

**Murine Clara-Zelllinien aus transgenen Mäusen
als *in vitro*-Modell für die humane
Lungen-Adenokarzinogenese –
Studien zu Synergien von Onko- und
Tumorsuppressorgenen *in vivo***

Von dem Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl. Biol. Philipp W. Wabnitz

geboren am 31. März 1972 in Aachen

2001

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut der Fraunhofer-Gesellschaft für Toxikologie und Aerosolforschung, Abteilung Zellbiologie, und in der Firma Ingenium Pharmaceuticals AG, Martinsried, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. D. Paul angefertigt.

Referent: Prof. Dr. W. Müller
Korreferent: Prof. Dr. D. Paul

Tag der Promotion: 16.02.2001

Meinen Eltern

ZUSAMMENFASSUNG

Adenokarzinome der Lunge bilden ca. 25% der Nicht-Kleinzell-Karzinome (Non-Small-Cell-Lung-Carcinomas; NSCLC) beim Menschen. Seinen Ursprung hat dieser Karzinom-Typ in epithelialen, nicht-zilientragenden alveolären Typ II- und bronchiolären Clara-Zellen. Die Untersuchung von Frühstadien dieser Tumore am Menschen ist kaum möglich, da Lungentumore meist erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert werden. Mit Hilfe transgener Mausmodelle, die unter der Kontrolle Zelltyp-spezifischer Promotoren die Onkogene c-myc, EGF und CyclinD1 in Clara- und Typ II-Zellen exprimieren, sollten Erkenntnisse über den molekulargenetischen Hintergrund von Initiation und Promotion von Adenokarzinomen *in vivo* und *in vitro* gewonnen, und Clara-Zelllinien für *in vitro*-Studien etabliert werden.

Um den Einfluß synergistischer Effekte genetischer Deregulationen bei der Entwicklung dieser Tumore zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Pathogenese mehrfach transgener Tiere analysiert. Hierdurch wurde gezeigt, daß insbesondere die Überexpression der Onkogene Cyclin D1 und IgEGF unter der Kontrolle des Clara-Zell-spezifischen Uteroglobulin (Ug)-Promotors zu einer signifikanten Verkürzung der Lebenserwartung von transgenen Mäusen führt und mit pathogenen Veränderungen der Lungen einherging. Daraus läßt sich ein synergistischer Effekt dieser beiden Onkogene bei der Promotion von Adenokarzinomen ableiten.

Daneben wurden Clara-Zelllinien verschiedener Differenzierungsstadien aus Ug-SV40 TAg-transgenen Mäusen etabliert und charakterisiert, um sie als *in vitro* System für toxikologische und Karzinogenese-Studien verfügbar zu machen. Erstmals ist es hierbei gelungen, murine Clara-Zelllinien zu etablieren, die auch in hohen Passagen eine Vielzahl spezifischer Differenzierungsmarker exprimieren und verschiedene Transformationsstadien aufweisen. In diesen wurde mittels cDNA-Array-Technologie die Expression von über 80 Tumor-relevanten Genen analysiert. Dabei wurde die Deregulation von Genen wie z.B. HGF, TGF alpha und TGF beta, e-cadherin und c-myc nachgewiesen und die Beteiligung von HGF an der malignen Entartung der Zelllinie MBECL 5/A postuliert. Die Deregulation dieser Kandidatengene ist in der Literatur für humane Adenokarzinome der Lunge bereits beschrieben. Hierdurch wurde die Relevanz der etablierten murinen Clara-Zelllinien als *in vitro*-Modell für die Erforschung der humanen Adenokarzinogenese nachgewiesen. **Stichworte: Lungenkarzinome, transgene Mäuse, Clara-Zellen**

ABSTRACT

It is estimated that about 25 % of all human lung adenocarcinomas are Non-Small-Cell-Lung-Carcinomas (NSCLC). This type of carcinomas originates from epithelial, non-ciliated alveolar Type II (ATII) and bronchiolar Clara cells. Examination of human early stage-tumors is almost impossible because human lung carcinoma usually are diagnosed only at late stages of tumor development. By use of transgenic mouse models, which do express the oncogenes c-myc, EGF and cyclin D1 under control of ATII and Clara cell specific promoters, the molecular background of adenocarcinoma initiation and promotion was examined *in vivo* and *in vitro*. Apart from that clara cell lines were established for *in vitro*-studies.

To examine synergistic effects of genetic deregulations on tumor development, the pathogenesis was analyzed in multi-transgenic mice. Results have shown that particularly the overexpression of cyclin D1 and IgEGF-oncogenes under control of the Clara cell-specific uteroglobin (Ug) promotor led to a significant shortage of double-transgenic mice lifespan and correlated with pathogenic alterations of lung epithelia. These data demonstrated a synergistic effect resulting from cooperation of these oncogenes in adenocarcinoma promotion.

Apart from that Clara cell lines at different stages of differentiation have been established from Ug-SV40 Tag-transgenic mice. These cell lines were characterized to make them available as a cell system for toxicological and carcinogenesis studies. For the first time murine Clara cell lines in different stages of cellular transformation have been established which even in higher passages showed expression of a large number of differentiation markers. By use of cDNA-array technology these cell lines were analyzed for the expression of about 80 tumor relevant genes. These experiments showed a deregulation of the HGF, TGFalpha and beta, e-cadherin and c-myc genes, and led to the conclusion that HGF plays a significant role in the invasiveness of Mouse Bronchiolar Epithelial Cell Line (MBECL) 5/A. The deregulation of these candidate genes was previously shown to be overexpressed in human lung adenocarcinomas, which confirms the relevance of these murine Clara cells as an appropriate model for the examination of human adenocarcinogenesis *in vitro*.

Keywords: Lung carcinomas, transgenic mice, Clara cells

INHALTSVERZEICHNIS

I. Abkürzungen

1. Einleitung	1
1.1 Die Lunge	1
1.1.1 <i>Das Lungen-Surfactant</i>	2
1.1.2 <i>Die Alveolar Typ II –Zelle</i>	3
1.1.3 <i>Die Clara-Zelle</i>	3
1.2 Lungenkarzinome	4
1.2.1 <i>Zellzyklus und Apoptose</i>	5
1.2.2 <i>Tumorentstehung</i>	7
1.3 Tier- und <i>in vitro</i> Modelle	9
1.4 Ziele der Arbeit	10
2. Material und Methoden	12
2.1 Materialien	12
2.1.1 Geräte	12
2.1.2 <i>Chemikalien und Verbrauchsmaterial</i>	13
2.1.3 <i>Antikörper</i>	14
2.1.4 <i>Enzyme</i>	14
2.1.5 <i>Oligonukleotide, Plasmide</i>	14
2.1.6 <i>Wachstumsfaktoren</i>	16
2.1.7 <i>Bakterien</i>	16
2.1.8 <i>Mausstämme</i>	16
2.1.9 <i>Zellkulturmedien</i>	16
2.1.10 <i>Bakterienkulturmedien, Puffer</i>	18
2.2 Methoden	21
2.2.1 <i>Arbeiten mit Nukleinsäuren</i>	21
2.2.1.1 <i>Fällung von Nukleinsäuren</i>	21
2.2.1.2 <i>Konzentrationsbestimmung durch OD-Messung</i>	21
2.2.1.3 <i>Amplifikation von cDNA-Fragmenten durch PCR</i>	22
2.2.1.4 <i>Gelelektrophorese von DNA</i>	22
2.2.1.5 <i>Gelelektrophorese von RNA</i>	22
2.2.1.6 <i>Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	23
2.2.1.7 <i>Ligation von PCR-Produkten in Vektoren</i>	23
2.2.1.8 <i>Transformation von kompetenten Zellen</i>	23
2.2.1.9 <i>Blau-Weiß-Selektion</i>	23
2.2.1.10 <i>Minipräparation von Plasmid-DNA</i>	23
2.2.1.11 <i>Maxipräparation von Plasmid-DNA</i>	24
2.2.1.12 <i>Restriktionsverdau von DNA</i>	25
2.2.1.13 <i>Isolation genomischer DNA</i>	25
2.2.1.14 <i>Isolation von RNA</i>	26

2.2.1.15 Southern Blot-Analyse	26
2.2.1.16 Radioaktive Markierung einer genspezifischen Sonde	26
2.2.1.17 Sequenzierung von cDNA	27
2.2.2 <i>Expressionsnachweise</i>	27
2.2.2.1 Reverse Transkriptase-Reaktion	27
2.2.2.2 Northern Blot-Analyse	27
2.2.2.3 cDNA-Arrays	28
2.2.3 <i>Arbeiten mit Proteinen</i>	29
2.2.3.1 Isolation von Proteinen	29
2.2.3.2 Western-Blot	30
2.2.4 <i>Zellbiologische Methoden</i>	30
2.2.4.1 Isolation von primären Lungenzellen aus Mäusen	30
2.2.4.2 Allgemeine Zellkultur-Techniken	31
2.2.4.3 Histologische Färbungen	32
2.2.4.4 Chromosomenanalyse	32
2.2.4.5 Fixierung und Einbettung von Gewebe	32
2.2.4.6 Adhäsionsunabhängiges Wachstum – Tumorigenität	33
2.2.4.7 Proliferationsanalysen	33
2.2.4.8 Einfluß von Wachstumsfaktoren auf das Zellwachstum	34
2.2.5 <i>Morphologische Untersuchungen</i>	34
2.2.6 <i>Identifikation differentiell exprimierter Gene</i>	34
2.2.6.1 Quantifizierung	39
2.2.6.2 Qualitätskontrolle	40
2.2.6.3 Auswertung	40
3. Ergebnisse	41
3.1 Die Rolle synergistischer Effekte von Onkogenen und des Tumorsuppressors p53 bei der murinen Adenokarzinogenese	41
3.1.1 <i>Lebensalter c-Myc / EGF doppelt-transgener Mäuse</i>	42
3.1.2 <i>Pathologie c-Myc / EGF doppelt-transgener Mäuse</i>	44
3.1.3 <i>Lebensalter CycD1 / c-Myc bzw. EGF doppelt-transgener Mäuse</i>	45
3.1.4 <i>Pathologie CycD1 / c-Myc bzw. EGF doppelt-transgener Mäuse</i>	46
3.1.5 <i>Rolle von p53-Defizienz in der Lungenkarzinogenese mehrfach-transgener Mäusen</i>	46
3.1.6 <i>Pathologie von p53-defizienten transgenen Mäusen</i>	48
3.1.7 <i>Zusammenfassung</i>	48
3.2 Etablierung und Charakterisierung einer Clara Zelllinie	50
3.2.1 <i>Etablierte, transgene Zelllinien</i>	51
3.2.2 <i>Morphologie der Zelllinien</i>	52
3.2.3 <i>Histologische Charakterisierung</i>	57
3.2.4 <i>Expression von Differenzierungs-Markern auf RNA-Ebene</i>	58
3.2.5 <i>Proteinexpression von Clara-Zell-Markern</i>	61
3.2.6 <i>Karyotypisierung</i>	63
3.2.7 <i>Proliferationseigenschaften der Zellen <u>in vitro</u></i>	63
3.2.8 <i>Substratkontaktabhängigkeit der Proliferation <u>in vitro</u> und Tumorigenität <u>in vivo</u></i>	67
3.2.9 <i>Histologie der Nacktmaustumoren</i>	69
3.2.10 <i>Differentielle Expression Tumor-relevanter Gene</i>	73

4. Diskussion

4.1 Synergie von Onkogenen bei der Progression von Adenokarzinomen der Lunge	88
4.1.1 Mehrfach-transgene Tiere	88
4.1.2 Rolle des Tumorsuppressors p53	90
4.2 Etablierung von immortalen Clara-Zelllinien	91
4.2.1 Charakterisierung der Zelllinien	92
4.2.2 Identifikation potentiell an der tumorigenen Promotion beteiligter Gene	97
4.3 Ausblick	101
5. Literatur	103

I. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATII	Alveolar Typ II-Zelle
A549	humane Karzinom-Zelllinie (vermtl. mit ATII-Ursprung)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cdk.	cyclin-abhängige Kinase (cyclin-dependent kinase)
cDNA	komplementäre DNA
cm.	Zentimeter
cpm.	radioaktive Zerfälle pro Minute (counts per minute)
cycD1	Cyclin D ₁
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat
dd	didesoxy
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat
DIG	Digoxygenin
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiotreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EGF _R	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (epidermal growth factor receptor)
g	Erdanziehungskraft in g bei Angaben von Zentrifugationen oder Gewichtseinheit in Gramm
h	Stunde(n)
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor (hepatocyte growth factor)
HNF	Hepatischer Nukleärer Faktor
i. d. R.	in der Regel

kBp Kilobasenpaar(e)
kDa Kilo-Dalton
LOH..... Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity)
max..... maximal
MBECL Mouse Bronchiolar Epithelial Cell Line
MCSmultiple cloning site
min..... Minute
mRNA..... messenger Ribonucleic Acid
NCS..... Newborn Calf Serum
NSCLC Non Small Cell Lung Carcinoma
NTP Nukleotidtriphosphat
OD..... optische Dichte
PCR..... Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
RB Retinoblastoma Gen
RNA..... Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
RT..... reverse Transkription
SCLC..... Small Cell Lung Carcinoma
SDS Sodium-Dodecylsulfat
sek..... Sekunde(n)
SP-C Surfactant Protein-C
SSC.....Sodiumcitrate-Sodiumchloride-Puffer
SV40.....Simian Virus 40
Tab. Tabelle
TAg..... T-Antigen
TF Transkriptionsfaktor
TGF Transforming Growth Factor β
TNF..... Tumor Necrosis Factor α
Ug..... Uteroglobulin
ÜN. über Nacht
Upm..... Umdrehungen pro Minute
wt..... Wildtyp
z.B.zum Beispiel

1. Einleitung:

1.1 Die Lunge

Die Lunge des Menschen gliedert sich in zwei Lungenflügel, welche jeweils über eine Hauptbronchie mit der Trachea verbunden sind. Der rechte Lungenflügel setzt sich aus drei, der linke aus zwei Lungenlappen zusammen (McLauphlin *et al.*, 1961). Ausgehend von der Trachea verzweigt sich die innere Struktur der Lunge immer weiter in die Bronchien und weiter in die nicht-respiratorischen Bronchioli. Diese verzweigen sich wiederum zu den respiratorischen Bronchioli (Bronchioli respiratorii; $\varnothing < 1\text{mm}$) und den Teilen des Alveolarbaumes, der die säckchenartigen blinden Endigungen der Bronchioli bildet und dessen Oberfläche den größten Teil des Atmungsorgans ausmacht (s. Abb. 1.1).

Im Gegensatz zum mehrschichtigen, bis hin zu den nicht-respiratorischen Bronchioli vornehmlich mit zilientragenden Zellen ausgestatteten Epithel der Bronchien, sind die Bronchioli respiratorii ebenso wie das Alveolarsystem mit einem einschichtigen Epithel ausgekleidet. Während sich jedoch das Alveolarepithel aus lediglich zwei verschiedenen Zelltypen (Alveolar Typ I- und Typ II-Zellen) zusammensetzt, finden sich im bronchialen und bronchiolären Epithel in speziesabhängiger Verteilung verschiedene Zelltypen, wie z.B. zilientragende, Clara-, Neuroendokrin- und Bürstenzellen (Plopper, 1983).

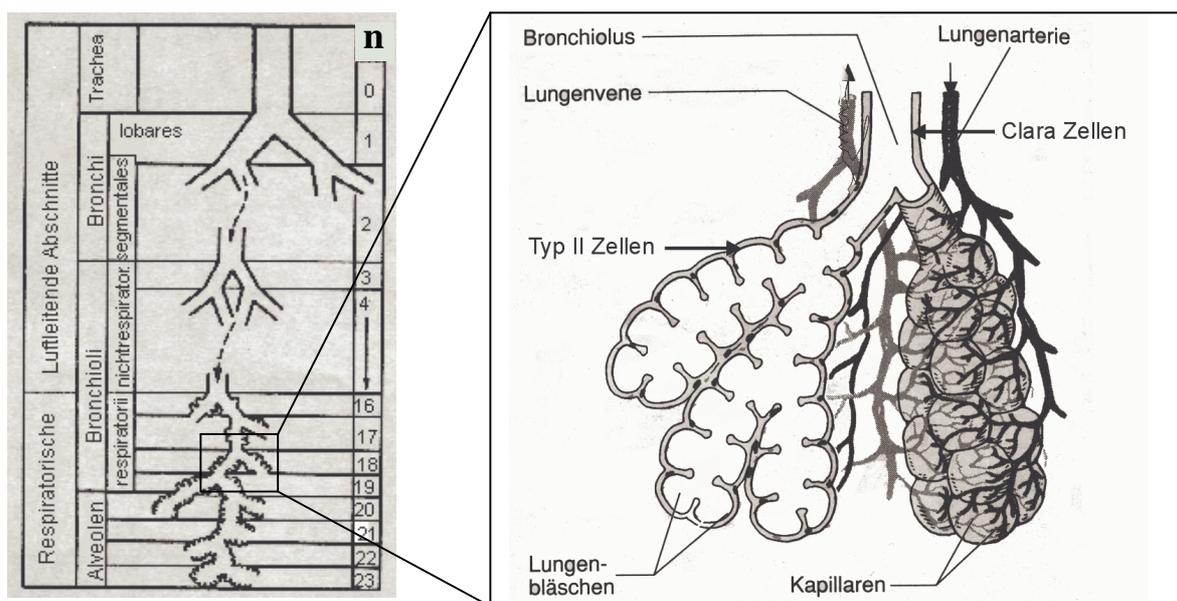


Abb. 1.1 – Verzweigung des Atmungssystems und Alveolar-Säckchen mit terminalen Bronchiolen: Lokalisation von Clara- und Alveolar Typ II Zellen im Lungen-Epithel (teilweise nach Morgan und Harkema). n = Verzweigungsgeneration des Bronchialsystems.

Nach Darm und Haut besitzt die Lunge die größte epitheliale Oberfläche (100-140m²) des menschlichen Organismus. Diese ermöglicht ihr, ihre respiratorische Funktion effizient wahrzunehmen. Das Zusammenspiel von großer epithelialer Oberfläche, hoher Oxygenierung und der Präsenz bioaktivierender Enzymsysteme (Cytochrom P450-Oxygenasen) in Zellen des Epithels macht die Lunge aber auch zum Zielorgan für zahlreiche pathogene und toxische Umwelteinflüsse (Smith und Brian, 1991), zu denen natürliche Substanzen ebenso zu zählen sind wie z.B. auch Tabakrauch und Herbizide.

Geschützt wird die epitheliale Oberfläche der Alveolen und Bronchiolen von dem sogenannten Lungen-Surfactant, das eine Rolle bei der Herabsetzung der Oberflächenspannung des bronchioloalveolären Epithels und der Immunabwehr spielt (Dong und Wright, 1998; Tenner *et al.*, 1989).

1.1.1 Das Lungen-Surfactant

Das Lungen-Surfactant setzt sich aus einem Proteinphospholipidfilm zusammen, der zu 90% aus Lipiden (hauptsächlich Lecithin) und zu 10 % aus Proteinen (Weaver *et al.*, 1991) besteht. Dieser trägt durch Herabsetzung der Oberflächenspannung des bronchiolo-alveolären Epithels dazu bei, einen Kollaps der Lunge zu verhindern und wird mit einer Halbwertszeit von 14-24 h ständig erneuert. Die assoziierten Surfactant Proteine- (SP-) A, B, C und D erfüllen verschiedene Funktionen. Sie bestimmen die biophysikalischen Eigenschaften des Surfactants (Yu *et al.*, 1988) und regulieren die Sekretion von Surfactant-Phospholipiden (Kuroki *et al.*, 1988). SP-A und SP-D spielen darüber hinaus eine Rolle in der Immunabwehr (Dong Q. und Wright J.R. 1998; Tenner *et al.*, 1989).

Surfactant Proteine werden nicht nur in der Lunge sondern, wie z.B. SP-C und -D, auch in der Niere exprimiert (Wang *et al.*, 1994; Motwani *et al.*, 1995). In den Organen werden die Surfactant Proteine aber Zelltyp-spezifisch gebildet. So gilt SP-C als spezifischer Marker für Alveolar Typ II (AT II)-Zellen, SP-A, -B und -D werden als Marker von AT II und Clara-Zellen beschrieben. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, den Promotor des SP-C in Transgen-Konstrukten spezifisch zu nutzen, um die Expression von Transgenen in AT II-Zellen zu dirigieren.

1.1.2 Die Alveolar Typ II - Zelle

Als Produzenten des Lungen-Surfactants sind unter anderem Alveolar Typ II - Zellen (AT II) beschrieben (Kawada *et al.*, 1989). Sie finden sich im alveolären Epithel der Lunge und haben eine rundliche bis kubische Form. Neben den Typ I - Pneumozyten bilden sie 50% des alveolären Epithels und sekretieren Bestandteile des Surfactant, welches von den Typ I - Pneumozyten durch Endozytose abgebaut wird.

Neben den alveolären AT II-Zellen wird häufig auch die bronchioläre Clara-Zelle als Syntheseort von Surfactant Proteinen beschrieben (Dong und Wright, 1998; Crouch *et al.*, 1992).

1.1.3 Die Clara-Zelle

Das Epithel der Säuger-Bronchiolen wird u.a. von nicht-zilientragenden Zellen, den Clara-Zellen, ausgekleidet, die wiederum von zilientragenden Zellen und Bürstenzellen umgeben sind. Ihr prozentualer Anteil am Gesamtepithel ist ebenso wie ihre Lokalisation im Bronchiolar-System speziesabhängig. Während Clara-Zellen bei der Maus auch in den Bronchien und sogar in der Trachea nachgewiesen werden konnten, liegen sie dort beim Menschen nicht vor (Plopper, 1983; Widdicombe und Pack, 1982). Ausgeprägte inter-spezies aber auch intra-individuelle Unterschiede der Zellmorphologie, deren Bedeutung unbekannt ist, deuten darauf hin, daß es sich bei den Clara-Zellen nicht um einen einheitlichen Zelltyp, sondern möglicherweise um eine Gruppe von Zellen handelt. Diese zeichnet sich *in situ* u.a. durch eine starke Vorwölbung ihrer apikalen Region in das bronchioläre Lumen und fehlende Zilien aus, weshalb sie oft auch als „nicht-zilientragende Zellen des bronchiolären Epithels“ beschrieben werden (Pankow, *et al.* 1989; Widdicombe und Pack, 1982).

Die Funktion der Clara-Zellen, die erstmals von Kölliker und später ausführlicher von Clara (Clara, 1937) beschrieben wurde, ist im einzelnen noch immer nicht vollständig geklärt. Allgemein werden Clara-Zellen mehrere wichtige, darunter sekretorische Funktionen (Dong und Wright, 1998) zugeschrieben. Sie sind offenbar wie die AT II - Zellen durch Sekretion von Surfactant Proteinen (SP-A, -B und -D) am Aufbau des Lungen-Surfactants beteiligt.

Clara-Zellen sind darüber hinaus spezifische Produzenten eines Uteroglobinhomologen Proteins, das in der Literatur unter verschiedenen Synonymen

Erwähnung findet. Es handelt sich um ein 16 kd großes Homodimer, das vor oxidativem Streß schützt (Mango, *et al.*, 1998). Gebräuchliche Bezeichnungen hierfür sind vor allem Clara Cell 10kd-Protein (CC10kd) und Clara Cell Secretory Protein (CCSP) aber auch CC17 und RLL (Reynolds, *et al.*, 2000; Sawaya, *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1993). Die Expression von CC10kd wird, anders als die der Surfactant Proteine-A und-B, welche auch in AT II-Zellen exprimiert werden, als spezifischer Differenzierungsmarker für Clara-Zellen betrachtet. Der Uteroglobin (CC10kd)-Promotor kann daher für die Clara-Zell-spezifische Expression von Transgenen eingesetzt werden (Sandmöller *et al.*, 1994).

Außerdem wurde ihnen eine hohe bioaktivierende Kapazität nachgewiesen, die auf der Expression Cytochrom-P450-Monooxygenasen basiert. Diese P450-Systeme sind am Abbau von Fettsäuren ebenso beteiligt, wie an der Metabolisierung und der damit einhergehende Aktivierung von Xenobiotika zu teilweise zytotoxischen Substanzen (Fanucchi *et al.*, 1997; Aida *et al.*, 1992). Die aus der spezifischen Enzymaktivität der Cytochrom P450-Monooxygenasen resultierende, selektive Schädigung von Clara-Zellen durch Umweltgifte (Devereux, 1984) wird, wie auch ihre nachgewiesene Proliferationsfähigkeit (Pankow *et al.*, 1989), dafür verantwortlich gemacht, daß Clara-Zellen häufig Ausgangszellen bronchiogener Adenokarzinome sind (Boyd *et al.*, 1984), die auch durch chemische Karzinogene induziert werden können (Walker *et al.*, 1989).

1.2 Lungenkarzinome

Karzinome sind Tumore ekto- oder endodermalen Ursprungs und werden histomorphologisch von Sarkomen, die mesodermalen Ursprungs sind, unterschieden.

Pathologisch werden bei Lungenkarzinomen die Non-Small Cell Lung Carcinomas (NSCLC) von den Small Cell Lung Carcinomas (SCLC) getrennt. Hierbei stellen sich die NSCLC als eine heterogene Gruppe von Lungenkarzinomen dar, zu denen Adenokarzinome ebenso, wie 'Large Cell'-Karzinome und 'Squamous Cell'-Karzinome gehören. NSCLC bilden mit 75 % den größten Anteil aller Lungenkarzinome, die wiederum bei Männern den weltweit am häufigsten diagnostizierten Tumortyp ausmachen (Spiro *et al.*, 1988).

Adenokarzinome, Tumore epithelialen Ursprungs, machen dabei 25 % der NSCLC aus (Spiro *et al.*, 1988). Die Diagnose eines Lungen-Adenokarzinoms ist, bei Operation und anschließender Chemotherapie, mit einer Prognose von fünf Jahren mittlerer Lebenserwartung verbunden (Wiethöge *et al.*, 1994). Das Adenokarzinom entwickelt sich aus Alveolar Typ II-Zellen (solide Tumore) oder Clara-Zellen (papilläre Tumore) des alveolären bzw. bronchiolären Lungenepithels und zeigt in der zytologischen Untersuchung sehr große Zellen mit mukösen Vakuolen und großen Zellkernen.

Die Entwicklung eines Adenokarzinoms durchläuft mehrere Stadien, von der Hyperplasie (mehrschichtiges Epithel) über das Adenom und das Karzinom zum metastasierenden Karzinom (Malkinson, 1998). Ausgang eines Karzinoms ist dabei immer eine einzelne Zelle, deren Programme zur Zellteilung im Zellzyklus, bzw. zur Apoptose (s. 1.2.1) abnorm reguliert sind.

1.2.1 Zellzyklus und Apoptose

Teilungsfähige somatische Zellen können aus einem ruhenden Zustand, der G₀-Phase, in ein Programm sequentieller, die DNA-Synthese und den Mitose-Prozeß durchlaufender Schritte, den sogenannten Zellzyklus, eintreten. Der Zellzyklus wird durch komplexe intrazelluläre Prozesse an verschiedenen Kontrollpunkten reguliert, nach deren Passage der Zellzyklus jedoch von äußeren Einflüssen unabhängig voranschreitet.

Die wesentlichen Effektoren dieser Regulation stellen Komplexe aus Zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs) und den sie aktivierenden Zyklinen dar. Sie werden durch eine Vielzahl positiver und negativer 'Feedback'-Schleifen kontrolliert. Spezifische Zyklin-Kinase-Komplexe sind für definierte Phasen des Zellzyklus charakteristisch (z.B. Cyclin D1/Cdk4 für G₁-Phase; CyclinE/Cdk2 für späte G₁-, frühe S-Phase). Die regulatorische Wirkung dieser Zyklin-assoziierten Kinasen besteht in der Phosphorylierung an komplexen Signaltransduktionswegen beteiligter Zielmoleküle, die negative oder positive Regulatoren des Zellzyklus sind. Die Zyklin/Kinase-Komplexe werden ihrerseits ebenfalls durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert.

Das Überschreiten von Kontrollpunkten des Zellzyklus kann durch äußere Faktoren, z.B. durch die Bindung sogenannter Wachstumsfaktoren wie dem Epidermal Growth

Factor (EGF) an Rezeptoren in der Zellmembran, induziert werden. Die Bindung des Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor löst eine komplexe Signaltransduktionskette aus, an der verschiedene intrazelluläre Proteine beteiligt sind und an deren Ende die Aktivierung von Zellzyklus-Effektoren (Cyclin/Cdk) steht (s. Abb. 1.2).

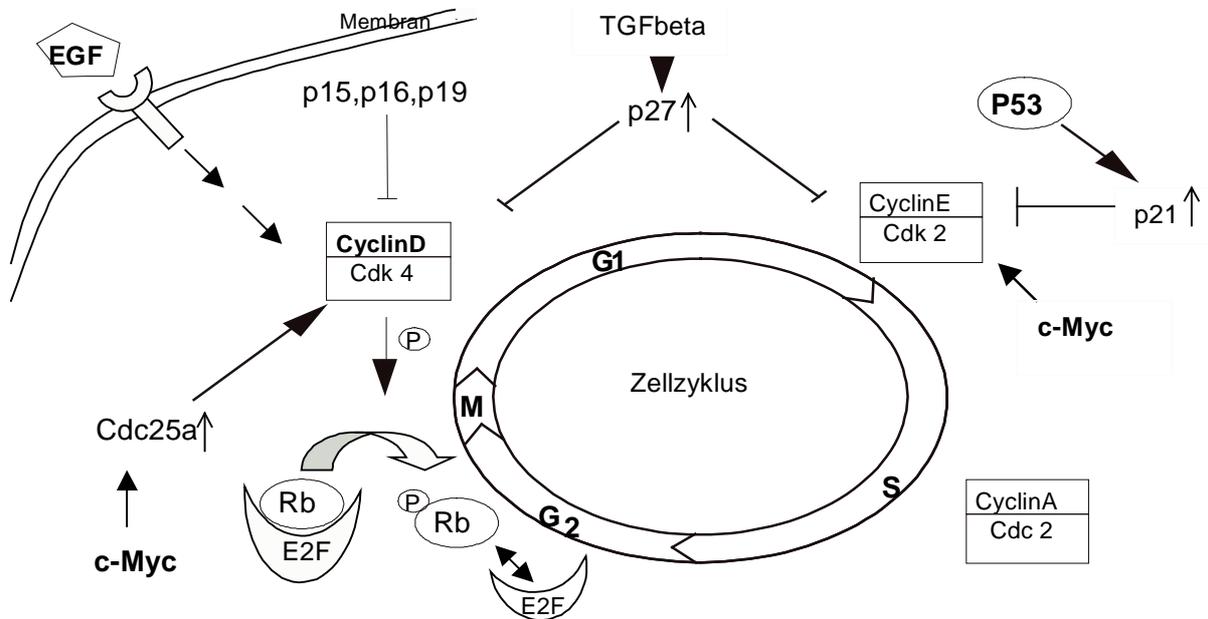


Abb. 1.2 – Regulatoren und Effektoren des Zellzyklus: Das Schema zeigt einige der bekannten Interaktionen zwischen verschiedenen Regulatoren und Effektoren des Zellzyklus, wie z.B. dem Wachstumsfaktor **EGF**, dem Transkriptionsfaktor **c-Myc**, dem **Cyclin D1** und dem Tumorsuppressor **p53**. → induziert, interagiert; ⊥ inhibiert; ↑ hochreguliert; **M, G1, S, G2**: Zellzyklusphasen (nach Bouchard *et al.*, 1998; Chin *et al.*, 1998; Hartwell und Kastan, 1994).

