adenocarcinoma using cDNA microarrays. Am J Pathol 162: 1151-1162 (2003)

35) Jackson P, Marreiros A, Russell PJ: KAI1 tetraspanin and metastasis suppressor. Int J Biochem Cell Biol 37: 530-534 (2005)

36) Jamil F, Peston D, Shousha S: CD9 immunohistochemical staining of breast carcinoma: unlikely to provide useful prognostic information for routine use. Histopathology 39: 572-577 (2001)

37) Kanetaka K, Sakamoto M, Yamamoto Y, Yamasaki S, Lanza F, Kanematsu T, Hirohashi S: Overexpression of tetraspanin CO-029 in hepatocellular carcinoma. J Hepatol 35: 637-642 (2001)

38) Kasukabe T, Okabe-Kado J, Kato N, Sassa T, Honma Y: Effects of combined treatment with rapamycin and cotylenin A, a novel differentiation-inducing agent, on human breast carcinoma MCF-7 cells and xenografts. Breast Cancer Res 7: 1097-1110 (2005)

39) Kawashima M, Doh-ura K, Mekada E, Fukui M, Iwaki T: CD9 expression in solid non-neuroepithelial tumors and infiltrative astrocytic tumors. J Histochem Cytochem 50: 1195-1203 (2002)

40) Kornfeld R, Kornfeld S: Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu Rev Biochem 54: 631-664 (1985)

41) Kubista B, Erovic BM, Klinger H, Sulzbacher I, Trieb K: CD9 expression is not a prognostic factor in human osteosarcoma. Cancer Lett 209: 105-110 (2004)

42) Kuroda N, Inoue K, Guo L, Miyazaki E, Hayashi Y, Naruse K, Toi M, Hiroi M, Shuin T, Enzan H: Expression of CD9/motility-related protein 1 (MRP-1) in renal parenchymal neoplasms: consistent expression in papillary and chromophobe renal cell carcinomas. Hum Pathol 32: 1071-1077 (2001)

43) Kurzeder C, Sauer G, Deissler H: Molecular targets of ovarian carcinomas with acquired resistance to platinum/taxane chemotherapy. Curr Cancer Drug Targets 6: 207-227 (2006)

44) Kyhse-Andersen J: Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J Biochem Biophys Methods 10: 203-209 (1984)

45) Kyte J, Doolittle RF: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol 157: 105-132 (1982)

46) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685 (1970)

47) Leavitt R, Schlesinger S, Kornfeld S: Tunicamycin inhibits glykosylation and multiplication of Sindbis and vesicular stomatitis viruses. J Virol 21: 375-385 (1977)

48) Lebel-Binay S, Gil ML, Lagaudriere C, Miloux B, Marchiol-Fournigault C, Quillet-Mary A, Lopez M, Fradelizi D, Conjeaud H: Further characterization of CD82/IA4 antigen (type III surface protein): an activation/differentiation marker of mononuclear cells. Cell Immunol 154: 468-483 (1994)

49) Lee CH, Bang SH, Lee SK, Song KY, Lee IC: Gene expression profiling reveals sequential changes in gastric tubular adenoma and carcinoma in situ. World J Gastroenterol 11: 1937-1945 (2005)

50) Levy S, Shoham T: Protein-protein interactions in the tetraspanin web. Physiology (Bethesda) 20: 218-224 (2005)

51) Levy S, Shoham T: The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. Nat Rev Immunol 5: 136-148 (2005)

52) Maecker HT, Todd SC, Levy S: The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. FASEB J 11: 428-442 (1997)

53) Mhawech P, Dulguerov P, Tschanz E, Verdan C, Ares C, Allal AS: Motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) expression can predict disease-free survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Br J Cancer 90: 471-475 (2004)

54) Mhawech P, Herrmann F, Coassin M, Guillou L, Iselin CE: Motility-related protein 1 (MRP-1/CD9) expression in urothelial bladder carcinoma and its relation to tumor recurrence and progression. Cancer 98: 1649-1657 (2003)

55) Miyake M, Adachi M, Huang C, Higashiyama M, Kodama K, Taki T: A novel molecular staging protocol for non-small cell lung cancer. Oncogene 18: 2397-2404 (1999)

56) Miyake M, Nakano K, Itoi SI, Koh T, Taki T: Motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) reduction as a factor of poor prognosis in breast cancer. Cancer Res 56: 1244-1249 (1996)

57) Miyake M, Nakano K, Ieki Y, Adachi M, Huang CL, Itoi S, Koh T, Taki T: Motility related protein 1 (MRP-1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. Cancer Res 55: 4127-4131 (1995)

58) Miyamoto S, Maruyama A, Okugawa K, Akazawa K, Baba H, Maehara Y, Mekada E: Loss of motility-related protein 1 (MRP1/CD9) and integrin alpha3 expression in endometrial cancers. Cancer 91: 542-548 (2001)

59) Mori M, Mimori K, Shiraishi T, Haraguchi M, Ueo H, Barnard GF, Akiyoshi T: Motility related protein 1 (MRP1/CD9) expression in colon cancer. Clin Cancer Res 4: 1507-1510 (1998)