Diese Vorgänge sind in komplexen Wechselwirkungen miteinander verbunden und unterliegen einer strikten Regulation. Gleichzeitig zeigen viele der beteiligten Proteine multifunktionelle Eigenschaften. So können einzelne Regulatoren (z.B. c-Myc) sowohl Proliferations- als auch Apoptose-stimulierend wirken (Bouchard *et al.*, 1998). Der als Apoptose bezeichnete kontrollierte Zelltod wird ebenfalls durch ein intrazelluläres, mit dem Zellzyklus verknüpftes Programm gesteuert und stellt einen intrazellulären Schutzmechanismus vor unkontrollierter Proliferation dar.

Jedes der an der Signaltransduktion vom Liganden an der Zellmembran zum Zellzykluseffektor im Zellkern beteiligten Gene ist ein potentielles Protoonkogen, d.h. ein Protein, dessen Deregulation zur unkontrollierten Proliferation einer Zelle führen kann. Auf Grund dieser Komplexität, sowie der engen Verknüpfung normaler

Proliferation und deren pathologischer Deregulation ist es schwierig, Tumorerkrankungen gezielt zu therapieren.

1.2.2 Tumorentstehung

Normale Zell-Proliferation zeichnet sich durch ein kontrolliertes Gleichgewicht zwischen Teilung und Absterben aus. Gerät dieses Gleichgewicht außer Kontrolle, so kann sich ein Tumor entwickeln.

Tumorzellen unterscheiden sich von normalen Zellen eines Gewebes u.a. durch höhere Zellteilungsraten, Zunahme der Invasivität und abnehmende Sensitivität gegen zytotoxische Pharmaka und den Verlust ihrer Differenzierung, sowie der Fähigkeit zur Apoptose (Hartwell und Kastan, 1994).

Nachdem die Vorstellung über eine genetische Basis von Tumorerkrankungen sich beinahe ein Jahrhundert lang zurückverfolgen läßt, hat sich erst durch die Fortschritte insbesondere auf dem Gebiet der molekularen Genetik, die „Mehr-Schritt“-Hypothese der Karzinogenese auf molekularer Basis entwickelt. Der artifiziellen Einteilung der Tumorphagenese in die Phasen der Initiation, Promotion und Progression (Wiethage *et al.*, 1994; Weinberg, 1989) wird dabei die zeitabhängige, sukzessive Akkumulation mehrerer unabhängiger genetischer Alterationen in einer Zelle bzw. deren Klonen zu Grunde gelegt (Vogelstein und Kinzler, 1993). Demnach nimmt die Wahrscheinlichkeit einer Krebserkrankung proportional mit dem Alter eines Individuums zu (Hartwell und Kastan, 1994). Die Identifizierung von drei Kategorien an tumorigenen Prozessen beteiligter Gene, den Protoonko-, den Reparatur-Mutator- und den Tumorsuppressor- Genen, stützt die Annahme der „Mehr-Schritt“-Karzinogenese. Mutations- und Rekombinationsbedingte Veränderungen in der Expression von Mitgliedern dieser Gen-Familien bringt die Regulation von Wachstum, Zelltod und Differenzierung aus der Balance und können letztlich zur Initiation und Promotion von Tumoren führen. Beispielsweise wurde in humanen Lungentumoren die Überexpression des EGF-Rezeptors, der Transkriptionsfaktoren c-Myc, n-Myc und l-Myc (Wiethage *et al.*, 1994) und des Cyclins D1 (Malkinson, 1998) gezeigt, die zur Gruppe der Protoonkogene gehören.

Protoonkogene (s. 1.1.1) wie z.B. c-myc, cyclin D1 und EGF (s. Abb. 1.2) werden in der Regel durch Mutationen wie Amplifikationen, Translokationen und

Punktmutationen, die einen Funktionsgewinn (‘gain of function’) verursachen, in Onkogene überführt, die den Zellzyklus stimulieren. Diese sind dominant wirksam.

Bei c-myc handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der bei Überexpression das Überspringen des G1-Kontrollpunktes des Zellzyklus induzieren kann (Bouchard *et al.*, 1998).

EGF hingegen ist ein Wachstumsfaktor der auto- oder parakrin mit Rezeptoren in der Zellmembran interagiert und dessen Signalwirkung in der proliferationsfördernden Stimulation der Expression von Cyclinen, wie z.B. Cyclin D1, besteht.

Cyclin D1 selbst interagiert während der G1-Phase des Zellzyklus mit Zyklin-abhängigen Kinasen (cyclin dependent kinase; z.B. CDK4) und aktiviert deren Kinase-Funktion. Dies führt zu einer Phosphorylierung des Retinoblastom-Genproduktes, welches auf diese Weise in seiner Funktion als negativer Regulator des Zellzyklus inaktiviert wird (s. Abb. 1.2).

Die sogenannten Reparatur-Mutator-Gene sind essentiell für die Funktion von DNA-Reparaturmechanismen, die eine korrekte DNA-Replikation und -Rekombination ermöglichen und damit wesentlich zur Stabilität des Genoms beitragen.

Die dritte Gruppe, die Tumorsuppressorgene (z.B. *p53*, *Rb*), die Proliferationssignale negativ regulieren, zeichnen sich in der Regel durch einen Verlust ihrer Funktion (loss of function) aus (s. auch 1.2.4) und werden, wegen des dafür erforderlichen Verlusts von beiden elterlichen Allelen, auch als ‘rezessive Onkogene’ bezeichnet (Bookstein u. Allred, 1993, Weinberg, 1989).

In ca. 50% aller humanen Lungentumoren ist mindestens ein Allel des Tumorsuppressor-Gens *p53* inaktiviert (Wiethage *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1992). Ihm kommt daher eine besondere Bedeutung zu. *p53* wirkt als negativer Regulator des Zellwachstums, aber auch als Transkriptionsfaktor (Harris, 1991). Bestimmte Mutationen können *p53* einerseits einen onkogenen Charakter verleihen, andererseits kann durch Punktmutationen oder Deletionen die Tumorsuppressorfunktion ausgeschaltet werden, wodurch das Wachstum entarteter Zellen begünstigt wird (Cornelisse und Devilee, 1997; Smit *et al.*, 1996).

Besondere Beachtung finden außerdem virale Onkogene, die an der Tumorentstehung auch bei Säugetieren beteiligt sein können. Als Beispiel sei hier das Simian Virus 40 large T - Antigen (SV40-TAg) genannt, welches mit den Genprodukten der *p53*- und *RB*-Tumorsuppressorgene interagiert und diese so

inaktiviert (Lane und Benchimol, 1990). Seine immortalisierende Wirkung wird für die Generierung von Zelllinien genutzt.

1.3 Tier- und *in vitro*-Modelle

Trotz ihrer hohen Komplexität und Individualität weisen Tumorerkrankungen gleichen Typs Ähnlichkeiten auf, die helfen können, therapeutische Ansätze zu finden. Wichtig ist hierbei, die Komplexität des Tumorigenese-Prozesses sowohl in seiner zeitlichen als auch seiner genetischen Dimension aufzuschlüsseln, um Muster in der genetischen Deregulation zu erkennen und kausale von Folgeeffekten der Tumorpromotion zu unterscheiden. Auf Grund ihrer genetischen Individualität ist es erforderlich, eine große Zahl von Tumoren zu untersuchen.

Zugleich unterliegt die Erforschung tumorigener Prozesse im menschlichen Körper einer Restriktion, da Tumormaterial meist nur in Form fortgeschrittener Stadien aus Resektionen zur Verfügung steht und gesundes Gewebe als Kontrollgewebe nur in höchst begrenztem Umfang gewonnen werden kann. Dies erschwert die vergleichende Erforschung zellulärer Prozesse im Verlauf der Tumorigenese am Menschen außerordentlich. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, der Forschung Modellsysteme zur Verfügung zu stellen. Dabei kann es sich um Tiermodelle handeln, die *in vivo* Krankheitsphänotypen des Menschen zu simulieren vermögen oder um *in vitro*-Modelle wie Zellkulturen, die z.B. toxikologische (Forbes, 2000) und genetische Karzinogenese-Studien (Clark *et al.*, 1995) in einem definierten Rahmen ermöglichen. Mit Hilfe dieser Modelle kann die kausale Beteiligung bestimmter Gene an der Entstehung spezifischer Tumortypen validiert und, anders als im Menschen, der Verlauf der „Mehr-Schritt“-Tumorigenese in allen Stadien von Initiation über Promotion und Progression des Tumors studiert werden.

Aus diesem Grund wurden in Vorgänger-Arbeiten transgene Mauslinien etabliert, die spezifisch in der Lunge Onkogen-kodierende Transgene exprimieren.

1.4 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit verfolgt drei Ziele. Zum einen sollen durch die Kreuzung von verschiedenen transgenen Mauslinien, die in Arbeiten von A. Geick und A. Ehrhardt (1998) als Mausmodelle für humane Lungenkarzinome etabliert worden sind, kooperative Effekte verschiedener genetischer Deregulationen gezeigt werden. Durch das Studium des Pathogenese-Verlaufs mehrfach transgener Tiere soll ein Fortschritt im Verständnis der kausalen Zusammenhänge im „multi-step“-Prozess der Karzinogenese erzielt werden.

Für diese Aufgabe stehen transgene Mauslinien zur Verfügung, die unter der Kontrolle des AT II-Zell-spezifischen SP-C-Promotors das Protoonkogen *c-myc* und eine sekretierbare Form (IgEGF) des Wachstumsfaktor EGF überexprimieren (Ehrhardt, 1998). Darüber hinaus war es möglich, Mauslinien zu nutzen, die in Clara-Zellen unter der Kontrolle des (Kaninchen-) Uteroglobulin-Promotors ebenfalls *c-myc* und IgEGF aber auch das Zellzyklus-Gen *Cyclin D1* überexprimieren (Geick, 1998). Der Ug-Promotor ermöglicht eine Clara-Zell-spezifische Expression des jeweiligen Transgens. Alle Transgene sollen außerdem auf ihre Wirkung im genetischen Hintergrund von p53-Knock-Out-Mäusen untersucht werden. Es wird erwartet, daß eine Akkumulation von für humane Tumoren beschriebenen Deregulationen (IgEGF, *c-myc*-Überexpression; p53-Knock-Out) im Mausmodell zu einer beschleunigten Tumorigenese führen wird.

Weiterhin soll ein *in vitro*-Zell-Modell für zytotoxikologische und Karzinogenese-Studien geschaffen werden. Hierfür soll unter Nutzung einer transgenen Mauslinie, die unter Ug-Promotor-Kontrolle das *SV40-TAg* exprimiert (Sandmüller *et al.*, 1994), eine immortale Clara-Zelllinie etabliert werden. Diese soll typische Merkmale von Clara-Zellen aufweisen und auf ihren Differenzierungsgrad hin charakterisiert werden.

Diese Zelllinie soll darüber hinaus für Expressionsanalysen mittels selbst-konstruierter cDNA-Arrays genutzt werden. Zu diesem Zweck wird eine Sammlung von Tumorigenese-relevanten murinen cDNA-Klonen erstellt. Diese soll für die Etablierung eines Membran-gebundenen Array-Systems eingesetzt werden, mit dem die differentielle Expression Tumor-spezifischer Gene in verschiedenen Gewebe- und Zelltypen auf mRNA-Ebene untersucht werden kann.

Folgende Fragestellungen wurden im einzelnen bearbeitet:

- Bewirkt die Akkumulation genetischer Defekte in Form einer gleichzeitigen transgenen Überexpression von IgEGF, c-myc bzw. Cyclin D1, die auch in humanen Lungenkarzinomen beobachtet wird, eine Beschleunigung der Tumorigenese? Welche Rolle spielt darüber hinaus die Deletion von Allelen des Tumorsuppressors p53, insbesondere bei dessen möglicher Zusammenwirkung mit aktivierten Onkogenen?
- Ist es möglich, immortale Zelllinien aus Ug-SV40 large TAg-transgenen Mäusen zu etablieren, die Differenzierungseigenschaften von Clara-Zellen besitzt, d.h. die Expression Zelltyp-spezifischer Markergene aufrechterhält und sich daher als *in vitro*-Modell für toxikologische und genetische Karzinogenese-Studien eignet?
- Welche Gene werden in nicht-tumorigenen im Vergleich zu tumorigenen Zellen differentiell exprimiert? Entsprechen die identifizierten deregulierten Gene denen, die beim Menschen ebenfalls dereguliert vorliegen und kann auf diese Weise die Relevanz des Modells für die humane Karzinogenese bestätigt werden?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

β-Counter	Beckman LS 1801
CO ₂ -Inkubatoren	Heraeus Typ B5060 EK, BB6620, Heraeus; Tritec CO ₂ -Inkubator
Corex-Röhrchen	Corex ^R 30 ml
Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel IKA-Labortechnik
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Safe Lock 0,5 / 1,5 und 2,0 ml Volumen, Eppendorf
Feinwaagen	Sartorius
Filmexpositions-kassetten	Hypercassette, Amersham
Flachbettscanner	Umax Powerlook
Flachgelsystem für	
Agarosegelelektrophorese	Wide Mini Sub TM -Cell, Bio-Rad
Glasfaserfilter	GF/C, Whatman
Glasflaschen mit Drehverschluß	Schott Duran
Gelfotografie	Cybertech CS 1 mit Video Copy Processor (Mitsubishi), Cybertech
Homogenisator Teflon/Glas	Kontex, 30 ml; motorgetrieben mit AEG SBE 400R
Hybridisierungs-Ofen	Typ 7601, GFL
Hybridisierungsflasche	Bachofer, Landgraf
Instant Imager	Canberra Packard
Kühltruhen/-80 °C	Liebherr, Bauknecht und Gesellschaft für Labortechnik (GFL)
Kühlzentrifugen	J2-21M/E, J2-21, Beckman Rotoren: JA 14, JS 13, JA 20, Beckman; Eppendorf-Zentrifuge 5402, Eppendorf
Lyophilisator	Christ, Delta 1-20 KD
Magnetrührer	IKAMAG RH, IKA-Werk, Janke & Kunkel
Mikroskop	Olympus IMT ⁴ mit Kamera OM-4Ti, Olympus
Netzgeräte	PP2 79, V.H-N Electrophorese, Procon (DK) 2303 Multidrive XL, LKB Brommer Electrophorese-Powerpack P24, Biometra
NICK-Säulen	Sephadex G50 DNA-Grade, Pharmacia Biotech
Operationsbesteck	Dimedda, Aesculap
PCR-Gerät	TRIO-Thermblock TB 1, Biometra
PhastSystem TM -Apparatur	Pharmacia Biotech
pH-Meßgerät	Φ32 pH-Meter, Beckman
Photometer	Lambda-2, Perkin-Elmer
Pipetten-Spitzen	Treff-Lab; Comfortips, Eppendorf gestopft: Roth, Biozym
Plastik-Pipetten	25/10/2/1 ml steril, einzeln verpackt, Roth und Flow Laboratories
Plastikröhrchen	15 ml und 50 ml, Nunc
Plastikware für Zellkultur	Nunclon Delta, Nunc
Rasierklingen	NeoLab, 2-7110
Reaktionsgefäßschüttler	Paramix 3, Julabo; Mixer 5432, Eppendorf

Reaktionsgefäßschüttler (heizb.)	Thermomixer 5436, Eppendorf
Reinstwasseranlage	Millipore
Scanner	
Schüttelinkubator	Model G25, New Brunswick Scientific Co. Inc.
Sequenzierapparat	ABI Kapillarsequencer
Slot-Blot-Apparatur	Minifold I, Schleicher & Schüll
Spritzenkanülen	20 G Braun
Sequenzierautomat	ABI Prism™ 310 Genetic Analyser, PE Applied Biosystems
Software	Genepix
Stereomikroskop	Wild M8, Wild Heerbrugg (CH); Zeiss STEMI SV8, Zeiss
Sterilarbeitsbank	M.D.H. Intermed
Sterilfilter	Millipore
thermischer Kauter	MS 6000, Ersa
Tischzentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5415, 5415 C, Eppendorf; Biofuge pico, Heraeus Christ; Zellkulturzentrifuge/Universal, Hettich
Transilluminator	Transilluminator 254/366 nm, Desaga UVT 2020 302 nm, Vilber-Lourmat
Ultraschallgerät	Vibracell, Sonics & Materials Inc.
Vakuum-Ofen	Heraeus, Typ VT 5042 EK
Wasserbad	Temperier-Wasserbad, GFL
Wasserbadschüttler	Julabo U3 + SW
Zentrifugationsgefäße	250 ml, Beckman

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Aldrich, Bayer, Boehringer, Biorad, Difco, Fluka, Gibco-BRL Life Technologies, Merck, Pharmacia-Biotech, Qiagen, Roth, Serva und Sigma bezogen.

Agarose	Gibco-BRL Life Technologies
Blotting-Papier	580x600 mm, Schleicher & Schüll
CSPD, ready to use	Roche #1755633
DNA-Fragmentgrößenmarker	Gibco BRL 100bp, 1 kb ladder, # 15628-050
DNTPs, PCR Grade	Roche, # 1969064
Dokumentation	Röntgenfilm, Kodak Xomat-AR und Amersham Hyperfilm β -Max Biolumineszenz, Kodak und Roche Farbnegativfilme, z. B. Kodak 100HC S/W Negativfilme; Agfa Ortho, Agfa Pan Farbdiafilme: Kodak Ektachrome 160T, Kodak 100HD, Kodak Elite 400
DIG-Chem-Link Labeling Kit	Roche # 1836463
DIG Easy Hyb Puffer	Roche # 1603558
DIG Wash und Block Puffer Set	Roche # 1585762
ECL + Plus	Amersham pharmacia biotech

Fibronectin	Biochrom KG seromed
Kimwipe-Papier	Kodan; Schülke & Mayr
Kollagen-I-Lösung	Sigma
Längenstandard Proteine	Rainbow Full und Low Range; Amersham
LysoTracker Green	Molecular Probes
Multiprime-DNA Labeling	Amersham-Buchler
Membranen	Nylon: Hybond N, Hybond N+; Amersham-Buchler
	PVDF: Immobilon-P; Millipore
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Gibco-BRL Life-Technologies, # 18418-012
³² PdCTP; 10 mCi/ml	Amersham-Buchler
Protein Assay Kit	Bio-Rad, Nr. 500-0001
Qiagen-tip 500	Qiagen, Nr. 10065
Ribonuclease Inhibitor	Gibco BRL Life-Technologies, # 15518-012
RNA-Fragmentgrößenmarker	Gibco BRL 0,24-9,5 kb ladder, # 15620-016
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Nr. 74104
Röntgenfilm	Kodak X-AR
Steril-/Einwegfilter	Membranfilter Typ S CN, 0,2 µm, 0,45 µm, Nalgene oder Millipore; Costar + Nalgene
	Nitrozellulosefilter Typ HA, 0,45 µm, Millipore
Sequencing-Kit	ABI Prism DNA Sequencing Kit Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, PE Applied Biosystems, # 4303152
Template Suppression Reagent	PE Applied Biosystems, # 401674

2.1.3 Antikörper

Anti-Rat-Uteroglobulin	Dr. J. Klug, Universität Marburg
Surfactant Protein-B	Santa Cruz Biotechnology, sc-7704
Surfactant Protein-C	Santa Cruz Biotechnology, sc-7706
Surfactant Protein-D	Santa Cruz Biotechnology, sc-7708
Anti-Goat-IGg-HRP	Santa Cruz Biotechnology, sc-2020

2.1.4 Enzyme

DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	New England Biolabs, # 210S
DNase I, RNase-frei	Roche, # 776785; Sigma EC31211
Eco R I	New England Biolabs, # 101CS
Glycerol	Sigma, G-5516
Multiprime™ -DNA labelling System	Amersham-Buchler
Omniscript RT	Qiagen
PCR-Reaktionspuffer	Amersham-Buchler
PCR-Supremix	Gibco-BRL Life-Technologies, # 10572-014
Superscript II Reverse Transkriptase	Gibco-BRL Life Technologies, # 18053-017

2.1.5 Oligonukleotide, Plasmide

unspezifische Oligonukleotide:	
„Random“ Primer d(N) ₆	New England Biolabs
oligo-(dT) ₁₂₋₁₈	Gibco-BRL

Oligonukleotide für die Charakterisierung der transgenen Mäuse:

	5'	3'
Neo1	CTTGGGTGGAGAGGCTATTC	
Neo2	AGGTGAGATGACAGGAGATC	
SPC Promotor	CAGGGCCAAGGGCTCTGGGGGCTCTCACAG	
SPC myc2	GGACAGGGGGCGGGGTGGGAATCAGCTCACAG	
Ug myc Promotor	CCACCCAAGTCAATGCCCAAGTAAATAATGC	
Ug myc2	CCCCAAATGGGCAGAATAGCCTCCCCG	
EGF2	ATGCGTATTTGTCCAGAGCTTCGATG	
TAg1	CCAAGCAACTCCAGCCATCCATTC	
TAg2	TTGCCAGGTGGGTAAAGGAGCAT	
CycD1 1	GTTCAATTTCCAATCCGCCCTCCATGGTGGC	
CycD1 2	CACCTCCTCCTCCTCCTCTTCTTCCTCCTC	

Oligonukleotide für die Charakterisierung der Zelllinien:

	5'	3'
GAPDH 1	TGCATCCTGCACCACCAACT	
GAPDH 2	AACACGGAAGGCCATGCCAG	
SPA1	CCCTCTTCTTGACTGTTGTTGCTG	
SPA2	TTTCTCCAGGCTCTCCCTTGTC	
SPB1	CCAAAGCCATCTGCAATCATGTAG	
SPB2	AGGGGAATGGGGAGCTGTTG	
SPC1	CTCGGCAGGTCCAGGAGCCAG	
SPC2	CGATGCCAGTGGAGCCGATGG	
SPD1	CAGGACCTATGGGGCTCTCAGG	
SPD2	CAGCCTCTCCTTTAGGACCTGG	
TAg 1	CTTGAAAGGAGTGCCTGGGG	
TAg 2	GAGTCAGCAGTAGCCTCATCATCAC	
CK8 1	AATTGCAGACCCTGGCTGGGAAGC	
CK8 2	AGCTTGCGGTAGGTGGTGTCTCG	
CK17 1	CCGAGATTGGTACCAGAAGCAGG	
CK17 2	CCATCTCCACGTTGATTTGCGC	
CK18 1	CTTGCAGATCGACAATGCCCGCC	
CK18 2	CAGAAGTTCTTCCTTGAGTGCCTCG	
CK19 1	TTGGTGCCACCATTGACAACCTCC	
CK19 2	TTCTTCTTCAGGTAGGCCAGCTCC	
Cyp1A1 1	CCTTCATTGGTCACATGCTGACTG	
Cyp1A1 2	AGGCTATGGAGAAGCTCTTCAGG	
Cyp1A2 1	TGAGGCAGGGAGATGACTTCAAG	
Cyp1A2 2	CATGGCACCAATGACGTTAGC	
Cyp1B1 1	TCTCCAGCTTTTTGCCTGTCAC	
Cyp1B1 2	CCCACTGAGAATATCATCACACTGC	
Cyp2B10 1	CTGTGGTTATGCTGTGTGGAACAG	
Cyp2B10 2	ATGCACTGGAAGAGGAACGTGG	
Cyp4B1 1	GCCTGGACAAGGTGGTAACTTG	
Cyp4B1 2	CACGTACAGAAGATGTCAAAGCTC	
Cyp2F2 1	ACCTGCTGCAGCTTCGCTCCC	
Cyp2F2 2	CACGGGGTCAAAGGGCTTGCC	
Clara10kd1	CGCCATCACAATCACTGTGG	
Clara10kd2	GCTTCATGATGTTTATCCTGG	

Vektoren: PGEM-T Easy Vector System I

Promega, # A1360

2.1.6 Wachstumsfaktoren

Epidermal Growth Factor (human) Progen 63001

Transforming Growth Factor β 1 Sigma T7039

2.1.7 Bakterien

Für Transformationen von Bakterien mit Plasmid-DNA wurden

E. coli DH 5 α Genotyp: F^- , *f80dlacZDM15*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*,

hsdR17(r_K^- , m_K^+), *supE44*, *relA1*, *deoR*,

D(*lacZYA-argF*)U169

2.1.8 Mausstämme

Es wurden Tiere der Hybridlinie CD2-F₁ verwendet, die aus einer Kreuzung der Inzuchtlinien BALBc und DBA/2 (BALBc; DBA/2B) hervorgingen. Die Tiere wurden in einem 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus (6⁰⁰-18⁰⁰ Uhr hell) gehalten.

CD2-F₁ - Harlan/Winkelmann

TRP/p53^{-/-} - Jackson Laboratories

2.1.9 Zellkulturmedien

Wasser:

Das für alle Medienkomponenten verwendete Wasser stammte aus einer Millipore-Filtrationsanlage. Seine Qualität entsprach der von doppelt destilliertem Wasser. Das Wasser wurde vor Verwendung immer autoklaviert.

Serum:

Als Supplement des Mediums wurde i.d.R. Serum in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Das verwendete Serum stammte von neugeborenen Kälbern (NCS, Gibco-BRL).

Zellkulturmedium:

Verwendet wurde MX-83, welches auf dem Medium MX-82 (Hoffmann et al., 1989) basiert und zusätzliche Komponenten enthält.

MX-82 alle Angaben in mg/l:

Aminosäuren		Vitamine	
L-Alanin	18,0	Ascorbinsäure	0,05
L-Asparagin	50,0	p-Aminobenzoesäure	1,0
L-Aspartat	30,0	Biotin	0,2
L-Cystein	50,0	Cholinchlorid	14,0
L-Glutamat	75,0	Glutathion	1,0
L-Glutamin	58,4	Liponsäure	0,2
L-Glycin	100,0	Nicotinamid	4,0

L-Histidin	42,0	Pyridoxal-HCl	4,0
L-Hydroxyprolin	20,0	Riboflavin	0,4
L-Isoleucin	105,0	Natriumpanthothenat	4,3
L-Leucin	105,0	Thiamin-HCl	4,0
L-Lysin	146,0	Cobalamin	0,005
L-Methionin	30,0		
L-Phenylalanin	66,0		
L-Prolin	34,0		
L-Serin	42,0		
L-Threonin	95,0		
L-Tryptophan	16,0		
L-Tyrosin	71,9		
L-Valin	94,0		
Carbohydrate und andere Komponenten		Salze	
Dextrose	4,5	NaCl	6,4
Hypoxanthin	25,0	KCl	406,0
i-Inositol	18,3	CaCl ₂ xH ₂ O	263,0
Putrescin	0,16	MgSO ₄	200,0
Natriumpyruvat	110,0	NaH ₂ PO ₄	144,0
Ornithin	67,4	NaHCO ₃	3688,0
		FeCl ₃ (0,01%)	1,0 ml
Andere Komponenten			
Phenolrot	1,5		

MX-83 alle Angaben in mg/l; zur Basis Mx-82 wurden folgende Komponenten hinzugefügt:

Vitamine		Lipide	
Ergocalciferol	1,0	Arachidonsäure	0,06
Folsäure	600,0	Cholesterol	60,0
Meadionbisulfat	10,0	Linolsäure	84,0
Retinolsäure	15,0	Lecithin	120,0
Tetrahydrofolsäure	600,0	Sphingomyelin	20,0
		Vit E-Acetat	4,0
		Tocopherol	1,2
Carbohydrate, Metabolite u.a.		Spurenelemente	
D(-)Ribose	0,5	CuSO ₄ x4H ₂ O	1,2
Adenin	0,135	FeSO ₄ x7H ₂ O	278,0
Inosin	10,0	MnCl ₂ x4H ₂ O	0,2
Uracil	0,3	(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ x4H ₂ O	3,7
Taurin	4,0	NiSO ₄ x5H ₂ O	0,08
Dihydroxyaceton	30,0	Na ₃ VO ₄ x14H ₂ O	1,8
Malonsäure	30,0	ZnSO ₄ x7H ₂ O	287,0
Oxalacetat	50,0	H ₂ SeO ₄	1,3
Succinylsäure	100,0		
Transferrin	1,0		
Dithiohreitol	1,0		

Kulturmedium

Hierfür wurde MX-83 mit folgenden Komponenten supplementiert (pro Liter):

Arginin

Alpha-Glutamin		
Penicillin	100 U	(Gibco)
Streptomycin	100µg	(Gibco)
Insulin	10 mg	(Sigma)
Hydrocortison	10 mg	(Sigma)
EGF	100 µg	(Progen)
NCS	2-10%	

Nach der Etablierung stabil wachsender Linien wurde die Supplementierung mit NCS von 5 auf 2% reduziert. Außerdem wurde auf den Zusatz von EGF und Insulin zum Kulturmedium verzichtet.

Adhärierungsmedium

Hierfür wurde MX-83 mit 10% NCS eingesetzt.

2.1.10 Bakterienkulturmedien, Puffer

AP-Puffer:	100	mM	Tris-HCl, pH 9,5
	100	mM	NaCl
	5	mM	MgCl ₂

Church-Hybridisierungslösung:	1	%	BSA
	1	mM	EDTA
	0,5	M	NaHPO ₄ , pH 7,2
	7	%	SDS

Die Lösung wurde bis auf BSA aus Stocklösungen zusammenpipettiert.

Denaturierungslösung für 1 Liter:	20,0	g	0,5 M NaOH
	87,7	g	1,5 M NaCl

50x Denhardt's für 500 ml:	5	g	Ficoll
	5	g	Polyvinylpyrrolidon
	5	g	BSA (Fraktion 5)
	mit H ₂ O auf 500 ml auffüllen		

Diese Lösung wurde auf 50 ml Portionen aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

50 % Dextransulfat-Lösung: 50 g Dextransulfat wurden in 100 ml H₂O gelöst.

DMSO-Mix:	150	ml	H ₂ O
	1750	ml	DMSO
	70	ml	0,5 M Na-PO ₄ -Puffer, pH 7,0
	35	ml	20% SDS

Der Ansatz wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen auf 150 ml Portionen aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

dNTP-Mix: Diese Lösung bestand aus 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP und 1 mM dGTP in H₂O.

0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0: Der pH-Wert wurde mit Natronlauge eingestellt.

Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml): 0,5 g Ethidiumbromid wurden in 50 ml H₂O. gelöst.

5 x GEBS:	20	%	Glycerin
	0,5	%	Sarcosyl

	50	mM	EDTA
	0,05	%	Bromphenolblau
50 x MOPS:	1,0	M	MOPS
	0,25	M	Natriumazetat
	0,05	M	EDTA, pH 7,0
	Der Puffer wurde im Dunkeln gelagert.		

Multiprime-DNA-Labeling-System (Amersham-Buchler):

5x Nukleotid-Mix:

je	0,1	M	dATP/dGTP/dTTP
	0,3	M	Tris, pH 7,8
	0,025	M	MgCl ₂
	+ 3,5 ml/ml b-Mercaptoethanol		
	10x Hexamer-Primer:		
	0,8 mg/ml random-Primer		
	2,0 mg/ml BSA		
	in H ₂ O gelöst		

Klenow-Polymerase:

	1	U/ml	DNA-Polymerase I
	100	mM	Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7,5
	1	mM	Dithiotreitol
in	50	%	Glycerin gelöst

Natriumacetat-Lösungen:

	2	M	pH 4,1; oder:
	3	M	pH 4,8:

Der pH-Wert der Lösungen wurde mit Eisessig eingestellt.

NaOH/SDS-Lösung:

	10	ml	0,2 N NaOH
	1	ml	10 % SDS

Diese Lösung wurde jeweils frisch hergestellt.

Neutralisierungslösung für 1 Liter:

	1,5	M NaCl	87,66 g
	0,5	M Tris	60,57 g

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt, die Lösung autoklaviert.