60) Morin PJ: Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. Cancer Res 65: 9603-9606 (2005)

61) Murayama Y, Miyagawa J, Shinomura Y, Kanayama S, Isozaki K, Yamamori K, Mizuno H, Ishiguro S, Kiyohara T, Miyazaki Y, Taniguchi N, Higashiyama S, Matsuzawa Y: Significance of the association between heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and CD9 in human gastric cancer. Int J Cancer 98: 505-513 (2002)

62) Nees M, van Wijngaarden E, Bakos E, Schneider A, Dürst M: Identification of novel molecular markers which correlate with HPV-induced tumor progression. Oncogene 16: 2447-2458 (1998)

63) Nishidate T, Katagiri T, Lin ML, Mano Y, Miki Y, Kasumi F, Yoshimoto M, Tsunoda T, Hirata K, Nakamura Y: Genome-wide gene-expression profiles of breast-cancer cells purified with laser microbeam microdissection: identification of genes associated with progression and metastasis. Int J Oncol 25: 797-819 (2004)

64) Ohno H, Aguilar RC, Yeh D, Taura D, Saito T, Bonifacino JS: The medium subunits of adaptor complexes recognize distinct but overlapping sets of tyrosine-based sorting signals. J Biol Chem 273: 25915-25921 (1998)

65) Ohno H, Fournier MC, Poy G, Bonifacino JS: Structural determinants of interaction of tyrosine-based sorting signals with the adaptor medium chains. J Biol Chem 271: 29009-29015 (1996)

66) Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 55: 74-108 (2005)

67) Parodi AJ: Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glykoprotein folding and degradation. Biochem J 348: 1-13 (2000)

68) Rohrer J, Schweizer A, Russell D, Kornfeld S: The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. J Cell Biol 132: 565-576 (1996)

69) Ross AH, Dietzschold B, Jackson DM, Earley JJ Jr, Ghrist BD, Atkinson B, Koprowski H: Isolation and amino terminal sequencing of a novel melanoma-associated antigen. Arch Biochem Biophys 242: 540-548 (1985)

70) Rous BA, Reaves BJ, Ihrke G, Briggs JA, Gray SR, Stephens DJ, Banting G, Luzio JP: Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. Mol Biol Cell 13: 1071-1082 (2002)

71) Rubinstein E, Poindessous-Jazat V, Le Naour F, Billard M, Boucheix C: CD9, but not other tetraspans, associates with the beta1 integrin precursor. Eur J Immunol 27: 1919-1927 (1997)

72) Ruddock LW, Molinari M: N-glycan processing in ER quality control. J Cell Sci 119: 4373-4380 (2006)

73) Ryu B, Jones J, Blades NJ, Parmigiani G, Hollingsworth MA, Hruban RH, Kern SE: Relationships and differentially expressed genes among pancreatic cancers examined by large-scale serial analysis of gene expression. Cancer Res 62: 819-826 (2002)

74) Ryu F, Takahashi T, Nakamura K, Takahashi Y, Kobayashi T, Shida S, Kameyama T, Mekada E: Domain analysis of the tetraspanins: studies of CD9/CD63 chimeric molecules on subcellular localization and upregulation activity for diphtheria toxin binding. Cell Struct Funct 25: 317-327 (2000)

75) Sakamoto K, Nakamura Y, Nakashima T: Immunohistochemical distribution of CD9 in parotid gland tumors. Auris Nasus Larynx 31: 49-55 (2004)

76) Santin AD, Zhan F, Bellone S, Palmieri M, Cane S, Bignotti E, Anfossi S, Gokden M, Dunn D, Roman JJ, O'Brien TJ, Tian E, Cannon MJ, Shaughnessy J Jr, Pecorelli S: Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular

markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. Int J Cancer 112: 14-25 (2004)

77) Sauer B: Site-specific recombination: developments and applications. Curr Opin Biotechnol 5: 521-527 (1994)

78) Sauer G, Windisch J, Kurzeder C, Heilmann V, Kreienberg R, Deissler H: Progression of cervical carcinomas is associated with down-regulation of CD9 but strong local re-expression at sites of transendothelial invasion. Clin Cancer Res 9: 6426-6431 (2003)

79) Sauer G, Kurzeder C, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, Deissler H: Expression of tetraspanin adaptor proteins below defined threshold values is associated with in vitro invasiveness of mammary carcinoma cells. Oncol Rep 10: 405-410 (2003)

80) Seehafer JG, Tang SC, Slupsky JR, Shaw AR: The functional glykoprotein CD9 is variably acylated: localization of the variably acylated region to a membrane-associated peptide containing the binding site for the agonistic monoclonal antibody 50H.19. Biochim Biophys Acta 957: 399-410 (1988)

81) Serru V, Dessen P, Boucheix C, Rubinstein E: Sequence and expression of seven new tetraspans. Biochim Biophys Acta 1478: 159-163 (2000)

82) Seymour L, Bezwoda WR, Meyer K: Tumor factors predicting for prognosis in metastatic breast cancer. The presence of P24 predicts for response to treatment and duration of survival. Cancer 66: 2390-2394 (1990)