NP-40:

	10	mM	Tris pH 7,4
	10	mM	NaCl
	3	mM	MgCl ₂
	0,5	%	NP-40

Paraformaldehyd (20%):

	20	g	Paraformaldehyd in
	90	ml	90°C H ₂ O lösen (20 Min. auf Rührer)
	10	N	NaOH (bis Lösung klar)
	filtrieren und auf 100 ml auffüllen		

PBS für 1 Liter:

	8,0	g	NaCl
	0,2	g	KCl
	1,44	g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	0,24	g	KH ₂ PO ₄

Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit HCl auf 7,4 eingestellt.

Proteinase K:

	10	mg/ml	in H ₂ O.
--	----	-------	----------------------

Maxi-Präparation:

Die Präparation erfolgte über Qiagen Tip 500 Säulen mit den unten aufgeführten Puffern, die selbst hergestellt wurden.

P1:	50	mM	Tris-HCl
	10	mM	EDTA, pH 8,0
P2:	200	mM	NaOH
	1	%	SDS
	Diese Lösung wurde jeweils frisch angesetzt.		
P3:	3	M	Kalium-Ac, pH 5,5
QBT:	750	mM	NaCl
	50	mM	MOPS, pH 7,0
	15	%	Ethanol
	0,15	%	Triton X-100
QC:	1	M	NaCl
	50	mM	MOPS, pH 0,7
	15	%	Ethanol
QF:	1,25	M	NaCl
	50	mM	Tris, pH 8,5
	15	%	Ethanol
RIPA-Puffer:	50	mM	HEPES, pH 7,4
	150	mM	NaCl
	10	mM	EDTA, pH 8,0
	1	%	NP40
	0,5	%	Sodium-Deoxycholate
	0,1	%	SDS
5x RNA-Auftragspuffer:	750	µl	Formamid (deionisiert)
	30	µl	50x MOPS
	240	µl	Formaldehyd (37 %)
	260	µl	H ₂ O
	100	µl	Glycerol (100 %)
	20	µl	Bromphenolblau (10 %)
	Diese Lösung wurde bei - 80 °C gelagert.		
Schwanz-Lyse-Puffer für 1 Liter:	50	mM	Tris
	100	mM	NaCl
	100	mM	EDTA
	1	%	SDS
	Die Lösung wurde mit HCl auf pH 8,0 eingestellt.		
20x SSC für 1 Liter:	0,3	M	Na-citrat
	3,0	M	NaCl
	Die Lösung wurde mit HCl auf pH 7,0 eingestellt.		
50x TAE-Puffer für 1 Liter:	242	g	Tris-base
	57,1	ml	Eisessig
	100	ml	0,5 M EDTA pH 8,0
	Aus dieser Stammlösung wurde die 1x Gebrauchslösung hergestellt.		
5x TBE-Puffer für 1 Liter:	500	mM	Tris-base
	500	mM	Borsäure
	12,5	mM	0,5 M EDTA pH 8,0
TBST-Puffer:	10	mM	Tris-HCl
	150	mM	NaCl

	0,05% (v/v)	Tween 20
TE-Puffer:	10	mM Tris pH 8,0
	1	mM EDTA pH 8,0

TE+RNAase A: RNAase A wurde in TE-Puffer in einer Endkonzentration von 100 mg/ml gelöst.

Transferpuffer (Western):	25	mM	Tris
	192	mM	Glycin
	20	%	Methanol

Tris-HCl-Puffer:	12,1	g/l	Tris (0,1 M)	(Lösung A)
	0,1	M	HCl	(Lösung B)

500 ml der Lösung A wurde mit der Lösung B auf einen pH-Wert von 7,6 titriert und auf 1 l aufgefüllt.

10 x Trypsin/EDTA-Lösung:	0,5 %	Trypsin; 0,2 % EDTA
		Trypsin und EDTA waren in PBS (pH 7,3) gelöst.

Western-Blot-Puffer (semi-dry):

- Anodenpuffer I: 300mM Tris, pH 10,4; 20% Methanol
- Anodenpuffer II: 30 mM Tris, pH 10,4; 20% Methanol
- Kathodenpuffer: 40 mM 6-Aminocarbonsäure; 20% Methanol; 0,01% SDS

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.1.1 Fällung von DNA

Um die Konzentration von DNA-Lösungen zu erhöhen, kann DNA gefällt und neu in Lösung gebracht werden.

Hierfür wird einer DNA-Lösung das 2,5fache Volumen 100%igen Ethanol und 1/10 Volumen Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) zugesetzt. Anschließend erfolgt die Präzipitation bei -80°C für 5 min. Danach wird 5 min bei 12.000 Upm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird schließlich in 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einer geeigneten Menge 1/10 TE-Puffer oder ddH₂O wieder in Lösung gebracht.

2.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren durch OD-Messung

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt werden. Hierzu wird eine Quarzküvette mit 100 µl Fassungsvermögen bei einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Eine Extinktion von 1 OD_{260nm} entspricht einer Konzentration von 50 mg/ml doppelsträngiger DNA, 33 mg/ml einzelsträngiger DNA (z.B. Oligonukleotide) bzw. 40 mg/ml RNA (Sambrook et al., 1989). Das Verhältnis der bei 260 nm zu der bei 280 nm gemessenen Extinktion (OD₂₆₀/OD₂₈₀) liegt bei einer sauber präparierten Nukleinsäure-Probe zwischen 1,8 und 2.

2.2.1.3 Amplifikation von cDNA-Fragmenten durch PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von DNA Fragmenten. Hierfür wird die Eigenschaft kurzer Oligonukleotide (Primer) genutzt, Sequenz-spezifisch an einen Matrizenstrang zu binden und dort als Startpunkt für eine DNA-Polymerase zu dienen. Durch hohe Temperaturen (94-96°C) können die synthetisierten Stränge wieder in Einzelstränge überführt werden und bei Absenken der Temperatur zusammen mit im Überschuß im Reaktionsansatz befindlichen Primern selber als Matrizen für eine Neustrangsynthese dienen, die von einer nicht Temperatur-sensitiven Taq-Polymerase bei ca. 72°C durchgeführt wird. Beim dem mehrfachen Durchlaufen dieser Temperaturzyklen wird die Anzahl der Matrizen mit jedem Zyklus erhöht. Durch Definition spezifischer Primer für beide Stränge eines cDNA-Templates kann auf diese Weise das dazwischenliegende Stück cDNA amplifiziert werden.

2.2.1.4 Gelelektrophorese von DNA

Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren wandern die DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativen Ladungen zur Anode. Die Laufgeschwindigkeit der DNA-Moleküle ist umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Zahl ihrer Basenpaare.

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in 1,5%igen Agarose-Flachgelen bei einer Spannung von 80 - 120 Volt. Die Agarosegele wurden mit 1x TBE-Puffer angesetzt, der zugleich auch als Laufpuffer diente. Vor dem Gießen der Gele wurden 5 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) (Sharp et al. 1973) pro 100 ml Gel zur geschmolzenen Agarose-Lösung gegeben, um die DNA nach der Elektrophorese unter UV-Licht sichtbar machen zu können. Als Größenmarker wurden jeweils 1,0 µg einer 1 kb - bzw. 1 µg einer 100 bp-Leiter aufgetragen.

2.2.1.5 Gelelektrophorese von RNA

Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte in 1%igen Agarose-Flachgelen (10 x 15 cm) bei einer Spannung von 10 - 80 Volt. Den Agarosegelen wurde Formaldehyd zur Denaturierung der RNA zugesetzt. Die Agarosegele wurden mit 1x MOPS angesetzt, der zugleich auch Laufpuffer war. Für ein 100 ml Gel wurden eingesetzt: 1 g Agarose; 2 ml 50x MOPS; 92,9 ml H₂O; 5,1 ml Formaldehyd (37%) Die RNA-Proben wurden zuvor zu 20 µg aliquotiert, lyophilisiert und bei -20°C gelagert. Zur Elektrophorese wurden 20 µg in 15 µl RNA-Probenpuffer aufgenommen und mit 3 µl H₂O und 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/µl) versetzt. Dieser Ansatz wurde für 15 min. bei 65°C denaturiert. Die im Eisbad abgekühlten Proben wurden auf das Gel geladen und die Elektrophorese gestartet. Der Lauf dauerte ca. 2 - 3 h. Danach wurde das Gel mit H₂O kurz abgespült und 15 - 20 min. in 20x SSC geschwenkt.

Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde auf einem Transilluminator neben der Spur des RNA-Fragmentgrößenmarkers ein Lineal gelegt und das Gel fotografiert. Die Abstände der Banden des Größenmarkers von der Geltasche konnten dann später zur Größenbestimmung der aufgetretenen Banden der detektierten RNA herangezogen werden.

2.2.1.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe des QiaEx-Kits der Firma Qiagen. Das zu isolierende DNA-Fragment wurde auf einem Transilluminator aus dem Agarosegel mit einer Skalpellklinge möglichst ohne überflüssige Agarosereste ausgeschnitten. Dabei wurde langwellige UV-Strahlung von 366 nm verwendet, um durch kurzwellige UV-Strahlung bedingte Nukleinsäure-Strangbrüche zu vermeiden.

2.2.1.7 Ligation von PCR-Produkten in Vektoren

Alle PCR-Produkte wurden in pGEM-T Easy™-Vektoren gemäß dem Protokoll der Firma Promega ligiert, wobei der durch die Taq-Polymerase verursachte Einzel-Adenosin-Überhang an den PCR-Produkt-Enden für die Ligation genutzt wurde. Der pGEM-T Easy™-Vektor enthält eine Ampicillin-Resistenz und ein lacZ-Operon für Blau-Weiß-Selektion.

2.2.1.8 Transformation von kompetenten Zellen

Ligationsansätze wurden für die Transformation kompetenter *E. coli* benutzt. Hierfür werden kompetente Zellen (200 µl) auf Eis aufgetaut, dann mit dem halben Volumen des Ligationsansatzes vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach werden die Zellen einem Hitzeschock von 42°C für 30 sec ausgesetzt und im Anschluß in einem ml SOC-Medium aufgenommen. Der Ansatz wird bei 37°C inkubiert. Nach 1 h werden 50 µl des Ansatzes auf LB_{Amp}-IPTG-x-Gal-Platten für die Blau-Weiß-Selektion ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

2.2.1.9 Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion dient der Selektion von erfolgreich transformierten Klonen die ein in den Vektor ligiertes Insert besitzen. Ist ein Bakterium erfolgreich mit einem Amp-Resistenz tragendem Vektor transformiert worden, so kann es, im Gegensatz zu nicht transformierten Bakterien, auf selektiven LB_{Amp}-Platten wachsen. Der Vektor pGem-T Easy™ trägt darüber hinaus ein für β-Galaktosidase kodierendes lacZ-Operon, innerhalb dessen sich die Multi-Cloning-Site (MCS) des Vektors befindet, in die ein cDNA-Fragment bei der Ligation inseriert. Das lacZ-Genprodukt, β-Galaktosidase, setzt das farblose x-Gal im Platten-Medium in einen blauen Farbstoff um.

Wurde ein cDNA-Fragment erfolgreich in die MCS ligiert, so ist daß lacZ-Operon unterbrochen. Eine durch IPTG induzierte β-Galaktosidase-Expression kann nicht stattfinden. Bakterien, die ein Plasmid aufgenommen haben, in dessen Multi-Cloning-Site erfolgreich ein PCR-Fragment ligiert wurde, bilden daher weiße Kolonien. Sie unterscheiden sich auf diese Weise von den blauen Kolonien, die Vektoren ohne Insert tragen.

2.2.1.10 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA für eine anschließende Charakterisierung der ligierten cDNA-Fragmente können von Blau-Weiß-Selektions-Platten mittels steriler Zahnstochern einzelne Kolonien gepickt und Mini (5 ml LB_{Amp})-Kulturen angeimpft

und ÜN bei 37°C inkubiert werden. Aus diesen Minikulturen kann man Plasmid-DNA präparieren, die in einem Restriktionsverdau eingesetzt wird.

Plasmid-DNA-Präparation gemäß der Triton-Boiling-Methode

Diese Methode dient der schnellen Isolation kleiner Mengen von Plasmid-DNA. Nach einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen wird dabei die chromosomale DNA denaturiert, wohingegen die Plasmid-DNA beim verwendeten pH-Wert in Lösung bleibt. Hierfür wurde STEL-Puffer verwendet: 8 % Saccharose; 0,1 % Triton 100; 5 mM Tris-Cl pH 8,0; 50 mM EDTA; 4 µl Lysozym (0,5 mg/ml).

Jeweils 4 ml LB (1:1000 mit einem geeigneten Antibiotikum versetzt) in einem Reagenzglas werden mit einer Bakterien-Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft, indem die Kolonie mit einem autoklavierten Zahnstocher durchstochen und dieser im Anschluß in ein Reagenzglas geworfen wird. Die angeimpften Kulturen werden dann ÜN bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Danach werden die Kulturen auf je zwei 1,5 ml Eppendorf-Gefäße verteilt (A- und B-Probe) und der Rest auf 4°C aufbewahrt, um ihn ggf. auf Agarplatten ausstreichen zu können. Die Eppendorf-Gefäße werden 1 min mit 13 kUpm zentrifugiert und der Überstand unter Schonung des Pellets mit einer Pasteur-Pipette abgenommen. Dann wird erneut kurz zentrifugiert und der restliche Überstand mit einer Mikroliter-Pipette abgenommen. Die B-Proben-Pellets werden sofort eingefroren (-20°C) und die A-Proben mit 150 µl kaltem STEL-Puffer resuspendiert. Die resuspendierten Proben, die keine Zellklumpen aufweisen dürfen, werden für 30 sec auf 100°C erhitzt und dann für 20 min bei 13 kUpm abzentrifugiert. Das daraus resultierende Pellet wird mit einem sterilen Zahnstocher entfernt.

Es werden nun 180 µl Isopropanol je Probe hinzugefügt, das Gemisch wird 5 sec geschüttelt und dann 5 min abzentrifugiert (13 kUpm). Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 500 µl Ethanol gewaschen. Nachdem das EtOH entfernt wurde, wird das Pellet für 5 min bei 37°C getrocknet und dann in 50 µl RNase-H₂O durch Schütteln und anschließende Inkubation bei 37°C gelöst. Nach Abkühlen des Gemischs wird noch einmal kurz abzentrifugiert.

Die eingefrorenen B-Proben stehen nach einer Charakterisierung der A-Proben durch einen Restriktionsverdau (siehe II.7.1) für eine eventuelle Minipräparation mit einem handelsüblichen Kit zur Verfügung (siehe II.5.2). Die durch den Kit aufgereinigte Plasmid-DNA kann schließlich als Template für eine Sequenzanalyse-Reaktion (siehe II.10) genutzt werden.

Minipräparation über Säulen

Um sehr saubere cDNA für Sequenzierungen zu gewinnen wurde das QiaSpin Mini-Kit der Firma Qiagen gemäß dem beigefügten Protokoll genutzt.

2.2.1.11 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden die Säulen und Puffer der Firma Qiagen verwendet. Eine ÜN-Kultur wurde zunächst in 250 ml LB-Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin bei 37°C im Schüttler kultiviert. Der Kulturansatz wurde in einen 250ml-Zentrifugenbecher überführt und 15 min. bei 4°C mit 5.000 Upm im JA 14 Rotor (Beckman) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 10 ml P1-Puffer und 100 µl RNase (10 mg/ml) resuspendiert. Die Bakterienzellen wurden durch 10 ml P2-Lösung alkalisch lysiert. Der Ansatz wurde vorsichtig vermischt und 5 min. bei RT inkubiert. Danach wurden 15 ml P3-Puffer zugegeben

und nach Vermischen des Ansatzes für 20 min. auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation (10.000 Upm, 30 min., 4°C, JA 14 Rotor). Der Überstand wurde durch sterile Gaze in ein 50 ml Becherglas filtriert.

Für die weitere Aufreinigung wurde eine Qiagen-tip-500 Säule verwendet. Nachdem die Säule mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert worden war, wurde der filtrierte Überstand aufgetragen. Die Säule bindet zunächst die Plasmid und die chromosomale DNA. Durch 3x Waschen mit 20 ml QC-Puffer wurde bis auf die Plasmid-DNA alles von der Säule eluiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit 15 ml QF-Puffer von der Säule eluiert und in einem 30 ml Corex-Röhrchen aufgefangen.

Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von eiskaltem Isopropanol (- 20°C) im Verhältnis 0,8:1 und vorsichtiges Mischen gefällt. Nach einer Zentrifugation (10.000 Upm, 30 min., 4°C, JS 13 Rotor) wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Zuletzt wurde die Plasmid-DNA getrocknet und in 100 - 500 µl TE oder H₂O dest. aufgenommen.

2.2.1.12 Restriktionsverdau von DNA

Mit Hilfe eines Restriktionsverdaus läßt sich ein in ein Plasmid (Vektor) eingefügtes Fragment (Insert) durch Restriktionsenzyme herausschneiden. Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die kurze, spezifische DNA-Sequenzen als Bindungsort erkennen und zerschneiden. Restriktionsenzyme, die aus verschiedenen Organismen isoliert werden, erfordern unterschiedliche Reaktionsbedingungen für ihre Aktivität. Die vom Hersteller mitgelieferten Puffer stellen die dafür optimalen Salz- und pH-Bedingungen ein.

Die aus dem Verdau resultierenden, unterschiedlich langen Fragmente des zuvor zyklisierten Plasmids lassen sich dann per Agarose-Gelelektrophorese (II.7.2) auftrennen. Auf diese Weise kann die Länge des Inserts näherungsweise bestimmt werden.

Das Volumen eines Standard-Verdaus beträgt, wenn DNA-Menge und -Konzentration dies zulassen, 20 µl, die sich wie folgt zusammensetzen: DNA in gewünschter Menge; 2 µl 10 x Enzympuffer (1/10 des Gesamtvolumens); 0,5 µl Restriktionsenzym (3-5 Units pro Verdau); ad 20 µl H₂O.

Per Definition schneidet eine Einheit Enzym 1 µg DNA / h (bezogen auf λ-DNA). Nach einer Inkubation von 1h bei 37°C ist bei leichtem Enzymüberschuß die DNA vollständig verdaut.

2.2.1.13 Isolation genomischer DNA

Zu diesem Zweck wurden Stücke von Mausschwänze in 550 µl eines speziellen Tail-Lysis-Buffers ÜN mit 70 µl Proteinase K bei 56°C verdaut. Das Lysat wurde dann gemixt und 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 560 µl NaCl (6M) gemischt und 5 min zentrifugiert. Dadurch wurden Proteine ausgesalzen und sedimentierten zusammen mit unverdauten Geweberesten und Knorpelteilen. 800 µl des Überstands wurden mit 800 µl EtOH 100% versetzt, um die DNA zu fällen. Im Anschluß wurde diese durch 5 min Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde anschließend mit 70% EtOH gewaschen und 5 min inkubiert. Dieser Schritt wurde mehrfach wiederholt.

Abschließend wurde das Pellet mit 100% EtOH gewaschen, 5 min inkubiert, getrocknet und in 50 µl 1/10 TE-Puffer mit 0,1 µg/µl RNase aufgenommen.

2.2.1.14 Isolation von RNA

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasyTM-Kit der Firma Qiagen. Gewebeproben wurden mit Hilfe eines Ultra-Turrax Homogenisators homogenisiert. Zellen aus Kulturgefäßen wurden zunächst abtrypsiniert, pelletiert, gewaschen und wieder pelletiert. Das Zell-Pellet wurde in Lysispuffer (RLT) resuspendiert und die Suspension über eine QiaShredder-Säule homogenisiert.

Je nach Menge der einzelnen Gewebe-/Zellproben kam entweder der Mini- oder der Midi-Kit (Angaben in Klammern) zur Anwendung. Die tiefgefrorenen Gewebe wurden in 600 µl (3,8 ml) RLT-Lysispuffer (10 µl β-Mercaptoethanol pro ml RLT-Lysispuffer) aufgenommen und sofort mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Das Gewebehomogenat wurde 3 min. (5 min.) bei 14.000 rpm (3.000 rpm) zentrifugiert, der Überstand (Lysat) mit 1 Volumen 70%igen Ethanol versetzt und vorsichtig gemischt. Mit maximal 700 µl (3,8 ml) dieser Proben wurden die RNeasy-Säulen geladen und 2 min. (5 min.) bei 10.000 rpm (3.000 rpm) abzentrifugiert und danach die durchgeflossene Flüssigkeit dekantiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die gesamte Probe auf die Säule aufgetragen wurde. Sodann konnte die Säule mit 700 µl (3,8 ml) RW1-Wasch-Puffer bei 10.000 rpm (3.000 rpm) in 2 min. (5 min.), und ein zweites Mal mit 500 µl (2,5 ml) RPE-Puffer bei 14.000 rpm (3.000 rpm) gewaschen werden. Zuletzt wurde die RNA mit 30 - 50 µl (150 - 250 µl) DEPC-behandeltem H₂O bei 14.000 rpm in 60 Sek (3.000 rpm in 3 min.) von der Säule eluiert. Die Menge der erhaltenen RNA konnte nun photometrisch bestimmt werden.

2.2.1.15 Southern Blot-Analyse

Für die Charakterisierung transgener Tiere wurde z.T. ein Southern Blot durchgeführt. Dazu wurde genomische DNA mit 15 U *EcoRI* in 20 µl Gesamtvolumen verdaut und mit 5x GEBS-Ladepuffer (4µl) versetzt.

Die verdaute DNA wurde im Anschluß in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt, das Gel samt Laufstrecke des Längenstandards auf der Gel-Dokumentationsanlage dokumentiert. Danach wurde es 10 min in 0,25 M HCl inkubiert (partielle Depurinierung; bis der Laufmarker sich gelb verfärbt), mit Wasser gewaschen und dann zur Denaturierung der Doppelstrangstrukturen in 50 % 1 M NaOH / 50 % 3 M NaCl geschüttelt, bis der Marker sich wieder blau färbt. Nach der Denaturierung wurde das Gel in einer Neutralisierungslösung inkubiert (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, pH 7,0).

Anschließend wurde das Gel ÜN mittels Kapillar-Blot-Verfahren mit 20x SSC-Transferpuffer auf Hybond N+ Nylonmembranen geblottet. Die Membran wurde getrocknet (RT), 2 min einer UV-Quelle ausgesetzt und dann bei 80°C 1 h lang gebacken, um die Nukleinsäuren kovalent auf der Membran zu binden.

Die Membran wurde für die Hybridisierung zunächst in 2x SSC; 0,1% SDS-Puffer getränkt und dann in Hybridisierungsröhren mit 6 ml Church-Puffer für mindestens 1 h bei 65°C vorhybridisiert.

2.2.1.16 Radioaktive Markierung einer Gen-spezifischen Sonde

Für die Herstellung einer Gen-spezifischen Sonde wurde eine Gen-spezifisches cDNA-Fragment aus einem Vektor durch Restriktionsverdau herausgeschnitten, durch Gelelektrophorese und -Extraktion aufgereinigt und in folgendem Ansatz mit dem Multiprime-Labeling-System von Amersham-Buchler radioaktiv markiert.

50 ng DNA als Template (in 30 μl H_2O) wurden aufgeköcht (5 min), auf Eis abgeschreckt und versetzt mit

5	μl	10x Primer
10	μl	5x Puffer (enthält Nukleotidmix)
1	μl	Klenow Fragment (5U/ μl)
5	μl	$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP

Der Ansatz wurde für 60 min bei 37°C inkubiert und im Anschluß über Biorad Sephadex G25-Gelfiltrationssäulen eluiert, um nicht gebundene Nukleotide abzutrennen. Danach wurde die Sonde erneut aufgeköcht (5 min) und abgeschreckt. Die Sonde wurde im Anschluß direkt zum Hybridisierungsansatz gegeben und dieser bei 65°C ÜN inkubiert. Danach erfolgten zwei Waschschrirte mit 2x SSC; 0,1% SDS bei 65°C. Bei Bedarf wurde auch mit geringeren Salzkonzentrationen gewaschen, um die Stringenz zu erhöhen. Zur Dokumentation wurde die radioaktive Membran dann auf einem Röntgenfilm exponiert.

2.2.1.17 Sequenzierung von cDNA

Für die Sequenzreaktionen konnte in der Regel in pGEM T-Easy klonierte cDNA aus Qiagen-Minipräparationen eingesetzt werden. Hierzu wurden ca. 500 ng Template mit 4 μl Terminator Ready Reaction Mix und 5 μl T7-Primer (5 pmol) versetzt und mit Wasser auf 20 μl aufgefüllt. Dieser Reaktionsansatz wurde für eine PCR-Reaktion des Musters 25 mal (10 min 96°C, 5 min 50°C, 4 min 60°C) eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 16 μl H_2O und 64 μl EtOH (100%) vermischt. Die Fällungsreaktion wurde 15 min lang bei RT inkubiert, abzentrifugiert (20 min) und der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 100 μl 70% EtOH gewaschen, abzentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Danach wurde das Pellet bei 90°C für 1 min getrocknet und in 20 μl ABI Prism Template Suppression Reagent gelöst. Dieser Ansatz wurde 2 min lang bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgeschreckt. Dieser Ansatz konnte bei 4°C schließlich bis zur Sequenzanalyse aufbewahrt werden.

2.2.2 Expressionsnachweise

2.2.2.1 Reverse Transkriptase-Reaktion

Die Reverse Transkriptase-Reaktionen wurden mit Hilfe der Omniscript-Reversen Transkriptase von Qiagen durchgeführt. Dazu wurden 2 μg Total-RNA in folgendem Ansatz eingesetzt:

2,0 μl	10x Puffer	
2,0 μl	dNTP 0,5 mM	
2,0 μl	OligodT-Primer 1 μM	(GIBCO)
1,0 μl	RNase-Inhibitor, 10U/ μl	(GIBCO)
1,0 μl	RTase, 4U/rxn	
ad 20 μl	H_2O	

Der Ansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert und die Reverse Transkriptase danach bei 93°C 5 min inaktiviert.

2.2.2.2 Northern Blot-Analyse

Beim Northern Blot wurde die isolierte Gesamt-RNA in einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt, durch kapillare Saugkräfte auf eine Nylonmembran immobilisiert und mit einer $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP-markierten DNA-Sonde hybridisiert. Alle Plastik- bzw. Glasmaterialien wurden zuvor mit 50 mM NaOH und frisch autoklaviertem H_2O gespült. Als Membran wurde eine positiv geladene

Nylonmembran (Hybond N+) verwendet. Der Transfer der RNA und der Aufbau des Blots war identisch zum Southern Blot. Danach wurde die Nylonmembran zunächst für 10 min in 2x SSC; 0,1% SDS geschwenkt und dann getrocknet. Zur kovalenten Fixierung der RNA an die Nylonmembran wurde diese für 2 min auf einem Transilluminator mit UV-Licht bestrahlt und anschließend für 2 h bei 80°C gebacken. Die Hybridisierung erfolgte in einer Hybridisierungsrollerflasche bei 65°C im Hybridisierungsöfen. Die radioaktive Markierung der DNA-Sonde wurde, wie beim Southern Blot beschrieben, durchgeführt.

Der Hybridisierungsansatz wurde nach 24 h abgeschüttet und die Membran mindestens 2x 15 min bei 65°C mit Waschlösung (2x SSC; 0,1% SDS) oder stringenter gewaschen. Die Autoradiographie wurde, wie beim Southern Blot beschrieben, durchgeführt.

2.2.2.3 cDNA-Arrays

Spot-Blotting

Je Dot werden 2 µg Plasmid-DNA bzw. 200 ng PCR-Produkt eingesetzt, die mit Wasser und NaOH auf eine Endkonzentration von 0,3 M NaOH in einem Volumen von 100 µl aufgefüllt werden. Die Proben werden 10 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend auf Eiswasser abgeschreckt. Durch Zugabe von 100 µl 20x SSC / 0,4 M HEPES pH 5,0 werden die Proben neutralisiert und können dann auf Eis aufbewahrt werden.

Eine Membran (Nitrocellulose oder Nylon) wird ebenso wie zwei Blotting Papiere auf 96-well-Format zurechtgeschnitten und mit 10x SSC befeuchtet. Im Anschluß wird die Dot-Blot-Apparatur (Schleicher & Schuell) zusammengesetzt (Membran blasenfrei auf den beiden Blot-Papieren), ein Vakuum angeschlossen und die Slots der Apparatur mit jeweils 200µl filtriertem 10x SSC gewaschen. Die Plasmidproben werden dann jeweils zu zwei Aliquots á 100 µl appliziert und die Slots wieder mit 10x SSC nachgewaschen.

Die Membran wird anschließend an der Luft getrocknet und im Inkubator bei 80°C 2 h gebacken. Die Hybridisierung kann mit radioaktiv markierter cDNA (Nitrocellulose-Membran) oder Digoxygenin (DIG)-markierter RNA (Nylonmembran) erfolgen.

Synthese radioaktiv markierter cDNA

20-40 µg Total-RNA werden eingeengt und in 16,75 µl H₂O aufgenommen, denen 5 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer zugefügt werden. Die Probe wird 10 Minuten bei 70°C inkubiert und danach auf Eis abgeschreckt. Nacheinander wird folgendes hinzupipettiert:

- 1,5 µl Rnase-Inhibitor
- 7,5 µl dNTP-Mix (ATG (!), je 5 mM)
- 3,0 µl dCTP (0,27 mM)
- 15 µl Reverse Transkriptase Puffer
- 7,5 µl 0,1 M DTT
- 15 µl α ³²P-dCTP

Man läßt den Ansatz 10 Minuten bei RT äquilibrieren, fügt schließlich 3,75 µl Superscript II Reverse Transkriptase hinzu und inkubiert den Ansatz 1-2 h bei 42°C. Die Probe wird dann über Gel-Filtrationssäulen (BIORAD) abzentrifugiert, um nicht-eingebaute Nukleotide vom Ansatz zu trennen. Danach wird ein Aliquot der Sonde im Szintillator gemessen (15 µl α ³²P-dCTP ~ 180 Millionen cpm, davon ca. 50% eingebaut). Die Probe wird dann mit 1 Vol. 0,3 M NaOH / 30 mM EDTA versetzt, 7 min in kochendem Wasser denaturiert und auf Eis abgeschreckt. Danach wird sie mit 0,5 Vol. 1 M Tris-Cl, pH 8,0 versetzt und zur Hybridisierung eingesetzt.

DIG markierte RNA

Für die Präparation chemisch markierter mRNA wurde das DIG-Chem-Link und – Detection-Kit von Roche verwendet.

Je Ansatz wurden 10-20 µg Total-RNA eingesetzt, aus denen die mRNA (Qiagen Oligotex) isoliert wurde. Zu letzterer wurde 1 µl (je 10µg eingesetzter Total-RNA) Boehringer DIG-Chem-Link Reagenz hinzugefügt, der Ansatz auf 20 µl mit ddH₂O aufgefüllt und 30 min bei 85°C inkubiert. Danach wurden 5 µl Stop-Reagenz zugegeben. Der Ansatz wurde auf Eis abgeschreckt und später zur Hybridisierung verwendet. Kurz vor der Hybridisierung wurde die Probe noch einmal 10 min denaturiert und dann abgeschreckt.

Hybridisierung

Die Hybridisierung und die anschließenden Waschschrte folgten bei allen Nukleinsäure Blots einem ähnlichen Schema und variierten abhängig von den eingesetzten Nukleinsäuren. In der Regel wurde die Membran in 2x SSC-Puffer eingeweicht und dann mindestens 1h in Hybridisierungspuffer (DIG-Easy-Hyb bzw. Church) bei 50°C vorhybridisiert. Danach wurde die parallel vorbereitete und denaturierte Probe zugesetzt. Die Hybridisierung fand bei 50°C ÜN (12-16h) statt.

Im Anschluß wurde zweimal mit 2x SSC; 0,1% SDS bei RT und im Anschluß noch zweimal mit 0,1x SSC; 0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Die radioaktiv hybridisierten Blots konnten sofort exponiert oder mittels Instant-Imager ausgewertet werden. Die DIG-hybridisierten Blots mußten zunächst in Maleinsäure-Puffer gewaschen und dann mindestens 30 min in 1x Blockierungslösung geschwenkt werden. Im Anschluß wurde die Blockierungslösung gegen frische ausgetauscht und mit Anti-DIG-Antikörper im Verhältnis 1:10000 versetzt. Nach 30 min wurden die Blots 2x 15 min in Waschpuffer gewaschen und dann 5 min in Detektionspuffer äquilibriert. Anschließend ließ man die Filter abtropfen und sie wurden, überschichtet mit 1-2 ml CSPD-Reagenz, in einen Folienbeutel eingeschweißt, um sie so 15 min bei 37°C zu inkubieren. Dieser Schritt diente der Verstärkung der Fluoreszenz-Reaktion. Danach wurde überschüssiges CSPD abgesaugt, der Beutel verschweißt und auf einem Biolumineszenz-Film exponiert.

2.2.3 Arbeiten mit Proteinen

2.2.3.1 Isolation von Proteinen

Gewebestücke wurden zum Zwecke der Proteinextraktion mit einer Klinge zerkleinert und in 24 Teilen eiskaltem RIPA-Puffer mit einem Teil 25x Proteinase Inhibitor (complete, Roche #1697498) versetzt. Monolayer-Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und bei 4°C mit 500 µl RIPA + Proteinase Inhibitor abgekratzt und das Lysat mit einer Spritze mit 25 Gauge Nadel in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Beide Lysatansätze wurden mit einem Ultraschallstab auf Eis homogenisiert. Anschließend wurden die Lysate abzentrifugiert und der ÜS in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.3.2 Western Blot

Die Proteine für die Western Blots wurden mit RIPA-Puffer aus den Zellen und dem Gewebe extrahiert, die Proteinmenge wurde mittels der Bradford-Methode photometrisch bestimmt und in SDS-Polyacrylamid-Minigelen aufgetrennt, die nach folgendem Schema angesetzt wurden.

	Sammelgel 5%	Trenngel 12,5%
Acrylamid/Bisacrylamidlösung	1,0 ml	8,0 ml
Wasser	3,3 ml	4,0 ml
Tris/HCl, pH 6,8	1,4 ml (final 125 mM)	-
Tris/HCl, pH 8,8	-	4,0 ml (f. 375 mM)
APS	55 µl	160 µl
TEMED	2,5 µl	8,0 µl

Die Auftrennung der Protein-Samples erfolgte im Sammelgel mit einer Stromstärke von 20 mA und im Trenngel mit einer Stromstärke von 30 mA. Als Längenstandards wurden „Rainbow“-Marker der Firma Amersham eingesetzt.

Gebロットet wurde das Gel im Anschluß auf eine Immobilon PVDF-Membran nach dem Wet-Blot-Verfahren bei einer Stromstärke von 250 mA ÜN. Danach wurde die Membran mit 0,02 % Ponceaurot in 3 % Essigsäure gefärbt, um den gelungenen Transfer nachzuweisen und die Längenstandards mit einem weichen Bleistift markiert. Nach der Entfärbung mit dest. Wasser wurde die Membran in 10 ml TBST-Puffer mit 5 % (w/v) Milchpulver für 1 h unter Schütteln inkubiert. Nach dem Blockieren wurde das Milchpulver mit TBST vollständig gewaschen, der erste Antikörper in der jeweilig empfohlenen Konzentration zugegeben und 1,5 h inkubiert. Wiederum wurde dann mit TBST gewaschen, der zweite Antikörper (1:10.000 verdünnt) zugegeben und 45 min inkubiert. Die Membran wurde danach mit TBST gespült. Sie wurde im Anschluß entweder in AP-Puffer äquilibriert und mit 100 µl NBT/BCIP-Lösung in 10 ml AP-Puffer gefärbt, oder, bei Einsatz eines HRP-gekoppelten Antikörpers, nach dem Protokoll des ECL+Plus-Systems von Amersham Pharmacia behandelt und dann auf einem Biolumineszenz-Film exponiert.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Isolation von primären Lungenzellen aus transgenen Mäusen

Eine Maus wurde in einer CO₂-Atmosphäre getötet und sofort geöffnet. Der Brustkorb des Tieres wurde entfernt, seine Trachea freigelegt und die Vena cava durchtrennt. Die Trachea wurde möglichst nahe des Rachenraumes quer eingeschnitten. In diese Öffnung wurde eine Spritzen-Nadel mit Olive eingeführt, hinter der mit einem sterilen Faden abgebunden wurde. Über die fixierte Nadel wurde die Lunge mit vorgewärmten PBS (1 ml) gespült. Dann wurde die Lunge mit 2 ml vorgewärmtem Medium (DMEM mit Pen/Strep und Dispase [2 U/ml]) erst gespült und dann gefüllt. Danach wurde die Trachea unterhalb der Nadel abgebunden und die Lunge aus dem Brustkorb präpariert, wobei Herz und überflüssige Teile der Trachea abgetrennt wurden. In vorgewärmten DMEM schwimmend wurde die gesamte Lunge dann bei 37°C für 1 h inkubiert, um durch die Dispase die Epithel-Zellen der Lunge aus dem Gewebeverband zu lösen. Im Anschluß wurde sie in einer Petrischale mit sterilen Pinzetten zerissen und samt allem Ausfluß mit einem Spatel durch einen Falcon Zell-Strainer direkt in ein 50 ml Falcon-Tube mit vorgewärmtem MX 83-Medium passiert.

Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und mit PBS gewaschen, um schließlich in MX 83 mit 10% NCS überführt zu werden. In diesem Medium wurden die Primärzellen dann in 6 cm Schalen ausplattiert.

2.2.4.2 Allgemeine Zellkultur-Techniken

Alle Zellen wurden im Laufe der Untersuchungen in MX 83-Medium mit unterschiedlichen Zusätzen und i.d.R. in 25 cm² bzw. 80 cm² Zellkulturflaschen (Nunc) kultiviert. In allen Fällen enthielt das Medium zusätzlich die Antibiotika Penicillin und Streptomycin, außerdem Hydrocortison und alpha-Glutamin. Die Inkubation erfolgte in einem Zellkultur Inkubator mit einer relativen Feuchte von > 98 % und 10 % CO₂ bei 37°C.

- Transferieren

Zum Passagieren von Zellen aus Zellkultur-Schalen wird das Medium aus diesen abgesaugt und die Zellen mit vorgewärmter (37°C) 1x TEP-Lösung überschichtet. Sie werden dann für ca. 5 min im Inkubator bei 37°C inkubiert und nach Dissoziation mit einer Pipette abgesaugt (spülen) und in ca. 5 ml warmes Serum-haltiges Medium überführt, um die Trypsin-Reaktion zu stoppen. Die Zellen werden dann abzentrifugiert (5 min, 1000 upm, Hettich-Tischzentrifuge) und der ÜS abgesaugt. Das Pellet wird in Adhäsions-Medium (Serum-haltig) resuspendiert und in Aliquots in frische Zellkulturgefäße überführt. Nach einer Adhäsionsphase (Dauer abhängig von der Zelllinie) wird das Adhäsions-Medium mit nicht adhären Zellen abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

- Zellzahlbestimmung

Zu diesem Zweck wurden Zellen abtrypsinisiert, pelletiert und in einem definierten Volumen aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden auf eine Neubauer-Zählkammer übertragen und die Zellzahl pro ml bestimmt.

- Einfrieren

Um Zellen aus Zellkultur zu konservieren werden diese eingefroren und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff Langzeit-gelagert. Dazu werden Zellen ca. 1×10^6 Zellen abtrypsinisiert und in Serum-haltigem Medium abzentrifugiert. Der ÜS wird abgesaugt und die Zellen werden in 1 ml Einfriermedium (10 % DMSO, 90 % Serum) resuspendiert. Die Suspension wird in ein Cryo-Röhrchen überführt und dieses in eine Styroporbox (oder dicke Zellstofflagen) gesteckt. Auf diese Weise isoliert setzt man die Zellen in eine -70°C-Kühltruhe und läßt die Zellen für 24 h durchfrieren. Danach werden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

- Klonierung von Zelllinien

Zu diesem Zweck wurden Zellen der Linie 5 abtrypsinisiert, gewaschen und ausgezählt. Die Zellen wurden dann in einer Verdünnungsreihe ausplattiert, an deren Ende 24 Wells einer 24-Well-Platte standen, die rechnerisch lediglich je eine Zelle enthalten durften. Die Wells wurden mikroskopisch untersucht und diejenigen markiert, in denen kurz nach Adhäsion (3 h) mehr als eine Zelle enthalten war. In einzelnen Wells hochgewachsene Zellkolonien wurden erneut diesem Prozeß unterzogen, bis sich ein homogener Phänotyp darstellte.

2.2.4.3 Histologische Färbungen

Für alle beschriebenen Färbungen wurden Zellen auf Glasobjektträgern mit Plastikkammern angezogen. Sie wurden mit 4 % PFA fixiert und in Glasfärbetrögen (Roth) den Färbeprozessen unterzogen.

-PAS-Färbung

Die fixierten Zellen wurden 15 min in 0,8 % Periodsäure inkubiert und dann 3x in destilliertem Wasser gewaschen. Die Präparate wurden danach in Schiffschenschen Reagenz gefärbt und im Anschluß 3x in dest. Wasser gespült und dann, beginnend mit 70 % EtOH, wie bei der Toluidinblau-Färbung entwässert. Eingedeckt wurde mit Histomount.

-Sudan Schwarz

Die fixierten Zellen wurden kurz in 70 % EtOH gespült und in Sudanschwarz B-Lösung (1 % in 70 % EtOH) 15 min bei 4°C inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden danach kurz in 70 % EtOH gespült und in destilliertes Wasser überführt und mit Glycerin-Gelatine eingedeckt.

- Lyso Tracker Green

Die fixierten Zellen wurden mit 50 nM LysoTracker Green (Molecular Probes) für 5 min inkubiert, gewaschen und mit einem Fluoreszenz Mikroskop (Zeiss) dokumentiert.

LysoTracker färbt acide Organellen, wie z.B. Lysosomen.

2.2.4.4 Chromosomenanalyse

Zellen der Lungenzelllinien wurden auf sterilen Deckgläschen in Gewebekultur-Schalen bis zur Semikonfluenz kultiviert. Dann wurden sie 2 h mit Colcemid (10 µg/ml Endkonzentration; GIBCO) behandelt, wodurch sich teilende Zellen in der Metaphase verharren. Nach zwei Stunden wurde das Medium durch 2 ml einer 37°C warmen, hypotonen 0,8 %igen Natriumcitratlösung ersetzt, wodurch die Zellen anquollen. Nach 30-45 min wurden zu der Natriumcitratlösung 2 ml Fixationsreagenz gegeben. Dieses Gemisch wurde nach 2 min abgesaugt und durch frisches Fixationsreagenz (2 ml) ersetzt. Nach Absaugen des Fixativs wurde kräftig auf die Zellen geblasen, wodurch die Zellen zerplatzen und die Metaphasen gestreut wurden. Die Deckgläschen wurden anschließend Luftgetrocknet und über einer Flamme hitzefixiert. Im Anschluß wurden die Deckgläschen für 15-90 sek in Trypsinlösung bei RT inkubiert, danach in PBS gespült und 5 min in Giemsa-Lösung gefärbt, die anschließend mit Leitungswasser abgewaschen wurde.

2.2.4.5 Fixierung und Einbettung von Gewebe

Die Fixierung von Gewebestücken erfolgte in Bouinscher Lösung oder Paraformaldehyd (4 %). Die Gewebestücke wurden bei 4°C im Fixativ gelagert. Für Elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde Glutaraldehyd zugesetzt.

Die Einbettung in Kunststoff erfolgte nach Durchlaufen einer Verdünnungsreihe mit Alkohol. Dabei wurden die Gewebestücke solange in 80 %igem Alkohol eingelegt und dieser gewechselt und mit 1-2 Tropfen Ammoniak versetzt, bis kein gelber

Pikrinsäurerückstand mehr feststellbar war. Danach wurden sie erst in 90 % EtOH 2 x gewechselt, für 1 h, dann in 96 % EtOH 3x gewechselt, für 2 h und schließlich in 100 % EtOH (4x gewechselt, 3 h) überführt. Eingebettet wurden die Proben schließlich in 2-Hydroxy-Methacrylat, Technovit 7100 der Fa. Kulzer. Hierzu wurden die Proben ÜN in der Vorbereitungslösung (100 g Technovit plus 1 g Härter 1) inkubiert. In einer Histoform S (Fa. Kulzer) wurden die Proben schließlich mit der Kunststofflösung (15 ml Vorbereitungslösung und 1 ml Härter 2) ausgegossen. Die Polymerisation erfolgte ca. 1 h bei RT und dann mehrere Stunden bei 37°C.

2.2.4.6 Adhäsionsunabhängiges Wachstum – Tumorigenität

- Soft-Agar-Test

Die Plastikoberfläche der Zellkulturflasche dient den Zellen als Ersatz für die Basalmembran. Nicht-transformierte epitheliale Zellen bleiben im Kontakt mit der Oberfläche und wachsen in einer einzelnen Zellschicht. Tumorigen transformierte Zellen verlieren die Abhängigkeit von Oberflächenkontakten und wachsen übereinander in Zellhaufen oder freischwimmend im Medium. Um die Unabhängigkeit von Kontaktgebundenem Wachstum zu untersuchen, wurden Zellen in Weichagar suspendiert. Dazu wurden 1×10^5 Zellen je Zelllinie in je eine Schale eines '6-well-plate' in 2 ml Weichagar (0,3 %) ausplattiert. Hierfür wurde 2x Medium und Agar (1,2 % und 0,6 %) auf 42°C temperiert. 1 ml Grundagar (1,2 % Agar 1:1 mit 2 x Medium) wurde in jede Schale vorgelegt. Nach dem Aushärten des Agars wurden die Zellen pelletiert und je Schale in 1 ml 2x Medium resuspendiert, das wiederum mit 1 ml 0,6 % Agar versetzt und unmittelbar ausplattiert wurde. Im Anschluß wurden die Zellen in Weichagar 14 d bei 37°C, 10 % CO₂ und > 98 % rel. Feuchte inkubiert. Für jede Zelllinie wurden drei parallele Ansätze plattiert. Außerdem wurden die Zellen jeweils in Weichagar ohne und mit EGF-Zusatz (20ng/ml) ausgebracht. Nach 24 Stunden wurden unter dem Lichtmikroskop Kolonien im Weichagar ausgezählt, die von schlechter Vereinzelung der Zellen herrührten.

Als Kontrolle wurden zugleich Zellen der Linie A549 (humane ATII-Zellen; tumorigen) als Positiv- und ein Ansatz mit PBS als Negativ-Kontrolle ausplattiert. Nach zehn Tagen wurden erneut die Koloniezahlen bestimmt.

- Nacktmaus-Test

Die Untersuchung von Membran unabhängigem Wachstum *in vitro* ist allein für das tumorigene Potential der Zellen nicht aussagekräftig. Ein anderer Parameter hierfür ist das tumorigene Wachstum von Zellen, die Immun-defizienten Nacktmäusen subkutan injiziert mit 25 µl-Kanülen worden sind. Hierfür wurden jeweils drei Balb c nu/nu-Mäusen subkutan, jeweils links und rechts in die Bauchdecke, $1,6 \times 10^6$ Zellen in 200 µl PBS der Zelllinien 5/A, 5/D, 5/E, 5/F, 7 und A549 als Kontrolle gespritzt. Außerdem wurden drei Mäusen mit PBS als Negativ-Kontrolle gespritzt.

Da die Zellen beim Spritzen Scherkräften ausgesetzt sind, wurde die Viabilität der Zellen getestet, indem Aliquots parallel direkt in Kulturschalen mit Medium gespritzt und kultiviert worden sind.

2.2.4.7 Proliferationsanalysen

Um das Wachstumsverhalten der Zelllinien *in vitro* zu bestimmen, wurden jeweils 3×10^4 Zellen der Zelllinien 5/A, 5/D und 7 pro Untersuchungszeitpunkt in 6 cm

Zellkulturschalen (Nunc) mit 3 ml MX-83 mit 2 % NCS ausplattiert. Es wurden Zellen für die Zeitpunkte 0 (am selben Tag, nach Adhäsion), 1 d, 3 d, 5 d,...,15 d ausplattiert. Nach der Adhäsion der Zellen wurde das Medium erneuert. Zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten wurden Zellen abtrypsiniert und die Zellzahl in drei unabhängigen Schalen durch Auszählung in Neubauer Zählkammern bestimmt. Danach wurde alle 48 h auf diese Weise die Zellzahlen je Linie über insgesamt 15 d bestimmt.

2.2.4.8 Einfluß von Wachstumsfaktoren auf das Zellwachstum

Für diese Experimente wurden je 3×10^4 Zellen der Zelllinien 5/A, 5/D und 7 in drei 6 cm Zellkulturschalen je Zelllinie ausplattiert. Dies geschah für jede der unten angeführten Medien- (MX-83) oder Matrix-Varianten:

- Ohne Serum
- 2% NCS
- 2% NCS + 20 ng EGF / ml
- 2% NCS + 0,2 ng TGF β / ml
- 2% NCS + 1,0 ng TGF β / ml
- Collagen-Matrix

Nach Adhäsion der Zellen (3h), wurden sie 5d bei 37°C, 10 % CO² und > 98 % rel. Feuchte inkubiert und dann ausgezählt um Induktions-Effekte biogener Peptide auf das Zellwachstum zu dokumentieren. Drei Kontroll-Schalen wurden nach Adhäsion (3 h) als Zeitpunkt 0 ausgezählt, um die ausplattierte Zellzahl zu bestätigen.

2.2.5 Morphologische Untersuchungen

Kleine Gewebestücke von 1 mm³ Größe wurden von den Gewebeproben abgeschnitten und in 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylate Puffer, pH 7,4 für 2 h bei 4°C nachfixiert und in diesem Puffer ÜN gewaschen. Nach zwei zusätzlichen Waschschritten von 30 min Dauer wurde das Gewebe in 1 % OsO₄ in 0,1 M cacodylate Puffer, pH 7,4 fixiert, dehydriert und in Epon eingebettet. Es wurden 1 µm dicke Schnitte angefertigt und für die Lichtmikroskopie mit 1 % Toluidinblau angefärbt.

Für die Elektronenmikroskopie wurden Schnitte mit 80 bis 100 nm Dicke angefertigt, die mit 4 % Uranyl-Acetat für 5 min und Blei-Citrat für 10 min gefärbt wurden. Die Proben wurden unter einem Zeiss EM 10C/CR Elektronenmikroskop untersucht. Es wurden Bilder mit den Vergrößerungen 1000, 2500, 8000 und 12500 aufgenommen.

2.2.6 Identifikation differentiell exprimierter Gene

Für die Identifikation differentiell exprimierter und damit potentiell an Proliferations-Unterschieden beteiligte Gene wurden mit einer Slot Blot-Apparatur wie unter 2.2.2.3 beschrieben zwei Filtersätze mit Tumorigenese-relevanten cDNA-Klonen präpariert und mit radioaktiv markierter cDNA oder DIG markierter mRNA aus den getesteten Zelllinien hybridisiert.

Die zu diesem Zweck generierte Klonsammlung von 83 Tumorigenese-relevanten cDNA-Klonen ist in Tabelle 2.1 in einer Übersicht dargestellt:

#	Name	Primer 5' -> 3'	Funktion
1	Apaf1	F- TCCTAAGCATGTTGTCCCTGTGGAG R- TCCGTTTCCAAGTCCCAGAGAACG	Apoptose
2	APC	F- TGAACGTGGTAGGGATGAACTCTGG R- TTATCGCAGGCTTGGGCTCCAAAC	Tumorsuppressor
3	ATM	F- CATA CGCCAAACAAGATTGCCTCTG R- TGCTCGTTTCCAGGGAGATCCTTC	Apoptose
4	β-Actin	F- TGATGGTGGGAATGGGTCAGAAGG R- TCACAATGCCTGTGGTACGACCAG	Cytoskelett
5	bad	F- TCCAGATCCCAGAGTTTGAGCC R- TAAGCTCCTCCTCCATCCCTTC	Bcl Interaktion
6	bax	F- GCGAATTGGAGATGAACTGGATAG R- GATCAGCTCGGGCACTTTAGTG	Apoptose
7	bcl 2	F- ATGGGAAGCAGAGCAAGGGGTTAG R- TCCAGGGACTTGGAGAATTTGCC	Repressor v. max
8	bcl x long	F- CATCAATGGCAACCCATCCTG R- ACTACCTGCTCAAAGCTCTGATACG	s. Bcl2
9	β-catenin	F- TGACGGGCAGTATGCAATGACTAGG R- TGCAGTGTCGTGATGGCGTAGAAC	Cytoskelett
10	e-cadherin	F- TCAGAAGACAGAAACGAGACTGGG R- TGTGTCACCTTCAGCCAGCCTG	Cytoskelett/cycD1 Interaktion
11	caspase 2	F- ATGTGGAACCTCTCAACCTGCTGC R- TTTCTGTGCGGTCTGGTCATGTAG	Apoptose
12	caspase 3	F- GAGCACTGGAATGTCATCTCGC R- CCACTGTCTGTCTCAATGCCACAG	Apoptose
13	caspase 8	F- TGGAGGAAGGCAATCTGTCTTTC R- CCCGAGGTTTGTCTTCATTTG	Apoptose
14	caspase 11	F- GGTGAAATGCTTCTCCAGACATTC R- CCCTCTGCTGTAAGCTCCTCTTTC	Apoptose
15	cdc 2	F- GGAATTGTGTTTTGCCACTCCCG R- ATCTCTGAGTCGCCGTGGAAAAGC	Protein-Kinase
16	cdc 6	F- CCGACATTTAAGGCTTCCCC R- TTTTCCAGTCCCAGGAGCG	Zellzyklus
17	cdc 25a	F- ACCAAGACACCTTTCACCTCATCGAC R- AGGGATAGAGACTGGGATGGAAGCTG	aktiviert cyc D/cdc4- Komplex
18	cdk 4	F- CCCAATGTTGTACGGCTGATGGATG R- CCAGCTTGACGGTCCCATTACTTG	Zellzyklus
19	connexin 43	F- GTCAGCTTGGGGTGATGAACAG R- CAATCTGCTTCAGGTGCATCTCC	Zell-Zell-Kommunikat.

#	Name	Primer 5' -> 3'	Funktion
20	cyc B	F- TGTGAACCAGAGGTGGAACCTTGCTG R- TTCTTGGGCACACAACCTGTTCTGC	bindet cdk 2
21	cyc C	F- TGTTTCTGGCATCCAAAGTAGAGG R- TATCCTCCATGCAAGGGGAAGCAG	Zellzyklus
22	cyc D1	F- TGCCTGCAGAAGGACATCCAAC R- AACACTACCAGTTCCCACTCCAGC	bindet cdk 4
23	cyc D2	F- TGCCTGCAGAAGGACATCCAA R- TACCAGTTCCCACTCCAGCAG	bindet cdk 4
24	cyc E	F- TGCATTTAGCCTCGGAAAATCAG R- GCAAACCTGGTGCAACTTTGGAGGG	bindet cdk 2
25	Daxx	F- TTCGGGAAAATCGAACCTTGGC R- AAAGTCTGAAGGCGATGTGGGACTC	Apoptose
26	DHFR	F- GAACTGCATCGTCGCCGT R- TTCCTCCGACTATCCAAACC	E2F-Indikator
27	EGF	F- GGATCTCCTGTTTCGATATTGACG R- TGATGTCATGCTTCTGCCCGTAGC	Wachstumsfaktor
28	EGF- Rezeptor	F- CAACTGTGAAGTGGTCCTTGGG R- TGTAAGTTCCGCATGGGCAG	Rezeptor
29	E2F5	F- TTGGCTGTGAGGCAAAGCG R- AAACCACTGGCTTAGATGAACTGG	Transkriptionsfaktor
30	erb A	F- CGCCGCACAARCCAGAAGAATCTC R- GGGGTGATGATCTTGGTAAACTCGC	Rezeptor
31	FADD	F- TGCAGGTGGCATTGACATTG R- CACAGATTCCTGGGCTTCTTCC	Apoptose
32	Fas-Antigen	F- TTGAGGACTGCAAAATGAATGGGG R- CAACAACCATAGGCGATTTCTGGG	Apoptose
33	Fas-Ligand	F- TGCAGAAGGAACTGGCAGAACTCC R- TGTGGTTTAGGGGCTGGTTGTTGC	Apoptose
34	c-fos	F- TGCCTTGCAGACTGAGATTGC R- TTGACTGGCTCCAAGGATGGCTTG	Transkriptionsfaktor / Protoonkogen
35	Gadd 45	F- GTTTTAGAAAGAACCGTGCTGTC R- ACCTCCCTCCAAGCATGTACC	DNA-Schadensindikat.
36	GRP Rez.	F- AGCTGCTTTGATCTGGATTGTCTC R- GGGAAGATTGTAGGCACTCTGAATC	Bombesin-Rezeptor
37	HGF (=SCF)	F- GCATGACCTGCAATGGTGAAAGC R- GAGCAGTAGCCAACCTCGGATGTTTG	Wachstumsfaktor
38	c-jun	F- GCAATGGGCACATCACTACTACAC R- TGAAGTTGCTGAGGTTGGCGTAGAC	Transkriptionsfaktor / Protoonkogen

#	Name	Primer 5' -> 3'	Funktion
39	ket (p63)	F- GGCGGTGCTCGACTGCTGG R- CACAGTACACGAACCTGG	p53 Homologes
40	mad	F- TGAAATGGAAAAGAAGCAGGCGTGC R- TTGTCAGCAAGCTCAGAGTGGTGTG	Max Repressor
41	max	F- GCTTGCAGAGTTTCAATCTGCGG R- GGCGTTGGTGTAGAGGCT	c-myc Interaktion
42	mdm 2	F- GACGAGAAGCAGCAGCACATTGTG R- CACCAGAATGCTCACTTACGCCAGC	Negat. Regulator p53
43	mdm x	F- TCCATAGTGTGATCCTGTGCGAG R- TTCAGCATCTGACAGTGCTTGC	Negat. Regulator p53
44	met (HGF R)	F- CGGTTTCATCAATTTCTTTGTGGGG R- AGGGGCATTTCCATGTAGGAGTGC	Rezeptor
45	miz 1	F- GGAAAAATGAGGCTGACAATCCCG R- TGCTTGCATCACTGGCTACAGTCAC	c-myc Interaktion
46	Mnt	F- TAGTGACCAATTCGCCGAGTCTC R- TTTGTTGTGGACTTCTCTGGTTCCG	myc Antagonist
47	Mxi	F- ACAGAAACACAGCAGTGGAAGCAGC R- TTCGTATCCGCTCCATCTCCTGAG	max Interaktion
48	Myb	F- CAGAAATATGGTCCGAAGCGTTGG R- CATGCCCAAACCCCATCAAATG	Transkriptionsfaktor / Protoonkogen
49	c-myc	F- TTTCATCTGCGACGAGGAAGAG R- AAGACCACTGAGGGGTCAATGCAC	Transkriptionsfaktor / Protoonkogen
50	l-myc	F- CCCAAAGTCGTGATCCTCAGCAAG R- TCGAGGTTACCAAGAATGCAAGCC	Transkriptionsfaktor / Protoonkogen
51	n-myc	F- TGGAAGAAGTTTGAGCTGCTGCCC R- TCCACATGCAGTCCTGAAGGATGAC	Transkriptionsfaktor / Protoonkogen
52	PDGF R	F- TCAGACGGATGAGAGTGAGATCG R- GTCTTGAACGTCCCTCCCTTTGAC	Rezeptor
53	p 15	F- CAGAGCTGCTGCTGCTCCAC R- CCCAGGCGTCACACACATCC	cdk4/cdk6 Inhibitor
54	p 16	F- AACTGCGAGGACCCACTACCTCC R- CGGTACACAAAGACCACCCAGC	cdk4/cdk6 Inhibitor
55	p 19 ^{ARF}	F- TGATGTTTGGAAGTCCAGCAGTTGC R- TCCCTGTGGTGGAGATCAGATTCAG	cdk4/cdk6 Inhibitor
56	p 21	F- TGTTCCGCACAGGAGCAAAG R- TCAGACACCAGAGTGCAAGACAGC	Zellzyklus-Regulator
57	p 27	F- CAGATACGAATGGCAGGAGGTGGAG R- AGGTGCTTCCTCATCCCTGGACAC	Zellzyklus-Regulator

#	Name	Primer 5' -> 3'	Funktion
58	p 42	F- TTGAAGACACAGCACCTCAGCAATG R- GGCACCTTATTTTTGTGCGGGAG	MAP-Kinase
59	p 73	F- GGTCCCTGACCAGTACCGTAG R- GTTGGGGATCGTGATGG	p53 homologes
60	p 53	F- GCGGTCAGCGGTTTCATGCC R- GTGATTCCCGAGTATCTGG	Tumorsuppressor
61	p 107	F- CGCAAGAGCATCATTCTACTGTGG R- GCAAAGATCAGGTCCAAGCAGCAC	c-myc Repressor
63	Ha-ras	F- CGGAAACAGGTGGTCATTGATG R- AAATACACAGAGGAAGCCCTCCCC	Signaltransmitter
64	K-ras	F- AAACCTTGTGGTGGTTGGAGCTTGC R- AAACCTTGTGGTGGTTGGAGCTG	Signaltransmitter
65	RIP	F- ACCCTTTACTACATGGCACCCGAAC R- TGCACACTGCGATCATTCTCGTCC	Apoptose
66	RB	F- GCAAATTAGAACGGACGTGTGAAC R- TTCTGGGTGTTTCGAGGTGAACC	Tumorsuppressor
67	SP A	F- GCAGTGTGATTGGGTAAGACACCAG R- CAACAGTCAAGAAGAGGGTGAAGGC	Surfactant Protein
68	SP B	F- CCAAAGCCATCTGCAATCATGTAG R- AGGGGAATGGGGAGCTGTTG	Surfactant Protein
69	SP C	F- CACTACCCACTTGTCTCTCTGCTTC R- ATCCCCCATAATCTCCCCCAA	Surfactant Protein
70	c-src	F- CATGCGAGCAAGCTGAGCATTG R- ATAGTCCACCAAACCTCCCCTTGGC	Proteinkinase
71	TAg	F- CTTGAAAGGAGTGCCTGGGG R- GAGTCAGCAGTAGCCTCATCATCAC	Viraler p53 Repressor
72	TEF1/Trap1	F- ACGGGAAAGACAAGGACCAGGAAG R- CTCTGCTGTTCAAGGAAAGCGGAG	c-myc Interaktion
73	TF II	F- CGCAACCTTGAAGTGGATTTTG R- TGCTCTTTAGCCTCTTGGTGGGTG	Transkriptionsfaktor
74	TGF alpha	F- ACTTCAACAAGTGCCAGATTCCC R- ACTCACAGTGTTCGCGGAGCTGAC	Wachstumsfaktor
75	TGFbeta	F- ACCTGCAAGACCATCGACATGG R- TTGTTGCGGTCCACCATTAGCACG	Wachstumsfaktor
76	TGFbeta R	F- AGCATCTACGATGGCTTCCACG R- TCGTCTCTTAAACTTCCTGAGAGC	Wachstumsfaktor- Rezeptor
77	TNF alpha	F- AGTTCCCAA TGGCCTCCCT R- CCTACGACGTGGGCTACAGG	Ligand

#	Name	Primer 5' -> 3'	Funktion
78	TNF R	F- CCCCAAGGAAAGTATGTCCATTC R- CAGGTAGCGTTGGAAGTGGTTC	Wachstumsfaktor Rezeptor
79	VHL	F- CCAATAATGC CCCGGAAGGC R- CCAGGTGCTGACTCTCAAGGTGC	Tumorsuppressor
80	Ubiquitin	F- AGAGTCAACCCTGCACCTGGTCCTC R- CACATTCTCGATGGTGTCACTG	Marker (Zellabbau)
81	Uterogloblin	F- CGCCATCACAATCACTGTGGTC R- AGAGGACTTGTTAGGATTTTCTCCG	Clara-Zellmarker
82	YY 1	F- CTGGAGGTTGATAACTTTGCTTGCG R- CAGCATCTGGCAGTATTTTTTGGGG	Transkriptionsfaktor

Tab. 2.1 – Die Tabelle zeigt alle cDNA-Klone, die auf den Filtern zur Untersuchung der differentiellen Genexpression eingesetzt worden sind. Alle Klone wurden in den Vektor pGEM T Easy kloniert.