83) Shimada Y, Imamura M, Watanabe G, Uchida S, Harada H, Makino T, Kano M: Prognostic factors of oesophageal squamous cell carcinoma from the perspective of molecular biology. Br J Cancer 80: 1281-1288 (1999)

84) Sho M, Adachi M, Taki T, Hashida H, Konishi T, Huang CL, Ikeda N, Nakajima Y, Kanehiro H, Hisanaga M, Nakano H, Miyake M: Transmembrane 4

superfamily as a prognostic factor in pancreatic cancer. Int J Cancer 79: 509-516 (1998)

85) Si Z, Hersey P: Expression of the neuroglandular antigen and analogues in melanoma. CD9 expression appears inversely related to metastatic potential of melanoma. Int J Cancer 54: 37-43 (1993)

86) Szala S, Kasai Y, Steplewski Z, Rodeck U, Koprowski H, Linnenbach AJ: Molecular cloning of cDNA for the human tumor-associated antigen CO-029 and identification of related transmembrane antigens. Proc Natl Acad Sci USA 87: 6833-6837 (1990)

87) Todd SC, Doctor VS, Levy S: Sequences and expression of six new members of the tetraspanin/TM4SF family. Biochim Biophys Acta 1399: 101-104 (1998)

88) Tokuhara T, Hasegawa H, Hattori N, Ishida H, Taki T, Tachibana S, Sasaki S, Miyake M: Clinical significance of CD151 gene expression in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 7: 4109-4114 (2001)

89) Tropea JE, Kaushal GP, Pastuszak I, Mitchell M, Aoyagi T, Molyneux RJ, Elbein AD: Mannostatin A, a new glykoprotein-processing inhibitor. Biochemistry 29: 10062-10069 (1990)

90) Tu L, Kong XP, Sun TT, Kreibich G: Integrity of all four transmembrane domains of the tetraspanin uroplakin Ib is required for its exit from the ER. J Cell Sci 119: 5077-5086 (2006)

91) Tu L, Sun TT, Kreibich G: Specific heterodimer formation is a prerequisite for uroplakins to exit from the endoplasmic reticulum. Mol Biol Cell 13: 4221-4230 (2002)

92) Uchida S, Shimada Y, Watanabe G, Li ZG, Hong T, Miyake M, Imamura M: Motility-related protein (MRP-1/CD9) and KAI1/CD82 expression inversely

correlate with lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma. Br J Cancer 79: 1168-1173 (1999)

93) Vagin O, Turdikulova S, Sachs G: The H,K-ATPase beta subunit as a model to study the role of N-glykosylation in membrane trafficking and apical sorting. J Biol Chem 279: 39026-39034 (2004)

94) Wolfahrt S: (2006 persönliche Mitteilung)

95) Wollscheid V, Kuhne-Heid R, Stein I, Jansen L, Kollner S, Schneider A, Dürst M: Identification of a new proliferation-associated protein NET-1/C4.8 characteristic for a subset of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinomas. Int J Cancer 99: 771-775 (2002)

96) Xu J, Stolk JA, Zhang X, Silva SJ, Houghton RL, Matsumura M, Vedvick TS, Leslie KB, Badaro R, Reed SG: Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray. Cancer Res 60: 1677-1682 (2000)

97) Yamamoto Y, Grubisic K, Oelgeschlager M: Xenopus Tetraspanin-1 regulates gastrulation movements and neural differentiation in the early Xenopus embryo. Differentiation 75: 235-245 (2007)

Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die zum Erfolg der vorliegenden Arbeit beigetragen haben. Besonderer Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. Kreienberg für die Bereitstellung eines Laborplatzes im Endokrinologischen und Onkologischen Labor der Frauenklinik,
- Frau Prof. Dr. Lang für die Übernahme der Zweitkorrektur der Arbeit,
- Jasmin Windisch für den technischen Rat und Beistand, für ihr Durchsetzungsvermögen bei der Anschaffung des FlashGel-Systems und für die zur Verfügung gestellten Markerproteine,
- Dr. Christian Kurzeder für Rat und Diskussionsbereitschaft,
- PD Dr. Georg Sauer für Diskussionen und politische Entscheidungshilfen,
- in besonderem Maße PD Dr. Helmut Deißler für die fachlich überaus kompetente Betreuung, das offene Ohr für ständige wissenschaftliche Spekulationen, den Perfektionismus bei der Korrektur der Dissertation und für die Rücksicht auf private Umstände,
- am meisten jedoch danke ich meiner geliebten Lebensgefährtin Heike ganz besonders dafür, dass sie mich, trotz mancher Meinungsverschiedenheiten bezüglich der Promotion, immer uneingeschränkt unterstützt hat. Dafür, dass sie ihre eigenen Ziele immer zurückgesteckt hat, um mir die angestrebte Karriere zu ermöglichen, auf deren Verfolgung sie sich u.a. wegen der Betreuung unserer beiden gemeinsamen Kinder nie vollkommen konzentrieren konnte.