2.2.6.1 Quantifizierung

Für die Quantifizierung der Autoradiogramme wurden diese mit einem handelsüblichen Scanner eingelese (800 ppi) und mittels ebenfalls handelsüblicher Bildbearbeitungs-Software invertiert und in ein 16 Bit-Format überführt. Die Auswertung der so editierten Bilder wurde mit Genepix Software (Axon Instr.) durchgeführt. Diese Software vermisst Helligkeits-Intensitäten und erlaubt die freie Definition einer Gitter-Matrix, die über die Signal-Spots des Bildes gelegt werden konnte. Die auf diese Weise vordefinierten Meßbereiche konnten für jeden Spot individuell nachbearbeitet und -positioniert werden.

Für jeden Spot wurden zwei Datensätze generiert. Zum einen ein Meßpunkt aus dem Kernbereich des Spots, zum anderen einer aus dem Randbereich des Spots, um den individuellen Hintergrund des Spots zu erfassen. Zur Bestimmung der individuellen Signalintensität wurde vom mittleren Helligkeits-Signal des ersten Datensatzes der mittlere Hintergrundwert des zweiten Datensatzes abgezogen und so ein um den Hintergrund bereinigter Datensatz erstellt.

Um Blots aus verschiedenen Hybridisierungen untereinander vergleichbar zu machen, wurden die Signal-Intensitäten jedes Spots eines Filters aufaddiert und gemittelt. Diesem Vorgehen wurde die Annahme zu Grunde gelegt, daß sich die Expressionsstärke aller betrachteten Gene in den drei untersuchten Zelllinien im Mittel nicht stark verändert. Aus den Mittelwerten der 'Over-all'-Intensität verschiedener Filter wurden durch Verhältnisbildung Normalisierungskoeffizienten errechnet. Diese sollten die aus der Markierungs-Effizienz und anderen versuchsbedingten Variablen resultierenden, spezifischen Unterschiede in der Hybridisierungseffizienz ausgleichen.

2.2.6.2 Qualitätskontrollen

Pro cDNA-Klon waren auf jedem Filter zwei Proben gespottet. Diese wurden für die Kontrolle der Qualität individueller Hybridisierungsexperimente eingesetzt, indem die Hintergrund-bereinigten Signal-Werte der beiden Spots gegeneinander verglichen wurden. Die Mittelwerte der beiden Spots wurden wiederum mit denen der gleichen cDNA-Probe eines Schwester-Filters aus einem anderen Hybridisierung verglichen, um die Reproduzierbarkeit des Experimentes zu überprüfen.

Zu diesem Zweck wurden die Hintergrund-bereinigten Werte der Spots jeweils gegen den Schwester-Spot in einem Scatter-Plot aufgetragen und das Bestimmtheitsmaß ermittelt.

2.2.6.3 Auswertung

Die normalisierten, d.h. um den, wie in 2.2.6.1 beschrieben bestimmten, Normalisierungskoeffizienten multiplizierten, Intensitätswerte zweier unabhängiger Experimente des gleichen Filter- und mRNA-Pool-Typs wurden gemittelt und zur Verhältnisbildung mit einem gleichartig ermittelten Wert herangezogen, der aus der Hybridisierung mit einem anderen mRNA-Pool stammte. Das aus den beiden Werten resultierende Ergebnis wurde gegen die Basis zwei logarithmiert und in einem Diagramm aufgetragen. Gene, deren Werte über das doppelte der Standardabweichung aller logarithmierten Verhältniswerte (Ratios) ihres Klonsatzes (Filter I bzw. Filter II) hinausgingen, wurden als über- bzw. unterexprimiert definiert.

3. ERGEBNISSE

3.1 Die Rolle synergistischer Effekte von Onkogenen und des Tumorsuppressors p53 bei der murinen Adenokarzinogenese

Die Entwicklung von Tumoren geht mit einer mehrstufigen Akkumulation von genetischen Defekten in einer einzelnen Zelle bzw. den von ihr abstammenden Klonen einher. Jede dieser genetischen Alterationen kann zu einer Veränderung in der Wachstumskontrolle einer Zelle führen (z.B. dauerhafte Induktion zellulären Wachstums, Verlust der Fähigkeit zur Apoptose). Meist ist sie jedoch nicht alleine die kausale Ursache für die Entstehung eines Tumors, weil die Zelle oft in der Lage ist, einzelne Defekte durch redundante Funktionen zu kompensieren. Im Verlauf der Tumorigenese führt die Akkumulation von genetischen Defekten zunächst zu selektivem und unreguliertem Wachstum der Zelle und später zu invasivem Wuchern und damit zur Metastasierung.

Für therapeutische Ansätze ist es wichtig, für die Tumor-Promotion kausale Zusammenhänge zu verstehen. Diese können z.B. durch den Einsatz transgener Tiere oder Zellkultur-Modelle und der Analyse der in Tumoren bzw. tumorigenen Zellen erfolgten Veränderungen regulatorischer Prozesse untersucht werden. Tiermodelle bieten dabei gegenüber Zellkultur-Modellen den Vorteil, pathogene Prozesse *in vivo*, d.h. in Wechselwirkung mit gesundem Gewebe beobachten zu können.

In Arbeiten von A. Geick und A. Erhardt sind transgene Mauslinien als Mausmodelle für humane Lungenadenokarzinome etabliert worden. Diese exprimieren konstitutiv unter der jeweiligen Kontrolle AT II- und Clara-Zell-spezifischer Promotoren (SP-C bzw. Uteroglobulin) Protoonkogene (c-myc, IgEGF, Cyclin D1), deren Überexpression in humanen Lungentumoren bereits gezeigt worden ist. Nicht alle diese transgenen Mauslinien wiesen die erwarteten Tumoren im bronchioloalveolaren Epithel der Lunge auf. Zum Teil entwickelten die Tiere lediglich Hyperplasien oder zeigten keinerlei Phänotyp.

In Tabelle 3.1 sind die transgenen Linien, die für diese Arbeit Verwendung fanden und ihr jeweiliger Lungen-Phänotyp aufgelistet:

Strukturgen	Promotoren	
	Uteroglobulin	SP-C
<i>c-myc</i>	Cystische Nieren; Selten: Bronchioläre Hyperplasien	Bronchio-alveoläre Adenokarzinome
<i>EGF</i>	Kein Lungen-Phänotyp	Hyperplasien der Lunge
<i>Cyclin D1</i>	Sehr spät: Adenokarzinome der Lunge	

Tab. 3.1: Phänotyp der verfügbaren transgenen Linien – Mit Ausnahme der SPC-*c-myc*-Linie entwickeln die Tiere Tumore erst im hohen Lebensalter oder gar nicht. Daraus läßt sich ableiten, daß weitere Defekte zur transgen-induzierten Alteration hinzutreten müssen, damit es zur Tumorentwicklung kommt.

Um das Zusammenwirken der einzelnen Transgen-simulierten Deregulationen zu untersuchen, wurden die verschiedenen transgenen Linien eines Zielzelltyps miteinander verpaart. Außerdem wurde durch Einkreuzung von p53-Knock Out (K.O.)-Mäusen die Rolle dieses Tumorsuppressors bei der Adenokarzinogenese untersucht.

3.1.1 Lebensalter *c-myc* / IgEGF doppelt-transgener Mäuse

Die Untersuchung der Lebenserwartung doppelt-transgener Mäuse, die sowohl IgEGF als auch *c-myc* in den beiden Ziel-Zelltypen (Clara-; AT II-Zellen) exprimieren, führten zu den in Abbildung 3.1 dargestellten Ergebnissen. Die transgenen Tiere wurden bei akutem Krankheitsbild auf Grund der tierschutzrechtlichen Bestimmungen getötet, das Lebensalter wurde notiert und soweit möglich eine Obduktion vorgenommen. Es wurden Gewebeproben genommen, die stichprobenartig einer histologischen Untersuchung unterzogen wurden.

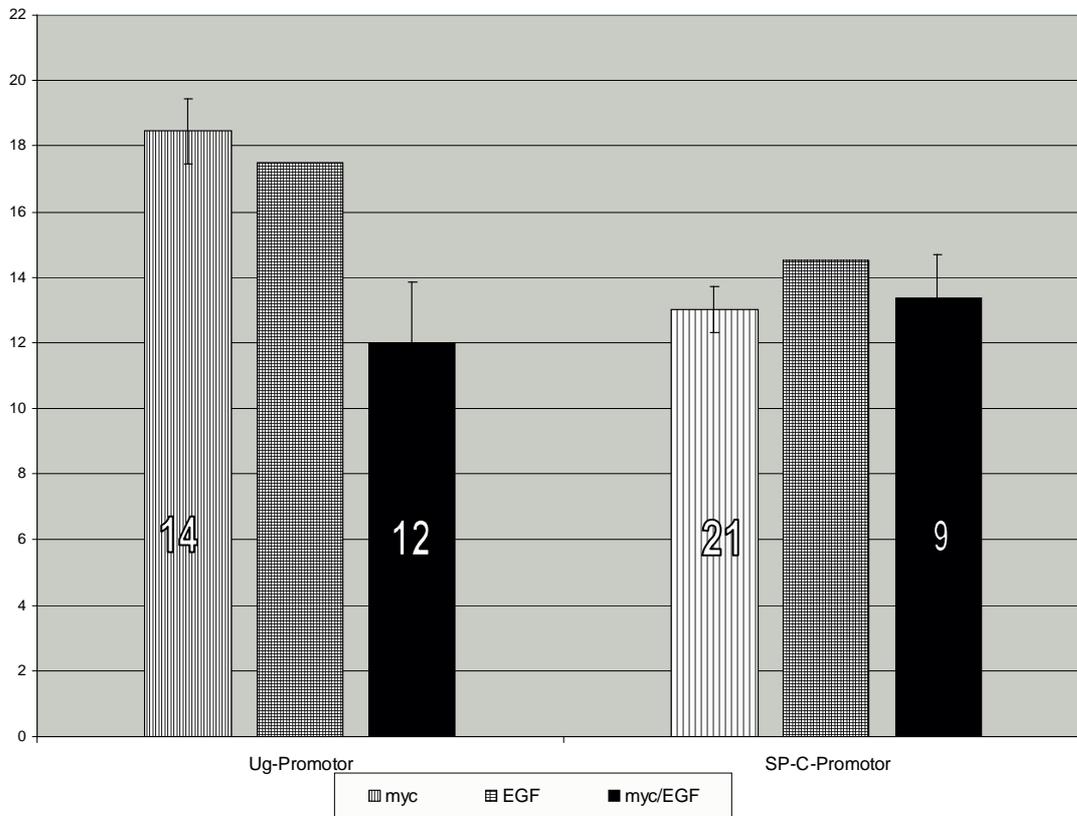


Abb. 3.1: Mittleres Lebensalter c-myc /IgEGF doppelt-transgener Tiere in Monaten – Aufgetragen sind die mittleren Lebensalter (in Monaten) von einfach-transgenen Tieren beider Promotorentypen im Vergleich mit denen doppelt-transgener Tiere, die aus Verpaarungen dieser beiden Linien hervorgegangen sind. Die Anzahl der erfassten Tiere wird durch die jeweilige Zahl in den Balken wiedergegeben. Die Fehlerbalken geben den mittleren Fehler der Standardabweichung der jeweils erfassten Werte an. Bei den EGF-Tieren wurde z.T. auf Daten der Vorgängerarbeiten (Geick, 1998; Erhardt, 1998) zurückgegriffen, da Tiere aus eigenen Verpaarungen im Untersuchungszeitraum nicht das Ende ihrer Lebenserwartung erreichten.

Bei den doppelt-transgenen Tieren der Ug-Promotor-Linie liegt das mittlere erreichte Lebensalter der Mäuse sechs Monate niedriger als bei den parental Genen. Bei den Tieren der SP-C-Promotor-Linien ergibt sich diese Differenz nicht.

3.1.2 Pathologie *c-myc* / *IgEGF* doppelt-transgener Mäuse

Von den neun erfassten SPC-*c-myc*/*IgEGF*-transgenen Tieren wurden acht obduziert und bei sieben von ihnen ein Lungentumor festgestellt. Stichprobenartig wurden Lungengewebebeispiele von drei Tieren histologisch untersucht und papilläre Karzinome ebenso festgestellt, wie Dysplasien der AT II –Zellen und Hyperplasien von Clara-Zellen im Bronchioloalveolar-Raum (Abb. 3.2 und 3.3).

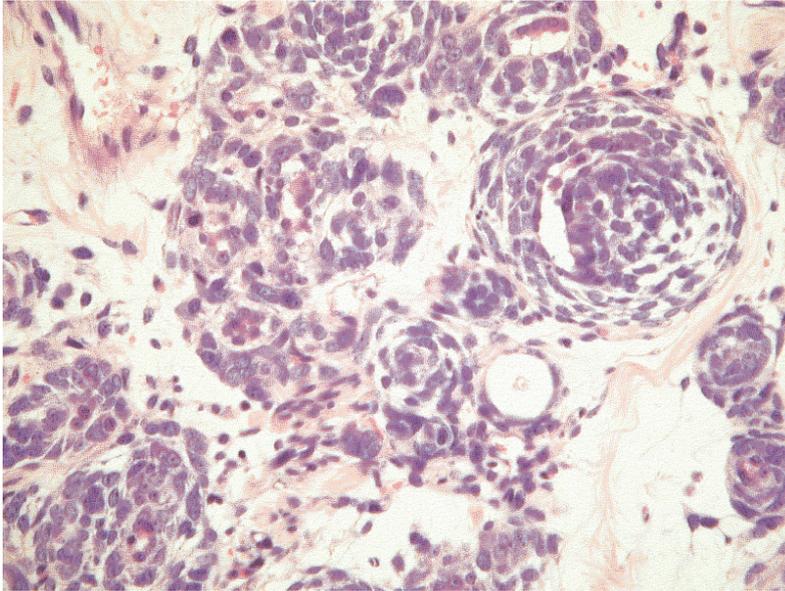


Abb. 3.2 – Solides Karzinom aus der Lunge eines SPC-*c-myc*/*EGF*-transgenen Tieres

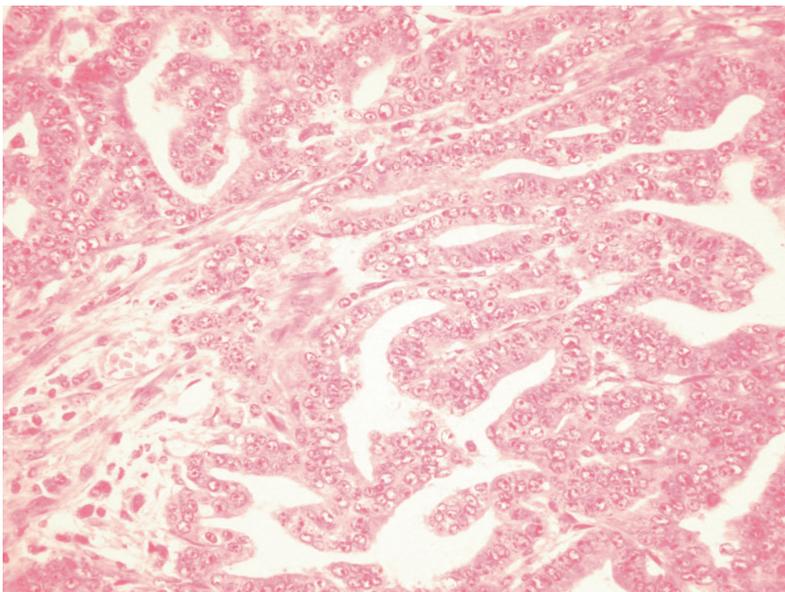


Abb. 3.3 – Papilläres Karzinom aus der Lunge eines SPC-*c-myc*/*IgEGF* transgenen Tieres

Bei den einfach-transgenen Stammlinien zeigten 13 von 18 (SPC-c-myc) untersuchten und bei der Ug-c-myc Linie 5 von 11 Tieren eine pathologische Veränderung der Lunge. Bei den Ug-c-myc/IgEGF-transgenen Tieren wies nur eines von drei obduzierten Tieren eine Veränderung der Lunge auf.

3.1.3 Lebensalter Cyclin D1 / c-myc bzw. Cyclin D1 / IgEGF –transgener Mäuse

Eine Cyclin D1-transgene Linie stand nur für den Ug-Promotor zur Verfügung. Diese wurde mit den c-myc- und IgEGF transgenen Linien des selben Promotortyps verpaart und die Daten wie für die c-myc / IgEGF-doppelt-transgenen Tiere ermittelt.

Das mittlere Lebensalter der aus den Verpaarungen hervorgegangenen mehrfach transgenen Maus-Linien ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

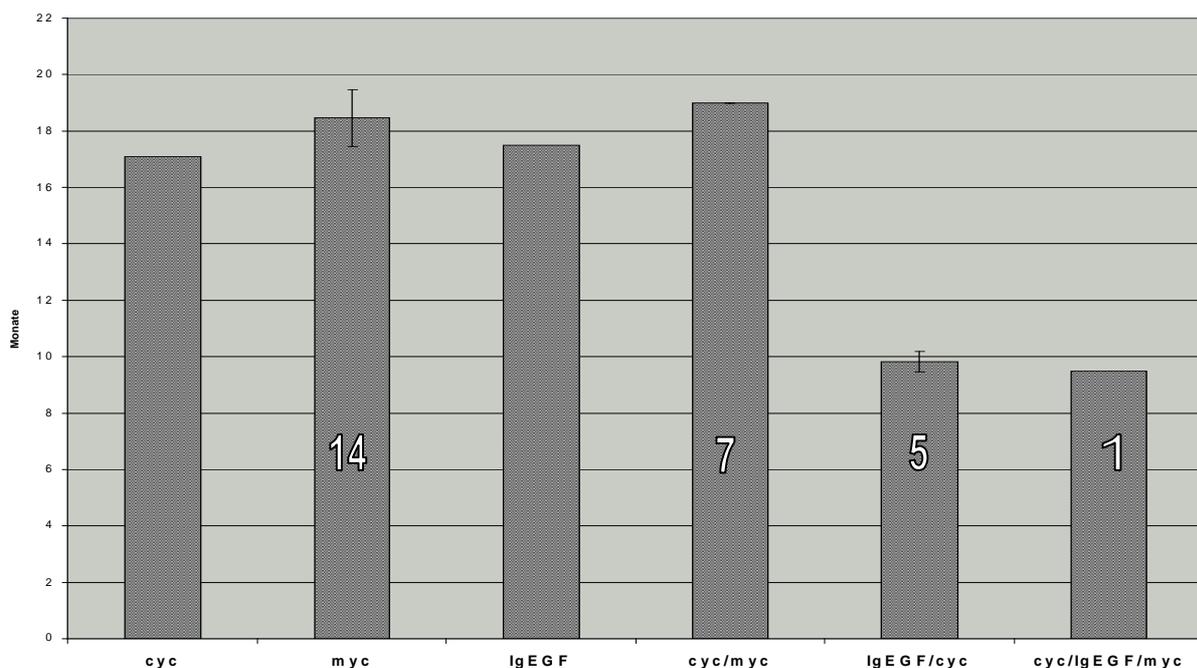


Abb. 3.4: Mittleres Lebensalter Ug-Cyclin D1 / c-myc bzw. IgEGF doppelt-transgener Mäuse. Die Daten der Stammlinien (Cyclin D1; c-myc und IgEGF) sind zum Vergleich dargestellt. Die Anzahl der erfassten Tiere ist in weißen Lettern in den jeweiligen Balken angegeben. Bei den IgEGF- und Cyclin D1-Tieren wurde auf Daten der Vorgängerarbeiten (Geick, 1998) zurückgegriffen. Das mittlere Lebensalter der IgEGF / Cyclin D1 doppelt-transgenen Tiere ist im Vergleich zu den Zuchtlinien deutlich verkürzt. Fehlerbalken geben den mittleren Fehler der Standardabweichung an.

Während bei der Cyclin D1 / c-myc-transgenen Linie eine Lebenszeit-Verkürzung nicht festzustellen war, zeigten die Tiere der Cyclin D1 / IgEGF-Linie eine deutlich verkürzte Lebensdauer. Im Vergleich zu den durchschnittlich 16-18 Monaten (Geick,

1998) Lebenserwartung der Cyclin D1- bzw. IgEGF-Stammlinien war die Lebenserwartung der Cyclin D1 / IgEGF-doppelt-transgenen Linie um ca. 7 Monaten reduziert. Gleiches gilt für das Cyclin D1 / IgEGF / c-myc-dreifach transgene Tier.

3.1.4 Pathologie Cyclin D1 / c-myc bzw. Cyclin D1 / IgEGF –transgener Mäuse

Die einfach-transgenen Stammlinien, aus denen die Cyclin D1 / c-myc-transgenen und Cyclin D1 / IgEGF- Tiere hervorgingen, wiesen entweder keine oder erst in hohem Lebensalter Anomalien in der Lunge auf.

Dahingegen zeigten Gewebeproben aus drei von drei obduzierten Ug-Cyclin D1 / IgEGF-transgenen Tieren gemischte bronchio-alveoläre Hyperplasien, also Hyperplasien von AT II sowie Clara-Zellen.

Gewebe aus Cyclin D1 / c-myc-transgenen Tieren wurde nicht untersucht, da die Tiere ein hohes Lebensalter von 21,5 Monaten erreichten.

3.1.5 Rolle von p53-Defizienz in der Lungenkarzinogenese mehrfach-transgener Mäuse

Die Einkreuzung der oben beschriebenen transgenen Linien in den p53- Knock Out-Hintergrund erwies sich aus zweierlei Gründen als problematisch.

Zum einen resultierte die häufig niedrige Zahl der untersuchten Tiere (s. Abb. 3.5 und 3.6) aus der geringen Größe der aus den Verpaarungen mit p53- $-/-$ -Tieren hervorgegangenen Würfe (1-5 Junge). Die Ursachen hierfür konnten in dieser Arbeit nicht untersucht werden.

Zum anderen war festzustellen, daß alle p53 $-/-$ Tiere im Alter zwischen 4 bis 7 Monaten starben. Aus der Literatur ergibt sich, daß p53 ($-/-$) Tiere i.d.R. nach 6 Monaten spontane Tumore (meist Lymphome) entwickeln, wohingegen Tiere mit nur einem deletierten p53-Allel spontane Tumorbildung nur selten vor dem neunten Lebensmonat entwickeln, jedoch eine klare Prädisposition für verschiedene Tumortypen besitzen (Donehower *et al.*, 1992).

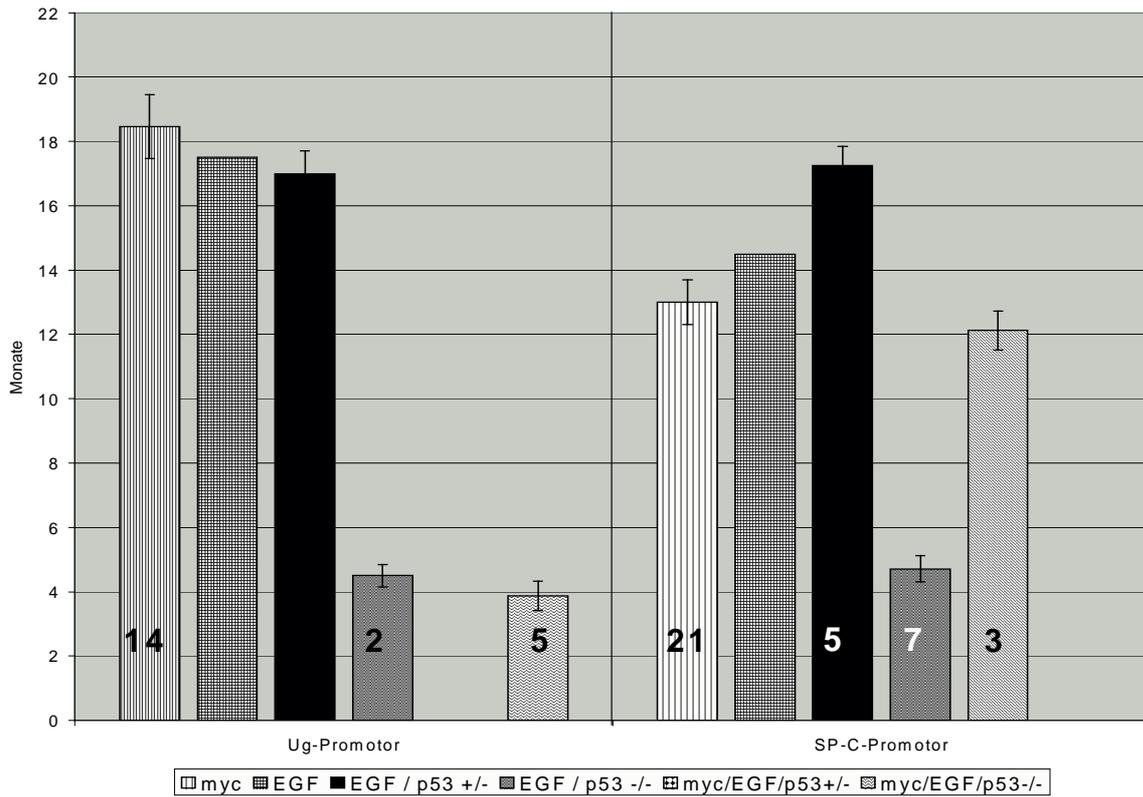


Abb. 3.5 - Die Abbildung zeigt die mittleren Lebensalter von c-myc bzw. IgEGF-transgenen Tieren mit hetero- bzw. homozygoter Deletion der p53-Allele im Vergleich mit den Daten der einfach-transgenen Stammlinien. Daten für Cyclin D1- und EGF-Tiere von Geick (1998) und Ehrhardt (1998). Fehlerbalken geben den mittleren Fehler der Standardabweichung an.

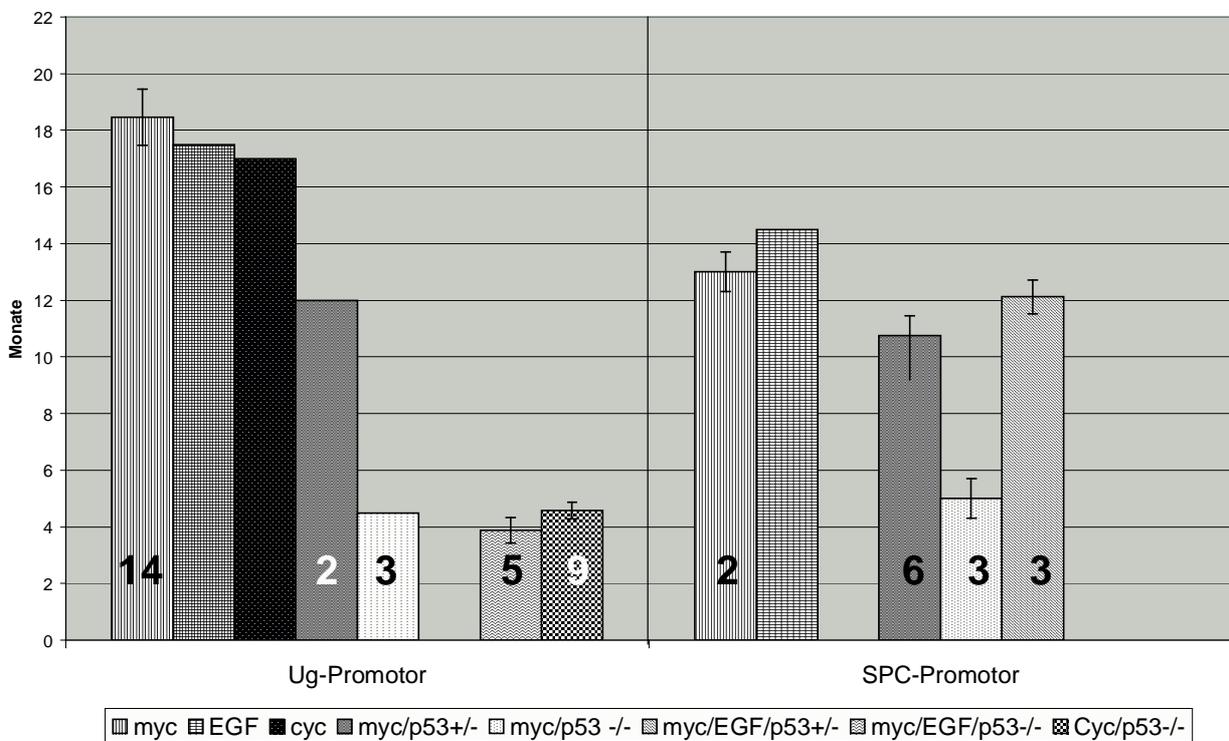


Abb. 3.6 – Dargestellt sind die mittleren Lebensalter c-myc-transgener Tiere im homo- bzw. heterozygoten p53 K.O.-Hintergrund. Die mittlere Lebensdauer der c-myc/p53+/- -Tiere ist im Vergleich mit der c-myc Stamm-Linie verkürzt. Die Daten der EGF und Cyclin D1-Mauslinien wurden als Kontrollen aus anderen Arbeiten übernommen (Geick, 1998; Ehrhardt, 1998).

Die Daten ließen eine signifikante Lebenszeitverkürzung nur bei den Ug-transgenen und dort bei den Ug-c-myc/p53 +/- -Tieren erkennen. Diese weisen im Vergleich mit den Tieren der Linie Ug-c-myc eine um 6,5 Monate kürzere Lebensdauer auf. Die Lebensdauer von SPC-c-myc/IgEGF/p53 +/- - Tieren und SPC-c-myc/ p53 +/- - Tieren ist nicht bzw. nicht signifikant reduziert.

3.1.6 Pathologie von p53-defizienten transgenen Mäusen

In drei 3 von 5 obduzierten SPC-IgEGF / p53 +/- Tieren und in 3 von 7 SPC-IgEGF / p53 -/- Tieren konnten pathogene Veränderungen der Lunge (Hyperplasien, Adenome, Karzinome) nachgewiesen werden. Die SPC-IgEGF Stammlinie zeigte nur bei einem von 4 obduzierten Tieren diesen Effekt. Bei den SPC-c-myc / p53 +/- zeigten 3 von 5, bei den SPC-c-myc / p53 -/- 2 von 3 obduzierten Tieren Veränderungen und 13 von 18 obduzierten Tieren der einfach-transgenen SPC-c-myc Linie wiesen pathogene Veränderungen auf.

Von Ug-c-myc / p53 +/- Tiere konnte nur ein Tier obduziert werden, dieses wies eine Hyperplasie der Lunge auf. Bei Ug-c-myc / p53 -/- Tieren konnte für zwei von zwei Tieren eine hyperplastische Veränderung der Lunge diagnostiziert werden. Die Verhältnisse bei den Ug-IgEGF / p53 +/- Tiere betragen 0/1 und bei Ug-IgEGF / p53 -/- 1/1.

Ug-Cyclin D1 / p53 +/- Tiere wurden nicht obduziert, da diese Tiere nicht erkrankten. Die Ug-Cyclin D1 / p53 -/- Tiere waren jedoch in 3 von 3 Fällen von einer pathologischen Veränderung der Lunge betroffen.

3.1.7 Zusammenfassung

Bei der Mehrzahl der untersuchten Mauslinien schien es keine Effekte auf die Lebenserwartung zu geben, die durch mehrfach transgene-Prädisposition befördert wurden.

Es wurden jedoch bei den transgenen Linien Ug-c-myc / IgEGF; Ug-c-myc / Cyclin D1 und Ug-c-myc / p53 +/- signifikante Verkürzungen der Lebensdauer festgestellt. Allerdings konnte in einigen Linien eine erhöhte Inzidenz von pathologischen Veränderungen der Lunge (Neoplasien, Adenome, Karzinome) diagnostiziert werden. Teilweise sind Tiere plötzlich ohne vorherige Morbiditäts-Symptome über Nacht gestorben. Dies führte dazu, daß in diesen Fällen keine Obduktion

durchgeführt werden konnte, woraus eine Reduktion der für die Statistik verfügbaren Daten resultierte.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.2 noch einmal zusammengefaßt:

	Promotor			
	Uteroglobin		SPC	
	Lebenserw.	Neoplasien	Lebenserw.	Neoplasien
<i>c-myc/EGF</i>	- 60 %	1 von 3	k.V.	7 von 8
<i>c-myc/Cyclin D1</i>	k.V.	0 von 5		
<i>EGF/Cyclin D1</i>	- 40 %	3 von 3		
<i>c-myc/EGF/ Cyclin D1</i>	k.V.	n.d.		
<i>c-myc/p53 +/-</i>	- 30 %	1 von 1	k.V.	3 von 5
<i>c-myc p53 -/-</i>	k.V.	2 von 2	k.V.	2 von 3
<i>EGF/p53 +/-</i>	k.V.	0 von 1	k.V.	3 von 5
<i>EGF/p53 -/-</i>	k.V.	1 von 1	k.V.	3 von 7
<i>c-myc/EGF/p53 +/-</i>	n.d.	n.d.	k.V.	3 von 3
<i>c-myc/EGF/p53 -/-</i>	k.V.	3 von 4	n.d.	n.d.
<i>Cyclin D1/p53 -/-</i>	k.V.	3 von 3		

Tab. 3.2 – Lebenserwartungs-reduzierende Effekte in mehrfach transgenen Mauslinien als Modelle für Lungenadenokarzinom-Tumorigenese: Zahlenwerte in der Spalte für die Lebenserwartung geben die Reduzierung der Lebenserwartung in Prozent wieder; n.d. = nicht durchgeführt; k.V. = keine Verkürzung der Lebenserwartung; x von y = x von y obduzierten Tieren zeigten pathogene Veränderungen der Lunge.

Von 25 histologisch untersuchten Gewebeproben (14 aus Ug-, 11 aus SPC-transgenen Tieren) wiesen die meisten Veränderungen sowohl in AT II als auch in Clara-Zellen auf. Nur in einem Fall konnten isolierte Veränderungen der AT II-Zellen gefunden werden. Dies jedoch in einer Gewebeprobe aus einer Ug-Cyclin D1-transgenen Maus, in der eigentlich Veränderungen von Clara-Zellen erwartet worden wären. Zugleich wurden in den 11 Gewebeproben aus SPC-transgenen Tieren zwei bronchio-alveoläre Hyperplasien aus Clara-Zellen, drei papilläre Karzinome und ein papilläres bronchiales Adenom diagnostiziert.

3.2 Etablierung und Charakterisierung von Clara-Zelllinien

Die Entstehung eines Tumors geht in der Regel auf die Entartung einer einzelnen Zelle zurück. Tumore sind häufig, abgesehen von den gemeinsamen Eigenschaften tumorigener Zellen, in ihrem physiologischen und morphologischen Erscheinungsbild vom Ursprungszelltyp (klonaler Tumor) geprägt. Es wird angenommen, daß die kausalen Zusammenhänge der tumorigenen Entartung z.B. einer Zelle des Darmepithels von denen einer Zelle des Lungenepithels verschieden ist. Dies hängt mit den verschiedenen „Programmen“ zur Zelldifferenzierung zusammen, die die Zelle in ihrem Gewebekontext zur Erfüllung ihrer sehr spezifischen Aufgaben befähigt.

Gerade in Mischgeweben, wie der Lunge, ist es anders als z.B. in der Leber schwierig, die Ursachen von Tumorerkrankungen und toxischen Wirkungen auf den einzelnen Zelltyp auf der molekularen Ebene zu untersuchen. Zugleich gibt es ein großes Interesse an Modellen für Wirkstoff-Transport und Metabolismus im Lungenepithel (Forbes, 2000). Daher werden seit langem Versuche unternommen, bestimmte Zelltypen in hohem Reinheitsgrad aus Mischgeweben wie der Lunge zu isolieren (Devereux *et al.*, 1984; Patton *et al.*, 1986; Massey *et al.*, 1987; Masuda *et al.*, 1997).

Zellen mit hohem Spezialisierungsgrad sind in ihrer Differenzierung abhängig von ihrer Umgebung, z.B. exokrinen Stimuli und der Verfügbarkeit einer spezifischen Extrazellulären Matrix (Forbes, 2000). Zellen isoliert, d.h. *ex vivo* zu untersuchen, bedeutet auch bei hochspezifischen Kulturbedingungen, daß graduelle bis totale Dedifferenzierung der *in vitro*-kultivierten Zellen bereits nach wenigen Stunden in Kauf genommen werden muß. In der Regel sterben Primärzellen nach wenigen Tagen in Kultur ab oder verlieren durch Dedifferenzierung ihre typischen Eigenschaften.

Für toxikologische und tumorbiologische Untersuchungen bedeutet dies einen hohen Verbrauch an Versuchstieren und Arbeitszeit. Abhilfe können hierbei spezifische, gut charakterisierte und immortale Zelllinien schaffen.

In dieser Arbeit wurde daher angestrebt, für einen der Ursprungszelltypen von NSCLCs, die Clara-Zelle, immortale Zelllinien zu etablieren. Hierfür wurden transgene Mäuse benutzt, die unter der Kontrolle des Kaninchen-Uteroglobulin-Promotors das large T-Antigen (TA_g) des Simian Virus 40 (SV40) zelltypspezifisch in

Clara-Zellen exprimieren (Sandmüller *et al.*, 1994 und 1995). Das T-Antigen-Genprodukt interagiert mit den p53 und RB-Genprodukten und inaktiviert diese. Aus diesem Grund wird oft SV40 T-Ag in primäre Zellen transfiziert, um diese zu immortalisieren (Masuda, 1997). Dieses Prinzip wurde genutzt, um aus einem heterogenen Gemisch primärer Lungenzellen Clara-Zellen zu selektionieren.

3.2.1 Etablierte, transgene Zelllinien

Die Lungen der SV40 TAg-transgenen Tiere wurden, wie unter 2.2.4.1 beschrieben, freigelegt, über die Trachea gespült und mit einer Dispase II-Lösung gefüllt. Auf diese Weise wurden Zellen des Lungenepithels aus dem Gewebeverband gelöst und in Primärkultur genommen. Es wurden verschiedene Ansätze unter Nutzung unterschiedlicher Matrix-Substanzen (Fibronectin, Collagen und unbeschichtetes Plastik) verwendet. Schließlich gingen aus den Kultivierungsansätzen zwei heterogene Zelllinien hervor (Mouse Bronchiolar Epithelial Cell Line [MBECL] #5 und #7), die auch nach der zwanzigsten Passage noch proliferierten und auch auf unbeschichtetem Plastik wuchsen. Eine der Zelllinien (MBECL #5) wurde einer Klonierung unterzogen. Dadurch konnten sechs verschiedene, klonale Linien, die aus einzelnen Zelle hervorgegangen waren, herangezogen werden. Auf diese Weise standen zu Beginn insgesamt sieben Zelllinien (MBECL #5/A bis F und #7) zur Verfügung. Im Verlauf der Untersuchungen wurden auf Grund der Zwischenergebnisse die Experimente auf einige der Linien beschränkt.

Die Zelllinien wurden zunächst auf Integration des SV40-TAg in das Genom und die Expression des Transgens getestet (s. Tab. 3.3).

	5/A	5/D	5/E	5/F	7	CD2F-1 Lunge
<i>TAg genom.</i>	+	+	+	+	+	-
<i>TAg mRNA</i>	-	-	-	-	-	-

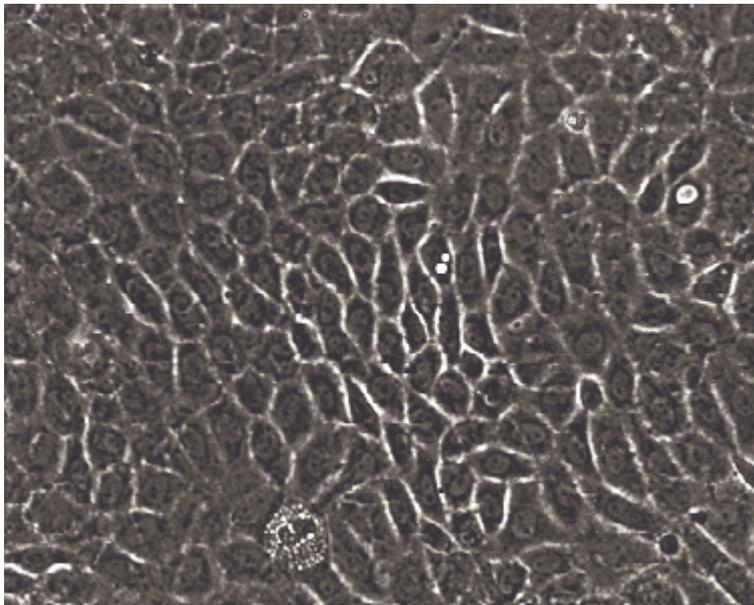
Tab. 3.3 – Genom-Integration und Expression von SV 40-Tag. Es wurden PCR- und RT-PCR- Reaktionen mit genomischer DNA sowie mit RNA durchgeführt. + Signal; - kein Signal

Hierbei zeigte sich, daß SV40-TAg zwar in das Genom der Zellen integriert war, eine Expression des Transgens jedoch nicht nachweisbar war.

3.2.2 Morphologie der Zelllinien

Lichtmikroskopischer Phänotyp

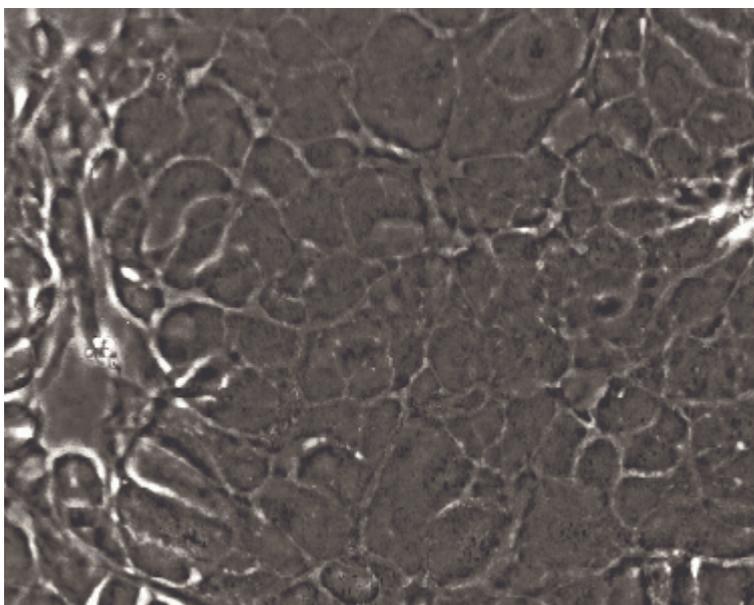
Die primären Zellen der ersten Passagen wiesen einen heterogenen Phänotyp auf und wuchsen in einem Monolayer. Die aus MBECL #5 klonierten Zelllinien zeigten dagegen unter dem Lichtmikroskop eine in sich homogene aber untereinander sehr verschiedene Morphologie (Beispiele: Abb. 3.7 bis 3.10). Die Linie 7 zeigte ebenfalls einen heterogenen Phänotyp und wuchs als epithelialer Monolayer (s. Abb. 3.11).



**Abb. 3.7 –
MBECL 5 / A im**

Lichtmikroskop:

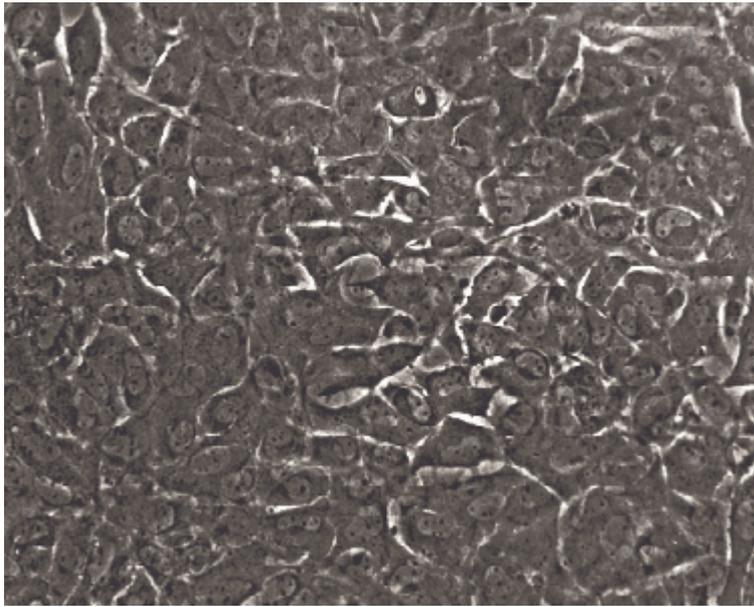
Die Linie zeigt zunächst Monolayer-Wachstum mit epithelialelem Muster, bildet jedoch bei höherer Dichte Zellhaufen.



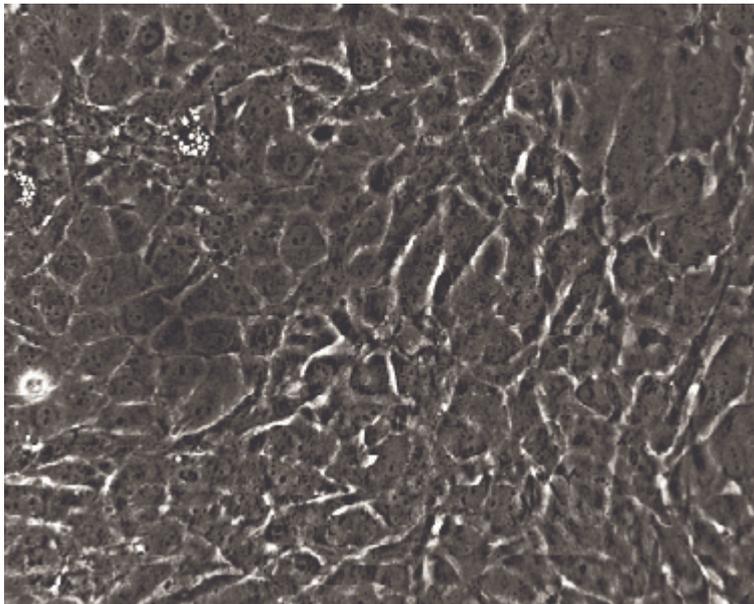
**Abb. 3.8 –
MBECL 5/D**

im Lichtmikroskop:

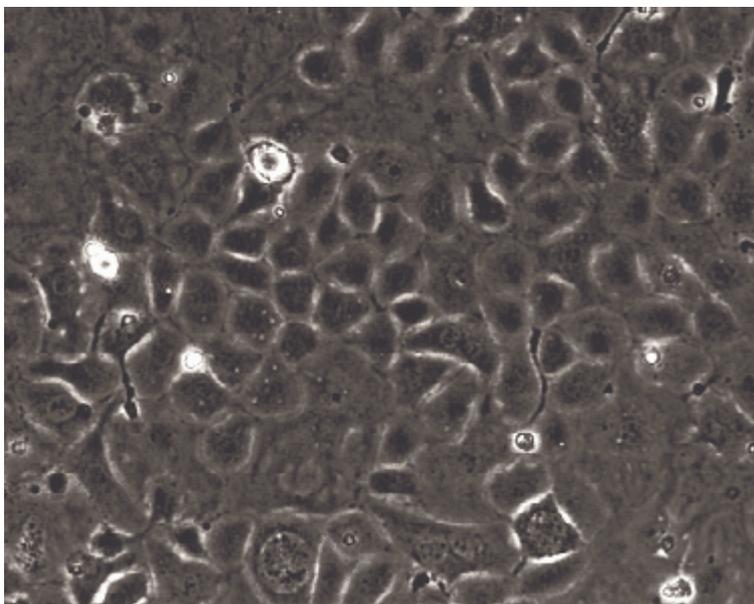
Die Linie 5 / D zeigt unregelmäßige, im Monolayer wachsende Zellen unterschiedlicher Größe.

**Abb. 3.9 –****MBECL 5 / E im****Lichtmikroskop:**

Linie 5 / E wächst unregelmäßig, teilweise übereinander gelagert. Die Zellen weisen eine spindelförmige, fibroblastoide Form mit langen Zellfortsätzen auf.

**Abb. 3.10 –****MBECL 5 / F im****Lichtmikroskop:**

Linie 5 / F weist epitheliale Zelltypen ebenso auf, wie die fibroblastoiden Formen in der Linie 5 / E. Insgesamt wirkt die Linie heterogen und wächst unregelmäßig.

**Abb. 3.11 –****MBECL 7 im****Lichtmikroskop:**

Linie 7 macht einen heterogenen Eindruck und weist rundliche epitheliale neben großen abgeflachten Zellen auf. Die Zellen wachsen inselartig und bilden schließlich einen Monolayer.

Ultrastruktur der Zelllinien

Die Ultrastruktur ist ein klassisches Charakterisierungsmerkmal der Clara-Zelle. Aus diesem Grund wurden die Zelllinien MBECL 5/A, D, E, F (Abb. 3.12-3.15) und MBECL 7 (Abb. 3.16) und zum Vergleich A549 (Abb. 3.17), eine humane Adenokarzinom-Zelllinie (vermtl. Entstanden aus ATII-Zellen), elektronenmikroskopisch untersucht. Repräsentative Zellen jeder Linie sind hier abgebildet (Abb. 3.12 – 3.17).

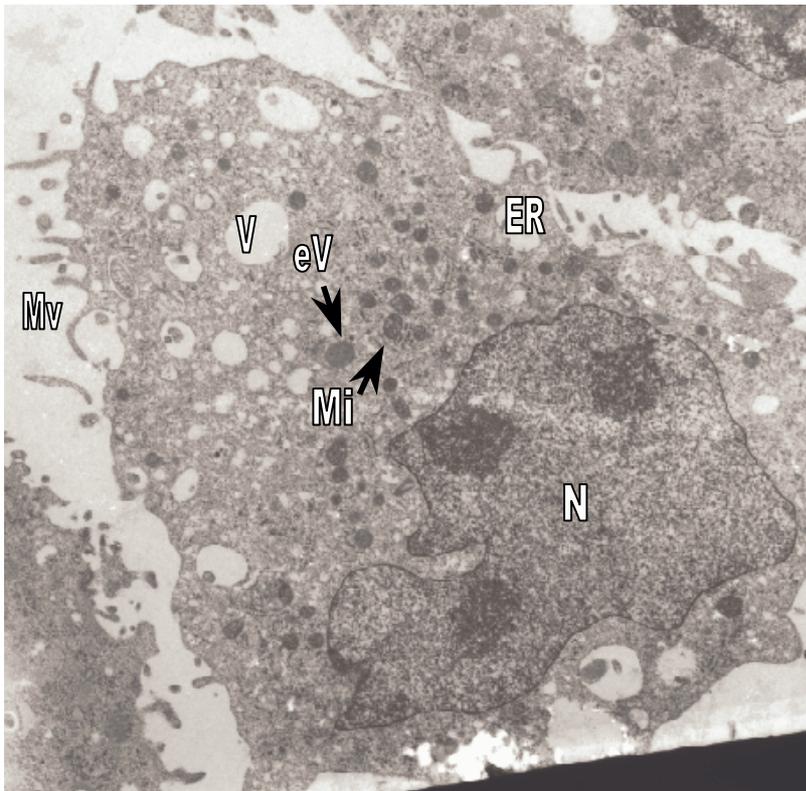


Abb. 3.12 –

EM-Aufnahme MBECL 5/A:

Das Bild zeigt repräsentativ eine Zelle der Zelllinie 5/A mit Microvilli (Mv), starker Vesikulierung (V), Clara-Zell-typischen elektronendichten Vesikeln (eV) und großen, runden Mitochondrien (Mi). Der Zellkern (N) ist gelappt.

Vergrößerung: 4500fach

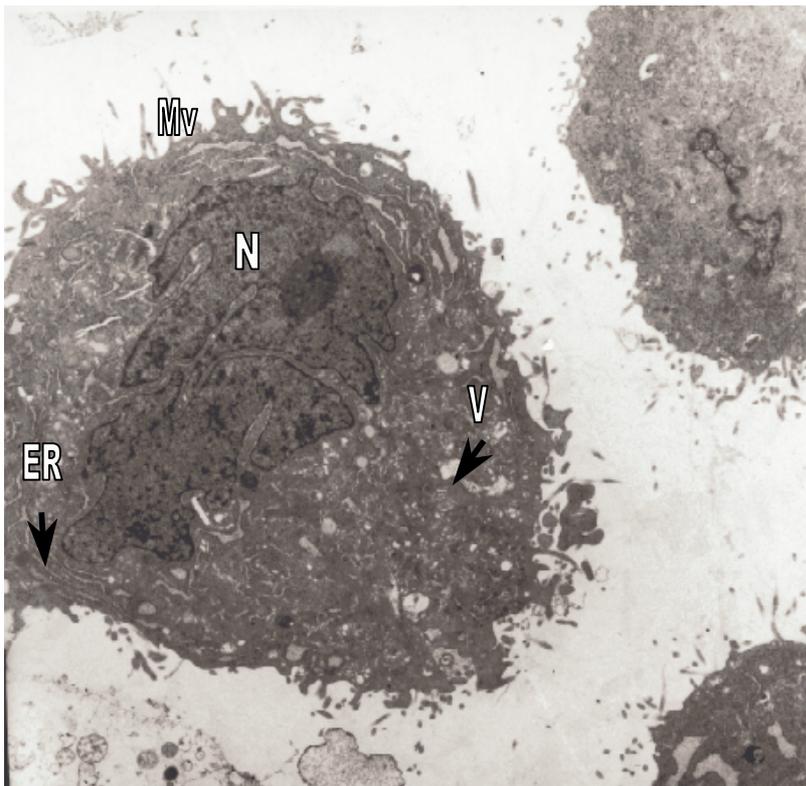
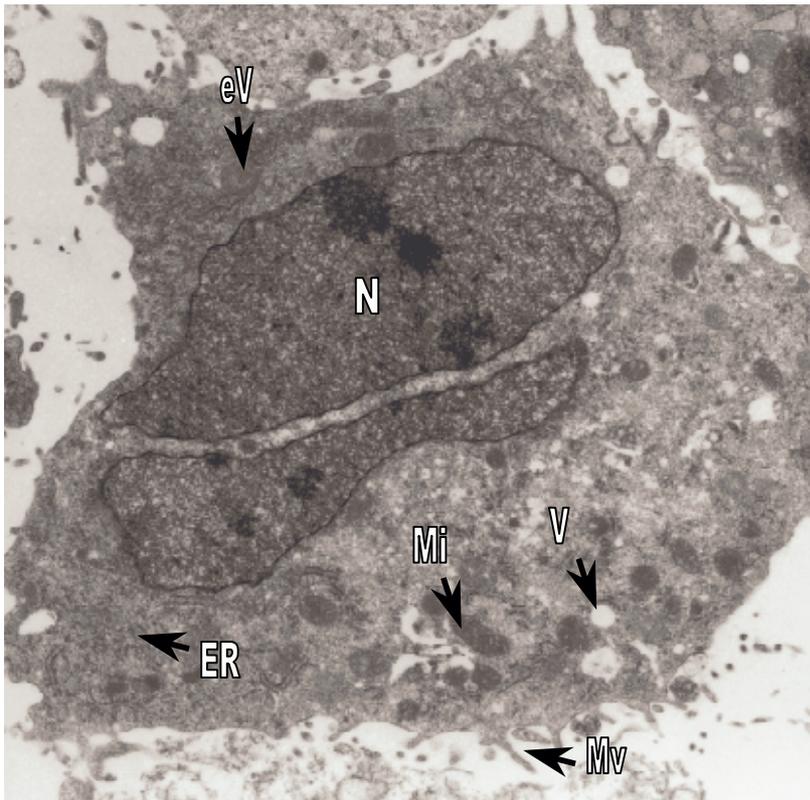


Abb. 3.13 –

EM-Aufnahme MBECL 5/D:

Das Bild zeigt repräsentativ eine Zelle der Zelllinie 5/D mit Microvilli (Mv), ebenfalls starker Vesikulierung (V), viel Endoplasmatischem Retikulum (ER) und großen, runden Mitochondrien. Der Zellkern (N) ist stark gelappt.

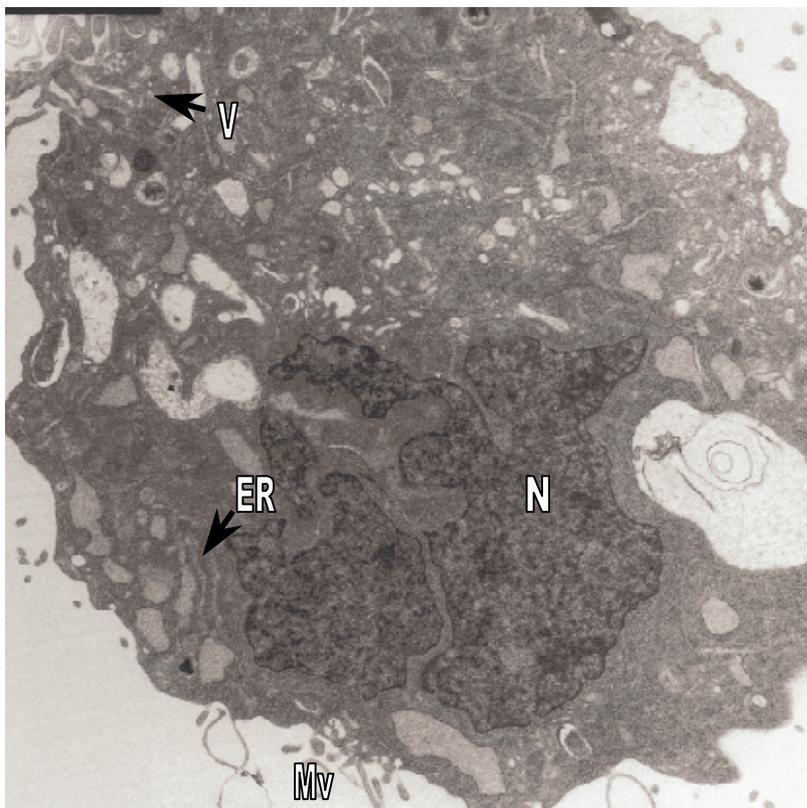
Vergrößerung: 4500fach



**Abb. 3.14 –
EM-Aufnahme MBECL 5 / E:**

Die Aufnahme zeigt einen gelappten Zellkern (N) in einem stark granulierten und vakuolisierten Cytoplasma. Außerdem sind große Mitochondrien (Mi) und elektronendichte Vesikel (eV) zu erkennen. Ebenso ausgeprägte Bereiche mit Endoplasmatischem Reticulum (ER). Die Zelle besitzt Microvilli (Mv).

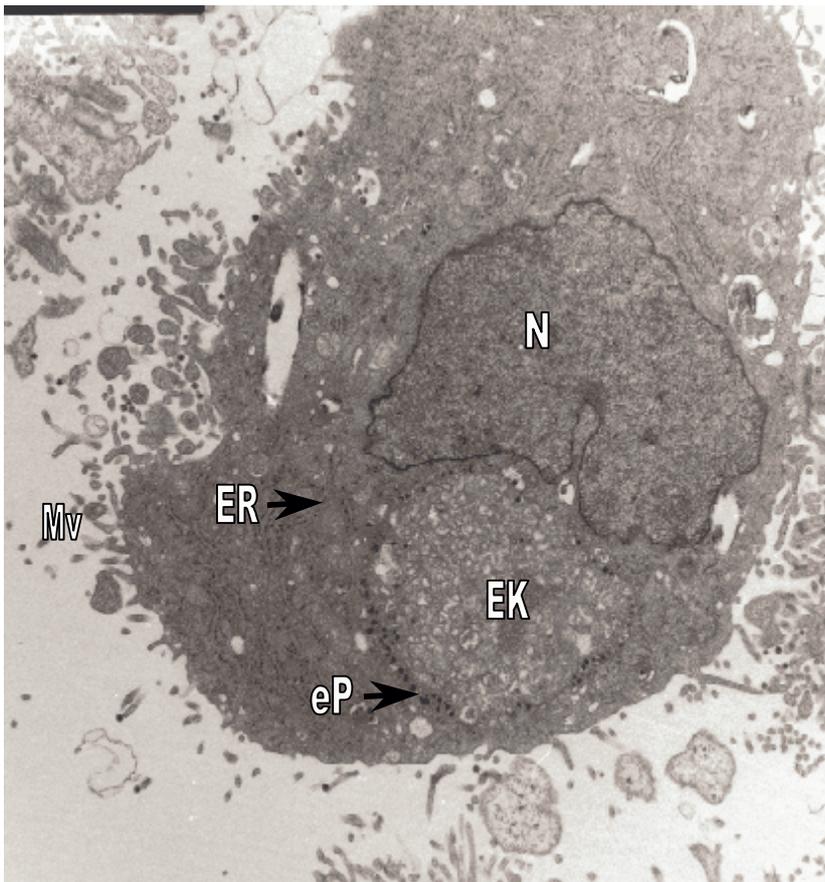
Vergrößerung: 4500fach



**Abb. 3.15 –
EM-Aufnahme Linie 5 / F:**

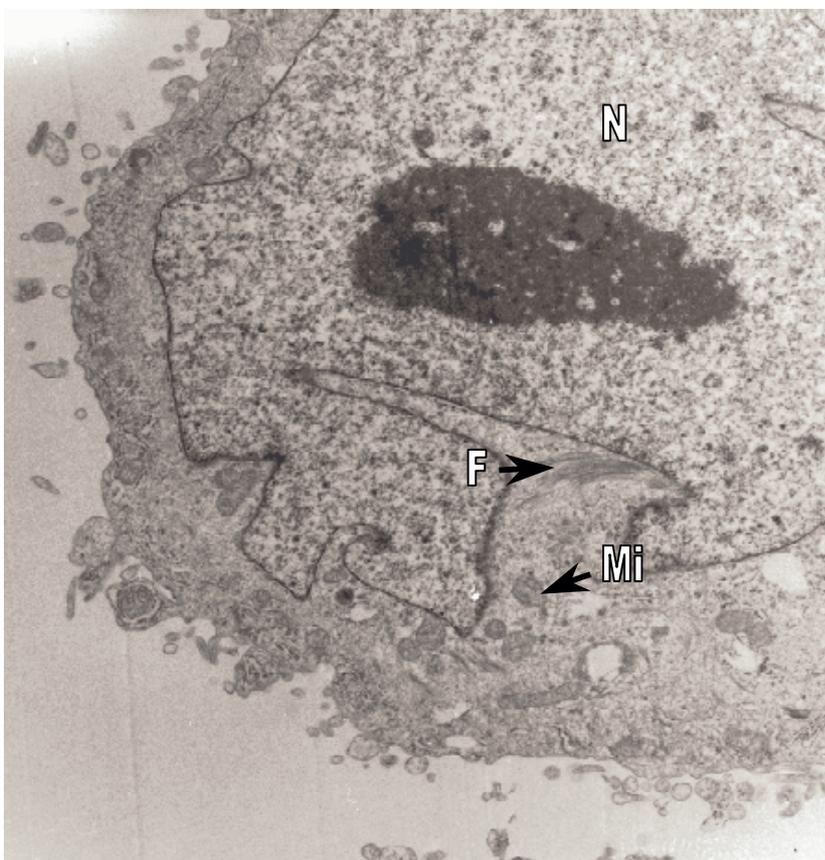
Die Zelle zeigt eine reichhaltige Vesikulierung mit Einschlüssen unterschiedlichster Art. Sie enthält viel Endoplasmatisches Retikulum (ER). Ihr membranständiger Zellkern (N) ist stark gelappt. An ihren Rändern sind Abschnürungen zu erkennen.

Vergößerung: 4500fach

**Abb. 3.16 –****EM-Aufnahme Linie 7:**

Die abgebildete, repräsentative Zelle zeigt eine hohe Zahl von Microvilli (Mv) und viel Endoplasmatisches Reticulum (ER). Im Cytoplasma sind nur wenige Vesikel zu erkennen. Jedoch befindet sich ein großer granulärer Einschlusskörper (EK) in der Zelle, an dessen Rand sich elektronendichte Partikel (eP) befinden, die auch im übrigen Cytoplasma verstreut auftreten. Der zentrale Zellkern (N) ist gelappt.

Vergrößerung: 4500fach

**Abb. 3.17 –****EM-Aufnahme Linie A549:**

Die humane AT II-Zelllinie A549 wurde als Kontrolle ebenfalls mit untersucht. Sie weist einen gelappten sehr großen Zellkern (N) auf. Im Cytoplasma finden sich große Mitochondrien (Mi) und Strukturen intermediärer Filamente (F).

Vergrößerung: 4500fach

3.2.3 Histologische Charakterisierung

Für einige Zelllinien der Reihe MBECL #5 wurden verschiedene Färbungen durchgeführt:

	5/A	5/B	5/E	5/F
PAS	-			
Sudan Schwarz	+			
Lysotracker	+	+	-	-

Tab. 3.4 – Histologische Färbungen: Die PAS-Färbung dient dem Nachweis von Glycogen, die Sudan Schwarz-Färbung weist Lipide nach und der Lysotracker Farbstoff akkumuliert und fluoresziert in sauren Organellen und ‘Lamellar bodies’. + = Färbung; - = keine Färbung

Für PAS (Glykogen-Nachweis) konnte nur eine diffuse Färbung des Cytosols festgestellt werden. Jedoch zeigten die Zelllinien 5/A und B in der Sudan Schwarz Färbung (Lipide/Phospholipide) schwarze Granula im Cytosol (Daten nicht gezeigt). Beide Zelllinien zeigten nach einer Lysotracker-Green Färbung, die acide Organellen (Lysosomen und Peroxisomen) aber auch die mit Surfactant Sekretion verbundenen ‘Lamellar bodies’ (Haller *et al.*, 1998) fluoreszieren lässt, starke Signale.

Abbildung 3.18 zeigt exemplarisch eine Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme von Lysotracker-Green gefärbten Zellen der MBECL 5/A.

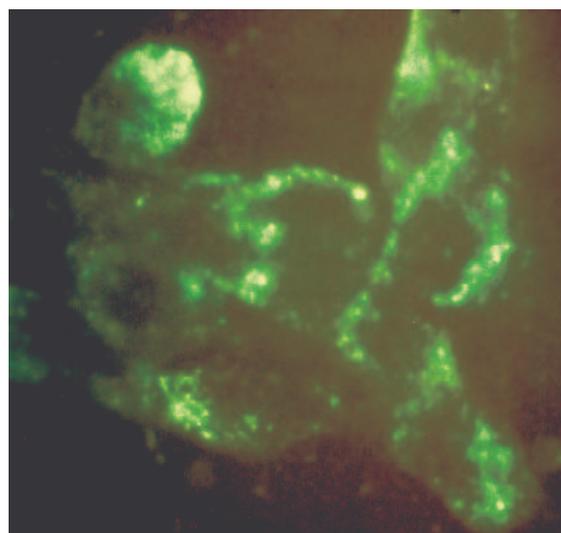


Abb. 3.18 – Lysotracker-Färbung von Zellen der Linie MBECL 5/A: Der Lysotracker-Farbstoff (Molecular Probes) akkumuliert in sauren Organellen wie z.B. Lysosomen aber auch in ‘Lamellar bodies’ (Haller *et al.*, 1998).

Die Zellen der MBECL 5/D wiesen nach der Färbung ein gleiches Muster auf. Es zeigte sich, daß distinkte Strukturen im Cytosol der Zellen gefärbt wurden. Hierbei kann es sich um saure Organellen wie Lysosomen aber auch um sogenannte 'Lamellar bodies' handeln (Haller *et al.*, 1998), die als Marker von ATII-Zellen gelten.

3.2.4 Expression von Differenzierungs-Markern auf RNA-Ebene

Um die Zellen molekularbiologisch zu charakterisieren, wurden sie mit Hilfe der Reversen Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR; i.d.R. mit Intron-überspannenden Primern) auf die Expression verschiedener Zelltyp-spezifischer Marker, epithelialer Marker und Cytochrom-P450-Monooxygenasen hin untersucht. Letzteres geschah, weil spezifische CyP450-Systeme *in vivo* in Clara-Zellen nachgewiesen werden konnten und somit als Marker dienen können (Forbes, 2000; Smith und Brian, 1991; Widdicombe und Pack, 1982). Die Synthese von mRNA für spezifische CyP450-Systeme ist ein Indikator für den Differenzierungsgrad und metabolische Relevanz des *in vitro*-Modells.

Abb. 3.19 bildet beispielhaft einige der durch die RT-PCR-Untersuchungen gewonnenen typischen Signalmuster ab.

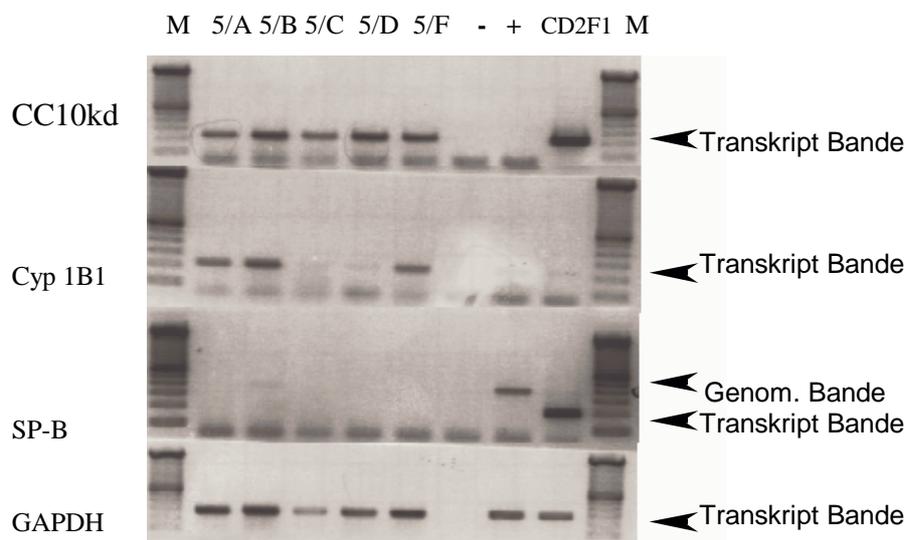


Abb. 3.19 – Expression zellulärer Marker von Clara-Zellen: Der Nachweis durch RT-PCR wird hier exemplarisch für CC10kd, Cyp1B1 und SP-B abgebildet.

5/A, -B, -C, -D, -F = Zelllinien 5/A bis F; - = DNase-behandelte genomische DNA als Negativ-Kontrolle; + = genomische DNA als genomische Positiv-Kontrolle; CD2F1 = cDNA von DNase-behandelter RNA aus Lungen von CD2F1-Mäusen als Transkript-Positiv-Kontrolle; M = Marker

Expression zellulärer Marker

Eine Untersuchung auf Expression zellulärer Marker von Clara- und AT II-Zellen ergab folgendes Muster (s. Tab. 3.5):

	5/A	5/B	5/C	5/D	5/E	5/F	7	CD2F1 Lunge
CC10kd	+	+	+	+	+	+	+	+
SP-A	-	-	-	-	-	-	-	+
SP-B	-	-	-	-	-	-	-	+
SP-C	-	-	-	-	-	-	-	+
SP-D	+	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	+	+

Tab. 3.5 – RT-PCR-Signale für Zelltyp-spezifische Marker von ATII- und Clara-Zellen: Durchgeführt mit RNA aus den Linien 5 / A bis F, Linie 7 und RNA aus der Lunge von CD2F1 Mäusen als Kontrolle. CC10kd = Clara Cell 10kd-Protein; SP-A/-B/-C/-D = Surfactant Proteine; + Signal vorhanden; - kein Signal; n.d. nicht durchgeführt. Clara-Zell-Marker sind hellgrau unterlegt.

Die Kontrolle mit RNA aus Lunge einer CD2F1-Maus zeigte, daß die Nachweisreaktion mit den gewählten Primer-Paaren in dieser Form funktionierte. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß alle Zelllinien das Kaninchen-Uteroglobinhomologe Clara Cell 10kd-Protein (CC10kd) exprimierten. Die Zelllinien 5/A und 7 zeigten darüber hinaus auch Signale für das AT II- und Clara-Zell-spezifische SP-D. In frühen (2.–3.) Passagen der Zelllinien konnte vereinzelt auch die Expression von mRNAs für SP-A und SP-B nachgewiesen werden (Abb. 3.20).

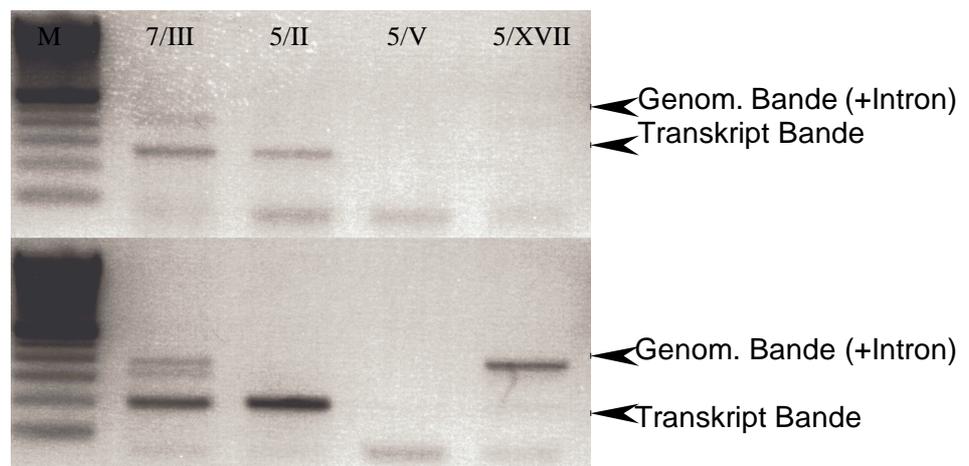


Abb. 3.20 – Expression von SP-A und SP-B in niedrigen Passagen der Zelllinien #5 (vor Klonierung) und #7: Die Abbildung zeigt exemplarisch PCR-Produkte, die mit Intron-überspannenden Primern generiert wurden, um cDNA-Signale von genomischen Signalen unterscheiden zu können. Arabische Ziffer = Zelllinie; Römische Ziffer = Passagenzahl; M = Marker

Abbildung 3.20 zeigt deutlich, daß die Expression von Surfactant Protein-A und –B in frühen Passagen der Zelllinien 5 (2. Passage) und 7 (3. Passage) noch nachweisbar war. In der 5. Passage der Zelllinie 5, die zu diesem Zeitpunkt noch nicht kloniert worden war, war dies hingegen nicht mehr möglich.

Expression von Cytochrom-P450-Monooxygenasen

Die Expression bestimmter Mitglieder der Cytochrom-P450 (Cyp)-Gen-Familie konnte ebenfalls durch Reverse Transkriptase-PCR auf dem mRNA-Niveau nachgewiesen werden (s. Tab. 3.6).

	5/A	5/B	5/C	5/D	5/E	5/F	7	CD2F1 Lunge
Cyp1A1	+)*)	-	-	-	-	+	-	-
Cyp1A2	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyp1B1	+	+	-	-	-	+	-	-
Cyp2B	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyp2B10	+	+	+	+	+	+	-	-
Cyp4B1	+	-	-	-	-	-	-	-
Cyp2F2	+	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	+	+

Tab. 3.6 – Expression von Cyp450-Monooxygenasen: Die RT-PCR-Experimente wurden mit mRNAs der Zelllinien 5 / A bis F, Linie 7 und RNA aus der Lunge eines Kontrolltieres durchgeführt. Cytochrom-P450 (Cyp)-Aktivität in der Lunge gilt als Clara-Zell-spezifisch. Besonders Cyp 2F2 wird als Clara-Zellmarker beschrieben. + Signal vorhanden; - kein Signal; n.d. nicht durchgeführt; *) nach Induktion mit PCB

Expression epithelialer Marker

Darüber hinaus wurde durch RT-PCR die Expression von Cytokeratinen bei den Zelllinien 5/A, 5/D und 7 untersucht, nachdem die vorhergegangenen Ergebnisse eine Fokussierung der Untersuchungen auf diese drei Zelllinien nahegelegt hatte. Die spezifische Expression von Cytokeratinen (s. Tab. 3.7) kann auf einen epithelialen Ursprung der Zellen hinweisen (Kasper und Singh, 1995; Nakajima *et al.*, 1998; van Dorst *et al.*, 1998).

	5/A	5/D	7	CD2F1 Lunge
CK 8	+	+	+	+
CK18	-	-	-	+
CK19	+	+	+	+
CK17	-	-	-	-

Tab. 3.7 – Expression von Cytokeratinen (CK): Die Cytokeratine 8, 18 und 19 gelten als Marker epithelialer Zellen der Lunge (Nakajima *et al.*, 1998; Kasper und Singh, 1995). CK 17 wird hingegen eher basalen Zellen zugeschrieben. + Signal vorhanden; - kein Signal

Alle drei Zelllinien, MBECL 5/A, 5/D und 7, exprimieren mRNA für die Cytokeratine 8 und 19. Die Expression von CK 18 und 17 konnte nicht nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.7).

3.2.5 Proteinexpression von Clara-Zell-Markern

Um den Nachweis über die Expression von Clara Zell-Markern auch auf Proteinebene zu führen, wurden Western Blots mit Zellysaten aus Zellkultur und Kontrollgeweben (Leber und Lunge) und polyklonalen Antikörpern für CC10kd (Uteroglobulin), SP-B, SP-C und SP-D durchgeführt (s. Abb. 3.21 und 3.22).



Abb. 3.21 – Western Blot zum Nachweis von CC10kd (Uteroglobulin):

A, D, E, F, 7 bezeichnen die entsprechenden MBECL-Zelllinien. Lu = Lunge, Le = Leber, Ut = Uterus als Positivkontrolle; kDa = kilo Dalton; M = Längenstandard

Uteroglobulin ist ein Homodimer von ~16 kDa Größe. Das Monomer besitzt eine Größe von ca. 8 kDa.

In der Western Blot-Analyse zeigten alle getesteten Zelllinien und eine als Positivkontrolle eingesetzte Uterus-Probe eine Protein-Bande (16 kDa) in der Größe des CC10kd-Homodimers (Reynolds *et al.*, 1999). Allerdings war es für die Proben von MBECL 5/D und 7 sehr schwach. Das Signal war auch in allen Kontrollgeweben einschließlich der Leber zu finden, von diesen zeigte die Uterus-Probe das stärkste

Signal (vgl. Abb. 3.21). Das Monomer konnte auch unter reduzierenden Bedingungen nicht nachgewiesen werden.

Die Western Blots für die Surfactant Proteine-C und -D zeigten, abgesehen von der als Kontrolle aufgetragenen Lungen-Probe, keine positiven Signale (Daten nicht gezeigt).

Der Blot mit dem Antikörper für das Surfactant Protein-B jedoch zeigte deutliche Signale für die getesteten Zelllinien und die Lungen-Kontrolle (s. Abb. 3.22).

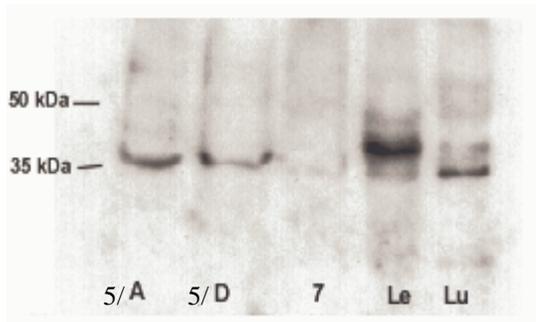


Abb. 3.22 – Western Blot für den Nachweis von Surfactant Protein-B:

Bei allen Zelllinien (MBECL 5/A, 5/D, 7) zeigten sich Banden in der erwarteten Größe (~40kDa). In der Leberprobe gab es eine Kreuzreaktion mit einem größeren und unbekanntem Protein.

Das Surfactant Protein-B wird von AT II- und Clara-Zellen gebildet, seine Größe wird in der Literatur mit ca. 40 kDa angegeben (D'Amore-Bruno *et al.*, 1992; Yarus *et al.*, 1997). Ein Protein dieser Größe ließ sich in allen getesteten Zelllinien nachweisen (MBECL 5/A; 5/D und 7). Die Linie 7 zeigte allerdings nur ein sehr schwaches Signal.

3.2.6 Karyotypisierung

Durch Transfektion mit SV40 TAg immortalisierte Zellen weisen häufig Aneuploidien auf (Masuda *et al.*, 1997). Aus diesem Grund wurden die Chromosomen der Linien 5/A und /D und der Linie 7 präpariert und ausgezählt. Dabei ergab sich eine Verteilung, die in Tabelle 3.8 dargestellt ist:

	5/A	5/D	7
Durchschnittliche Chromosomenzahl	n = 62 Chr.	n = 63 Chr.	n = 38
Chromosomensatz	~Triploid	~Triploid	~Diploid

Tab. 3.8 – Aus den mittleren Chromosomenzahlen ergibt sich, daß die Zellen der Linien 5/A und /D triploid sind, wohingegen die Zellen der Linie 7 einen normalen diploiden Chromosomensatz aufweisen.

Die Abbildung 3.23 zeigen exemplarisch jeweils den Chromosomensatz einer Zelle der Linien MBECL 5/A; 5/D und MBECL 7.

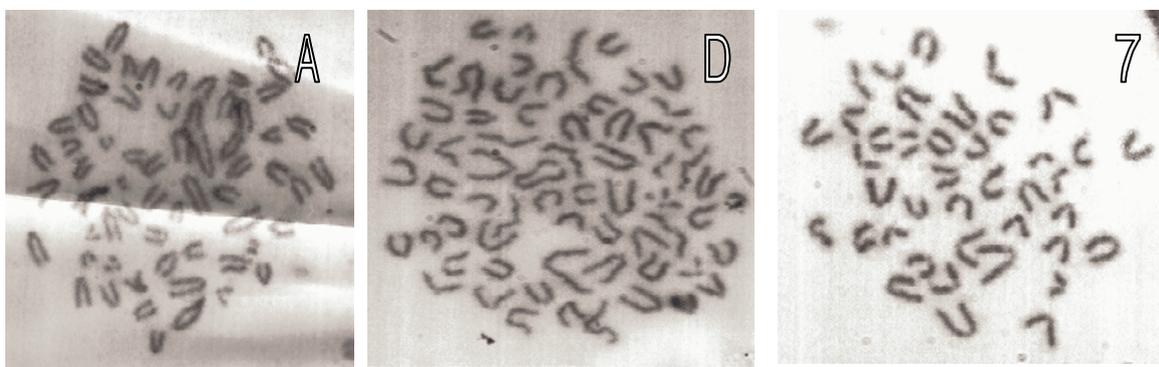


Abb. 3.23 – Chromosomensätze: Die linke Abbildung zeigt den Chromosomensatz einer Zelle der Zelllinie 5/A. Die mittlere Abbildung zeigt einen Chromosomensatz einer Zelle der Zelllinie 5/D und die recht einen Chromosomensatz von MBECL 7.

3.2.7 Proliferationseigenschaften der Zellen *in vitro*

Die Wachstumsrate in Zellkultur ist ein Maß für die proliferative Aktivität einer Zelllinie. Sie ist abhängig von dem angebotenen Medium und dessen Komponenten und von der vorhandenen Matrix, auf der die Zelle wachsen kann.

Verschiedene Moleküle wie z.B. TGF beta, EGF und HGF können die Zellproliferation beeinflussen. Sie spielen bei Entwicklungsprozessen der Lunge und der Entstehung von Lungentumoren eine Rolle. Die Fähigkeit auf diese Signal-Peptide zu reagieren, geht bei malignen Zellen häufig verloren (Masuda *et al.*, 1997) und ist ein Merkmal des Differenzierungsgrades der Zellen in Kultur.

Proliferationsraten von MBECL 5/A, 5/D und 7

Um das Wachstumsverhalten *in vitro* zu bestimmen, wurden jeweils pro Meßpunkt 3×10^4 Zellen der Zelllinien 5/A, 5/D und 7 in je drei 6 cm Zellkulturschalen mit 3 ml Medium (MX-83; 2 % NCS) ausplattiert.

Nach 24 h (Tag 1) wurden Zellen abtrypsiniert und die Zellzahl in drei unabhängigen Schalen bestimmt. Danach wurde alle 48 h auf diese Weise die Zellzahl über insgesamt 15 d bestimmt (vgl. Abb. 3.24). Der Versuch zeigte, daß die Linie 5/A am schnellsten, die Linie 5/D etwas langsamer als 5/A und die Linie 7 am langsamsten wächst.

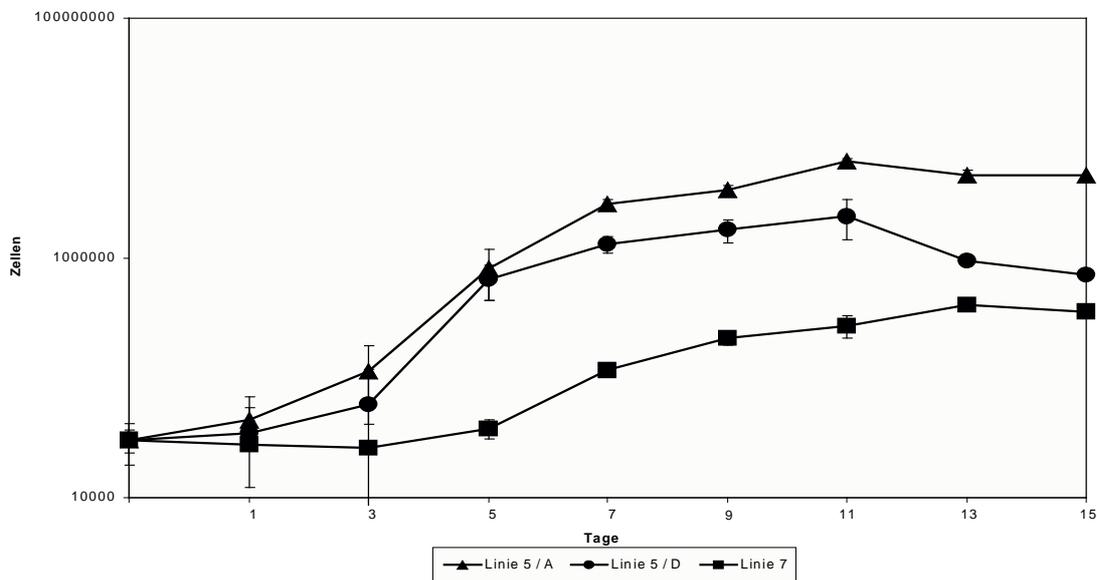


Abb. 3.24 – Wachstumskurven der Zelllinien MBECL 5/A, 5/D und 7: Die Abbildung zeigt die Wachstumskurven, die sich aus der Auftragung der mittleren Zellzahl dreier unabhängiger Experimente gegen die Zeit (in Tagen) ergeben.

Einfluß von Serum und Wachstumsfaktoren auf die Proliferation

Dieser Versuch diente dem Nachweis des serumabhängigen Wachstums der Zelllinien. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die Zellen noch sensitiv für spezifische Stimuli durch biogene Peptide wie den Proliferations-stimulierenden Faktor EGF und den –inhibierenden Faktor TGF beta waren. Für die Untersuchungen zur Wirkung von EGF wurden je 3×10^4 Zellen in 6 cm Schalen ausplattiert und mit Medium (MX-83) ohne NCS, mit 2 % NCS und Medium mit 2 % NCS plus 20 ng EGF / ml inkubiert (Abb. 3.25).

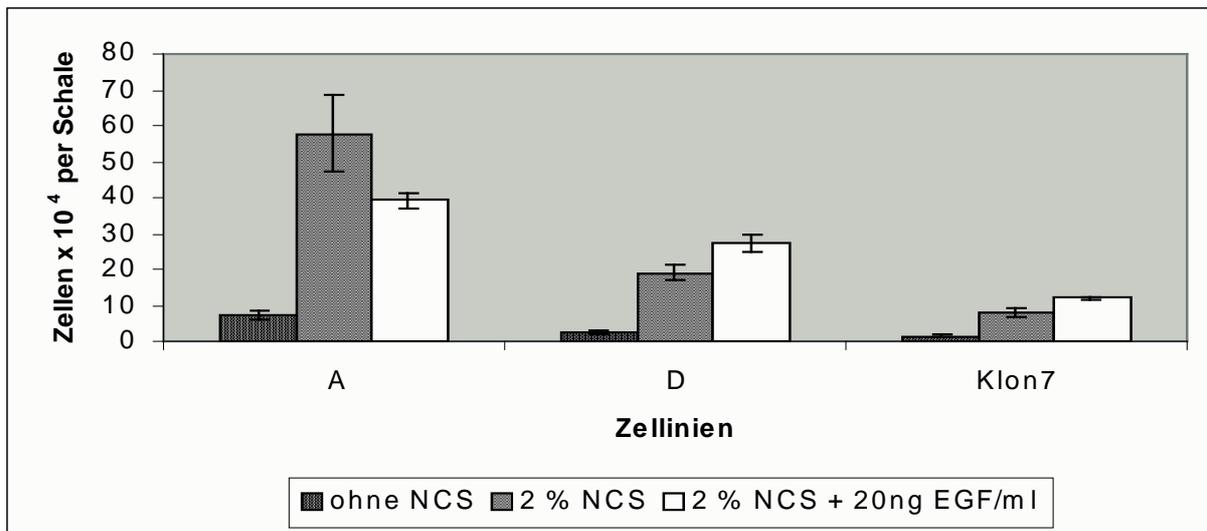


Abb. 3.25 –Zellwachstum in verschiedenen Medien: 3×10^4 Zellen der Linien 5/A, 5/D und 7 wurden nach 5 d Inkubation in Nährmedium mit den angegebenen Medien-Additiven ausgezählt. Je Experiment wurden drei Schalen parallel gezogen und ausgewertet.

Es zeigte sich, daß die Zelllinie 7 zu Serum-unabhängigem Wachstum nicht befähigt war, wohingegen die Linien 5/A und 5/D langsam proliferierten. Mit Serum-Zusatz wiesen alle Zelllinien nach 5 d Wachstum sehr ähnliche Zellzahlen auf, wie sie sie am Tag 5 der Wachstumskurve gezeigt haben (vgl. Abb. 3.24). Der Zusatz von 20 ng EGF/ml zum serumhaltigen Medium führte bei den Linien 5/D und 7 schließlich zu leicht beschleunigter Proliferation.

Interessanterweise bewirkte der Zusatz von EGF zum Medium bei der Linie MBECL 5/A eine Inhibition des Wachstums. Der Versuch wurde noch einmal zusätzlich wiederholt, um ein falsche Beobachtung endgültig auszuschließen, führte aber zum selben Ergebnis.

Wie oben beschrieben wurden die Zellen außerdem mit dem Zusatz von 0,2 bzw. 1,0 ng TGF beta/ml Medium (mit 2 % NCS) ausplattiert. Zusätzlich wurden auf die

gleiche Weise Zellen auf Collagen-beschichteten Schalen ausgebracht, um den Einfluß der Matrix auf die Zellproliferation zu bestimmen.

Nach 5 d wurde für alle Medien-Varianten die Zellzahl in drei unabhängigen Kulturschalen ausgezählt (Abb. 3.26). Dies geschah zu einem Zeitpunkt, an dem sich alle drei Zelllinien in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befanden.

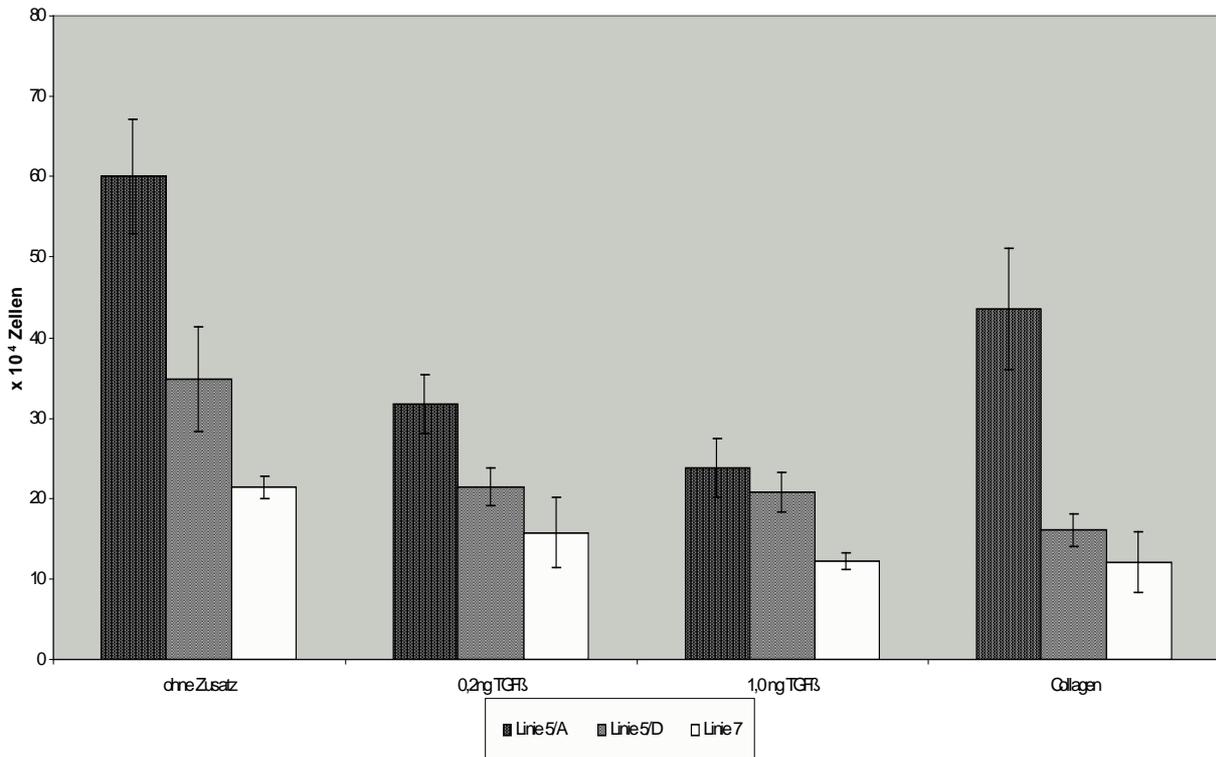


Abb. 3.26 – Zellwachstum unter inhibierenden Bedingungen: 3×10^4 Zellen der Linien 5/A, 5/D und 7 wurden in 3 ml Medium mit 2 % NCS ausplattiert und TGF β in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Nach 5 d wurden jeweils drei Schalen je Ansatz ausgezählt.

Es zeigte sich, daß TGF beta bei den Zelllinien 5/A und 7 das Wachstum Dosis-abhängig inhibierte. Die Linie 5/D wurde durch die Zugabe von 0,2 ng/ml TGF beta um ca. 40 % in ihrem Wachstum inhibiert, eine Erhöhung der Dosis auf 1,0 ng/ml zeigte bei ihr jedoch keinen verstärkten Effekt. Die Beschichtung der Zellkulturschalen mit einer Collagen-Matrix führte ebenfalls zu einer Reduktion der Zellproliferation. So ist die Zellzahl der Linie 5/A nach 5 d auf Collagen-Matrix im Vergleich zur Kontrolle auf unbeschichtetem Plastik um ca. 30 % und die der Linien 5/D und 7 um ca. 50 % geringer.

3.2.8 Substratkontaktabhängigkeit der Proliferation *in vitro* und Tumorigenität *in vivo*

Weichagar-Test – Substratkontaktabhängigkeit der Proliferation *in vitro*

Der Weichagar-Test dient dem Nachweis von Substratkontakt-unabhängigem Wachstum, welches einen ersten Hinweis auf eine mögliche Transformation einer Zelllinie liefert. In diesem Test wurden 1×10^5 Zellen je Zelllinie in je eine Vertiefung einer '6-well-plate' in 2 ml Weichagar (0,6 %) ausplattiert. Für jede Zelllinie wurden drei parallele Ansätze plattiert. Außerdem wurden die Zellen jeweils in Weichagar ohne und mit EGF-Zusatz ausgebracht. Nach 24 h wurden unter dem Lichtmikroskop die Kolonien (> 3 Zellen) im Weichagar ausgezählt, die auf schlechte Vereinzelnung der Zellen zurückzuführen waren. Als Kontrolle wurden zugleich Zellen der Linie A549 (humane ATII-Zellen, tumorigen) als Positiv-Kontrolle ausplattiert. Nach zehn Tagen wurden erneut die Kolonienzahlen bestimmt (Tab. 3.9).

	5/A	5/D	5/E	5/F	A549
<i>Kolonien in Agar</i>	-	-	-	-	+
<i>Kolonien in Agar + EGF</i>	-	-	-	-	+

Tab. 3.9 – Weichagar-Test: 1×10^5 Zellen wurden pro Schale in Weichagar ausplattiert und die Mittelwerte der Koloniezahlen (> 3 Zellen) aus drei unabhängigen Experimenten nach 24 h und dann wieder nach insgesamt 10 d ausgezählt. Ansätze, in denen nach 10 d mehr Kolonien gezählt wurden als nach 24 h zeigten Proliferation in Weichagar und damit Kontakt-unabhängiges Wachstum. Dieses Verhalten konnte nur bei der als Kontrolle verwendeten, humanen A 549-Zelllinie beobachtet werden. - = keine Koloniebildung; + = Koloniebildung

Nur die Linie A549 (Positiv-Kontrolle) zeigte eine Zunahme der Kolonien, also Proliferation in Weichagar. Auch in den Weichagar-Kulturen mit EGF-Zusatz (20ng/ml) konnte, bis auf die A549-Kulturen, keine Proliferation festgestellt werden. Allerdings führte der EGF-Zusatz auch bei A549 nicht zu erhöhten Proliferationsraten.

Tumorigenität – Wachstum der Zellen *in vivo*

Für die Untersuchung der proliferativen Eigenschaften der Zelllinien *in vivo* wurden je Zelllinie drei Balb c nu/nu-Mäusen jeweils $1,6 \times 10^6$ Zellen subkutan in die linke und rechte Bauchseite gespritzt. Dies wurde für die Zelllinien 5/A, 5/D, 5/E, 5/F, 7 und A549 durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden drei Mäuse mit PBS gespritzt. Es wurde erwartet, daß tumorigene Zellen in den Immun-defizienten Mäusen innerhalb weniger Tage zu subkutanen Tumorknoten heranwachsen würden. Nach 30 Tagen wurden die Tiere auf Knotenbildung untersucht und diese ausgezählt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.10 aufgelistet:

	Zelllinien					Kontrollen	
	5/A	5/D	5/E	5/F	7	A549	PBS
Tumore / Injektionen	6/6	0/6	6/6	5/6	0/6	6/6	0/0

Tab. 3.10 – Tumorbildung in Nacktmäusen: Je Zelllinie wurden drei Nacktmäusen je zwei Injektionen mit $1,6 \times 10^6$ Zellen in 200 µl PBS verabreicht. Die Tabelle gibt die nach 30 d diagnostizierten Tumoren im Verhältnis zur Anzahl der Injektionen wieder.

Tumorigenes Wachstum wurde bei den Linien MBECL 5/A, 5/E, 5/F und der Kontroll-Zelllinie A549 nachgewiesen. Während die Linien 5/A und A549 zu runden Knoten führten, bildeten sich aus den 5/E- und 5/F-Injektionen flächige, plattenartige Schwellungen. Die Tiere mit Injektionen der Linien 5/D, 7 und PBS zeigten keinerlei Knotenbildung.

3.2.9 Histologie der Nacktmaustumoren

Lichtmikroskop

Die aus den Nacktmaus-Experimenten mit 5/A, 5/E und 5/F hervorgegangenen Tumoren wurden präpariert und Licht- und Elektronen-mikroskopisch untersucht (Abb. 3.27-3.32).

Von Interesse war, ob die Zell-Morphologie *in vivo* Rückschlüsse auf den zellulären Ursprung der Tumorzellen zulässt.

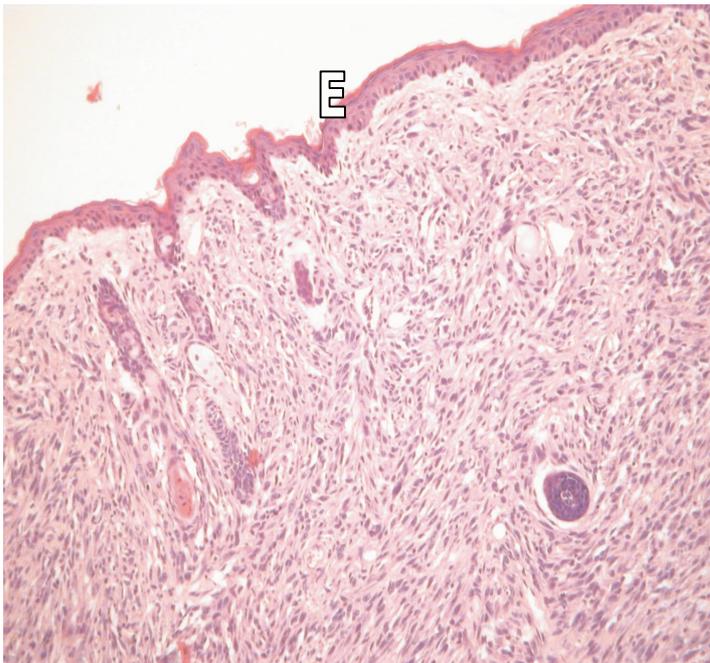


Abb. 3.27 – Schnitt durch einen Nacktmaus-tumor (MBECL 5/A):

Dieser Tumor ging aus einer Injektion mit MBECL 5/A hervor und wurde als Karzinom klassifiziert. Der Tumor weist spindelförmige Zellen mit verlängerten Zellkernen und vielen Nucleoli auf.
E = Epidermis

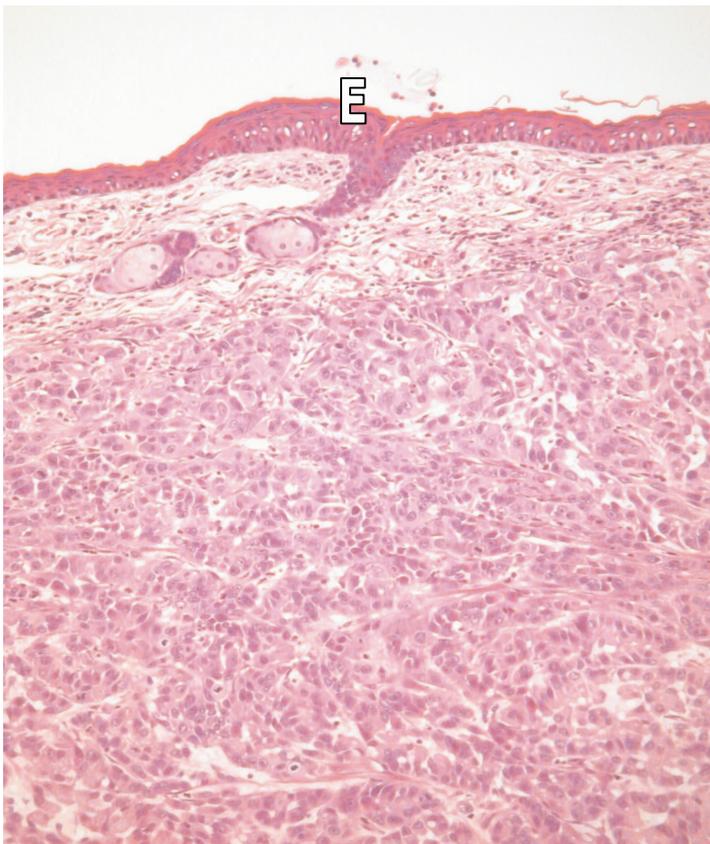


Abb. 3.28 – Schnitt durch einen Nacktmaustumor, hervorgegangen aus Zelllinie A549:

Als Kontrolle wurden Nacktmäusen Injektionen mit A549-Zellen verabreicht. Der resultierende Tumor besteht aus großen Zellen mit großen unregelmäßigen Kernen. Er wurde als schlecht differenziertes Adenokarzinom charakterisiert.
E = Epidermis

Die histologisch-pathologischen Analysen des Nacktmaus-Tumorgewebes, die von Frau Dr. S. Guinoaud durchgeführt wurden, ergaben, trotz einer starken morphologischen Dedifferenzierung, in der ultrastrukturellen Analyse Hinweise auf einen Ursprung des in Abb. 3.27 gezeigten Karzinoms (MBECL 5/A) aus Clara-Zellen. Die Elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 3.29-3.32) zeigen ultrastrukturelle Details des MBECL 5/A-Tumors aus einer Nacktmaus.



**Abb. 3.29 –
Elektronen-
mikroskopische
Aufnahme aus dem in
Abb. 3.27 gezeigten
Nacktmaustumor:**

Die Aufnahme zeigt
Desmosomenfelder
zwischen zwei
benachbarten Zellen, die
durch weiße Pfeile
bezeichnet sind. Die
Zellkerne sind durch ein
N markiert.

Die Zellmembranen der Tumorzellen sind zuweilen miteinander über Desmosomenartige Strukturen verbunden und weisen Microvili auf. Das Zytoplasma ist mäßig elektronendicht und enthält runde und elongierte Mitochondrien ebenso wie viel rauhes endoplasmatisches Reticulum und viele freie Ribosomen.

Es wurden mehrere Einschluß-Typen festgestellt. Die charakteristischsten Vesikel messen 200 bis 400 nm im Durchmesser, werden von einer einzelnen Membran (s. Abb. 3.30 und 3.31) umschlossen und weisen ein elektronendichtes Zentrum auf. Der Golgi-Apparat ist in der Regel nicht besonders groß entwickelt, jedoch sind ihm elektronendichte Vesikel assoziiert (s. Abb. 3.30), die als Clara-Zell-Marker gelten (Pankow *et al.*, 1989). Vereinzelt konnten 'multilamellar bodies' nachgewiesen werden (s. Abb. 3.32).

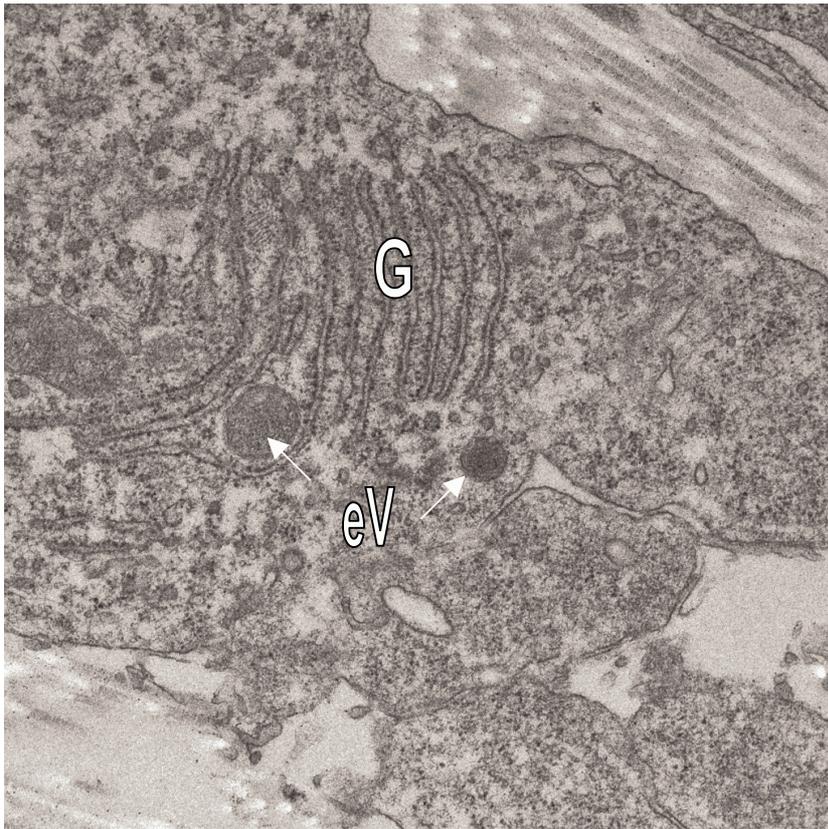


Abb. 3.30 – EM-Aufnahme eines Golgiapparates und elektronendichter Vesikel:

Die Abbildung zeigt einen Golgi-Apparat (G) und in unmittelbarer Umgebung elektronendichte Vesikel (eV), die durch weiße Pfeile markiert sind. Die Vesikel sind in der Literatur als Clara-Zell-Marker beschrieben (Pankow *et al.*, 1989).

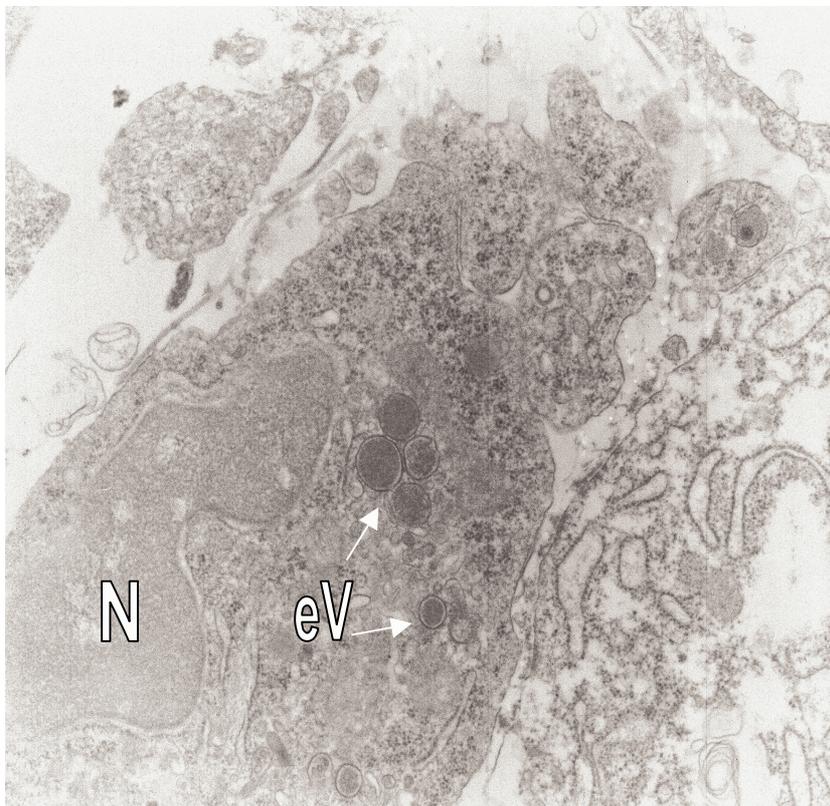


Abb. 3.31 – Elektronendichte Vesikel im Cytoplasma einer Tumorzelle:

Die Vesikel (eV) sind durch einen weißen Pfeil markiert. Sie sind von einer singulären Membran umgeben und besitzen stark elektronendichte Zentren. Ihre Morphologie erinnert an Peroxisomen. Zellkern (N)

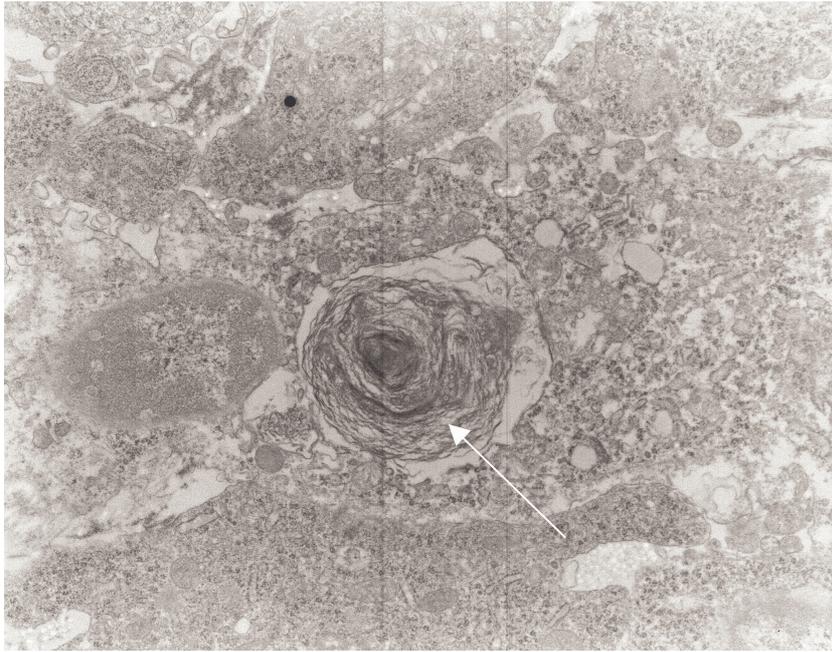


Abb. 3.32 – EM-Aufnahme eines 'multilamellar body':

Diese Struktur (s. Pfeil) wird in der Literatur i.d.R. als Merkmal von Alveolar Typ II-Pneumocyten bewertet und als Phospholipid-Ansammlung gedeutet. Sie wurde in Nacktmaus-Tumorgewebe aus MBECL 5/A beobachtet.

Die Existenz eines sogenannten 'Multi-Lamellar'-bodies überrascht im Zusammenhang mit Clara-Zellen. In der Literatur werden 'Multi-Lamellar'-bodies *in situ* als Merkmale von AT II-Zellen gedeutet und als Ansammlung von Phospholipiden, wie sie für die Surfactant-Synthese benötigt werden, interpretiert. Es gibt jedoch auch vereinzelte Hinweise auf 'Lamellar'-bodies in Clara-Zellen (Masuda *et al.*, 1997).

3.2.10 Differentielle Expression Tumorigenese-relevanter Gene

Um die molekularen Ursachen für die Unterschiede im Wachstum der drei Zelllinien MBECL 5/A; 5/D und 7 zu untersuchen, sollte eine Technik etabliert werden, mit der möglichst viele Gene auf ihre Expression hin überprüft werden können.

Hierfür war es zunächst notwendig, einen geeigneten Satz von cDNA-Klonen Tumorigenese-relevanter Gene zu generieren. Zu diesem Zweck wurden 200-400bp große murine cDNA-Fragmente von 83 Tumor-, Zellzyklus- und Apoptose-relevanten Genen kloniert. Diese wurden mit einem Spot Blot-Apparat (Schleicher und Schuell) auf Membranfilter (Nylon und Nitrocellulose) geblottet und mit DIG-markierten mRNAs bzw. p32-markierten cDNAs der drei Zelllinien hybridisiert. Eine Übersicht der generierten cDNA-Sequenzabschnitte ist in Abschnitt 2.2.6 (Material und Methoden) abgebildet.

Um die Expression der dort aufgeführten Gene nach der reversen Northern Blot-Methode (s. 2.2.2.3) zu analysieren, wurden auf zwei Membranen im 96-well-Format je 39/38 Plasmidproben mit jeweils Klon-spezifischen cDNA-Insertionen aufgebracht. Außerdem wurden spezifische cDNAs für zwei Housekeeping-Gene (β -Aktin, Ubiquitin) als interne Standards und Positiv-Kontrollen und drei Negativ-Kontrollen (reiner Vektor, zwei pflanzliche cDNAs) gespottet. Die Struktur der Blots ist schematisch in den Tabellen 3.11 und 3.12 abgebildet.

Aktin	CycB	CycC	CycD1	CycD2	CycE	Cdc2	Cdc6	Cdc25a	Cdk4	max	PGEM
-	CycB	CycC	CycD1	CycD2	CycE	Cdc2	Cdc6	Cdc25a	Cdk4	max	-
Ubiq.	P15	P16	P19	P21	P27	E2F-5	c-fos	c-jun	Myb	DHFR	ST
-	P15	P16	P19	P21	P27	E2F-5	c-fos	c-jun	Myb	DHFR	-
ST	c-myc	l-myc	n-myc	YY1	c-src	TEF1	TFII	P107	miz	Mxi	Ubiq.
-	c-myc	l-myc	n-myc	YY1	c-src	TEF1	TFII	P107	miz	Mxi	-
PGEM	e-cadh.	β -cate.	Con43	Gadd45	H-ras	K-ras	MAPK	Telom.	-	INV	Aktin
-	e-cadh.	β -cate.	Con43	Gadd45	H-ras	K-ras	MAPK	Telom.	-	INV	-

Tab. 3.11 – Klonsatz I: Dieser Filtertyp wurde vor allem mit cDNA-Klonen von Zellzyklus-Genen, Transkriptionsfaktoren und Genen der Zell-Zell-Kommunikation belegt. Die Abbildung zeigt schematisch das Spotting-Muster. Aktin = beta-Aktin; Ubiq. = Ubiquitin; e-cadh. = e-cadherin; β -cate. = beta-Catenin; Cyc = Cyclin; Cdk/cdc = Cyclin dependent Kinase; ST = Saccharose Transporter (pflanzl.); INV = Invertase (pflanzl.); Grau unterlegt = Kontrollen; jeder Kasten entspricht einem Spot.

Aktin	Apaf1	ATM	Bax	Bcl-2	Bcl-x	Bad	Cas2	Cas3	Cas8	Cas11	PGEM
	Apaf1	ATM	Bax	Bcl-2	Bcl-x	Bad	Cas2	Cas3	Cas8	Cas11	
Ubiq.	Daxx	Fadd	Fas	Fas _L	RIP	APC	p63	p53	p73	RB	ST
	Daxx	Fadd	Fas	Fas _L	RIP	APC	p63	p53	p73	RB	
ST	VHL	Mdm2	Mdmx	EGF _R	erbA	GRP _R	met	PDGF _R	TGFβ _R	TNF _R	Ubiq.
	VHL	Mdm2	Mdmx	EGF _R	erbA	GRP _R	met	PDGF _R	TGFβ _R	TNF _R	
PGEM	EGF	HGF	TGFα	TGFβ	SP-A	SP-B	SP-C	TAg	Ug	INV	Aktin
	EGF	HGF	TGFα	TGFβ	SP-A	SP-B	SP-C	TAg	Ug	INV	

Tab. 3.12 – Klonsatz II: Der hier schematisch dargestellte Filtertyp enthielt vornehmlich cDNA-Klone aus den Bereichen Apoptose, Rezeptoren, Tumorsuppressoren. _R = Rezeptor; _L = Ligand; ST = Saccharose Transporter (pflanzl.); INV = Invertase (pflanzl.); Cas = Caspase; Grau unterlegt = Kontrollen; jeder Kasten entspricht einem Spot.

Jede der cDNA-Proben wurde als Blot-interne Kontrolle doppelt gespottet. Von den beiden Filtersätzen wurden mehrere Exemplare erstellt. Jeder der beiden unabhängigen Filtertypen wurde wiederholt mit RNA (DIG) / cDNA (αP^{32}) der einzelnen Zelllinien hybridisiert.

Die Filter wurden teilweise mittels Instant Imager (Canberra-Packard) ausgewertet, in der überwiegenden Mehrheit wurden jedoch die aus DIG-Hybridisierungen hervorgegangenen Fluoreszenzfilme eingescannt und mit Hilfe von Bildbearbeitungs-Software invertiert. Mittels Genepix-Software (Axon-Instr.) zur Analyse von Fluoreszenz-Experimenten wurde dann der Helligkeitswert der einzelnen Spots vermessen. Das Programm erlaubt die rasche und gleichmäßige Vermessung der einzelnen Spots unter definierten Bedingungen durch Erstellung spezifischer Matrizen. Zunächst wurden die so gewonnenen Daten für die Ermittlung der Inter- und Intra-Filter-Variabilität genutzt, um die Aussagekraft der einzelnen Experimente zu validieren.

Beispielhaft sind in Abbildung 3.33 die Fluoreszenzbilder zweier Filter abgebildet, die aus den Hybridisierungen hervorgegangen sind.

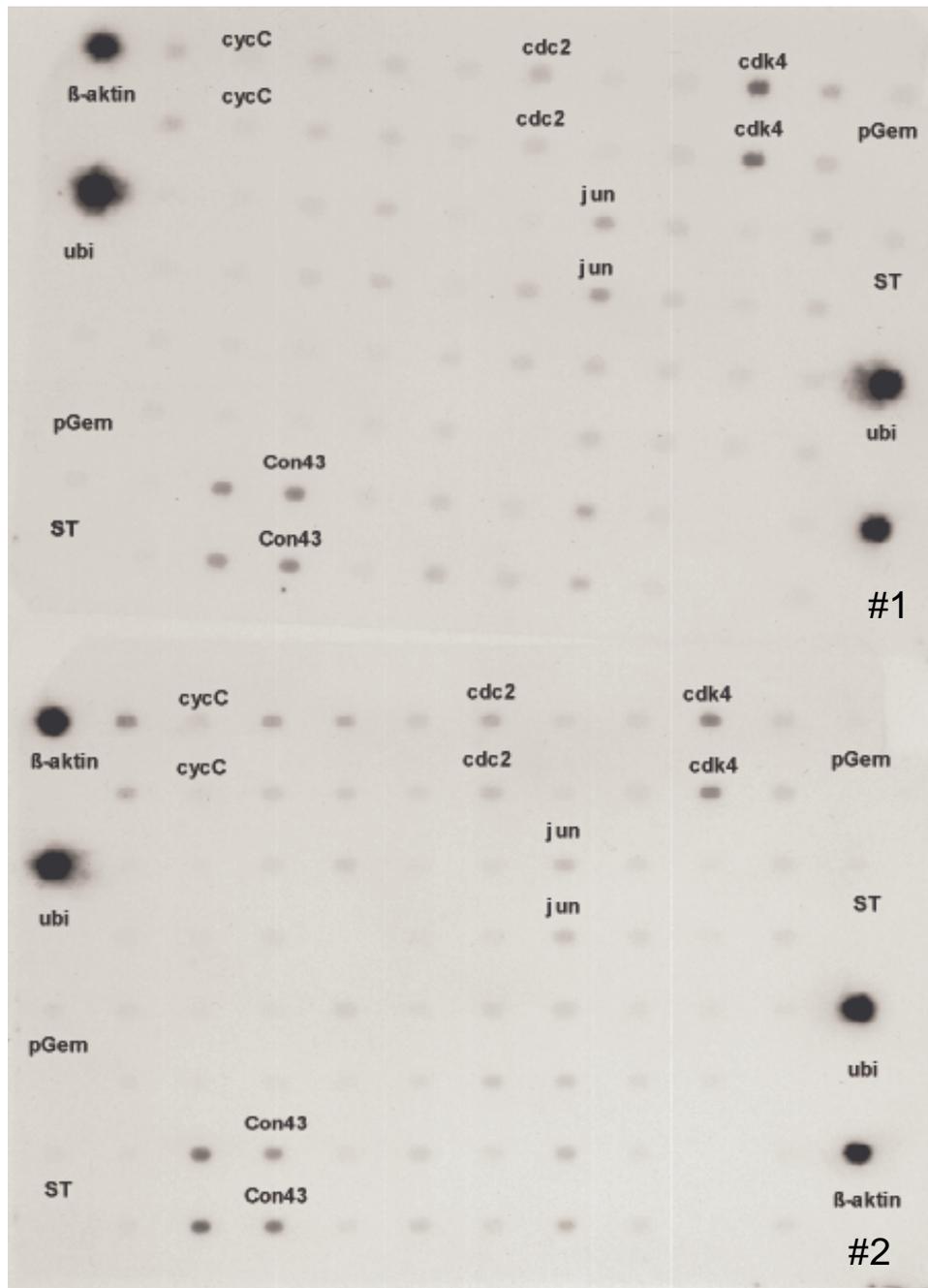


Abb. 3.33 – Zwei cDNA-Arrays, hybridisiert mit mRNA von Zelllinie 7: Die Abbildung zeigt exemplarisch zwei (#1 und #2) unabhängig voneinander, mit mRNA aus demselben Pool der Zelllinie 7 hybridisierte Membranen des gleichen Typs mit dem Klonsatz I (vgl. Abb 3.14) für Zellzyklus-Gene, Transkriptionsfaktoren und Gene der Zell-Zell-Kommunikation. Einzelne Klone sind beispielhaft beschriftet.

Interne Kontrolle

Um die Qualität eines Experimentes zu prüfen, wurden die innerhalb eines Filters gewonnenen Daten (1. und 2. Spot jedes Klons) verglichen. Die Hintergrund-

bereinigten Werte der Replika-Spots jedes Klons wurden aus diesem Grund gegeneinander in einem Scatter-Plot (Spot 1: x-Achse; Spot 2: y-Achse) aufgetragen. Je besser die Qualität des Experimentes, desto gleicher waren die gemessenen Helligkeits-Werte der beiden Replika-Spots untereinander. Je ähnlicher sich die Werte waren, desto näher lagen die so generierten Datenpunkte an der Trendlinie des Scatter-Plots.

Einer der aus den in Abbildung 3.33 gezeigten Filtern (#1 und #2) hervorgegangenen Scatter-Plot zur internen Qualitätskontrolle sind exemplarisch im folgenden (Abb. 3.34) abgebildet:

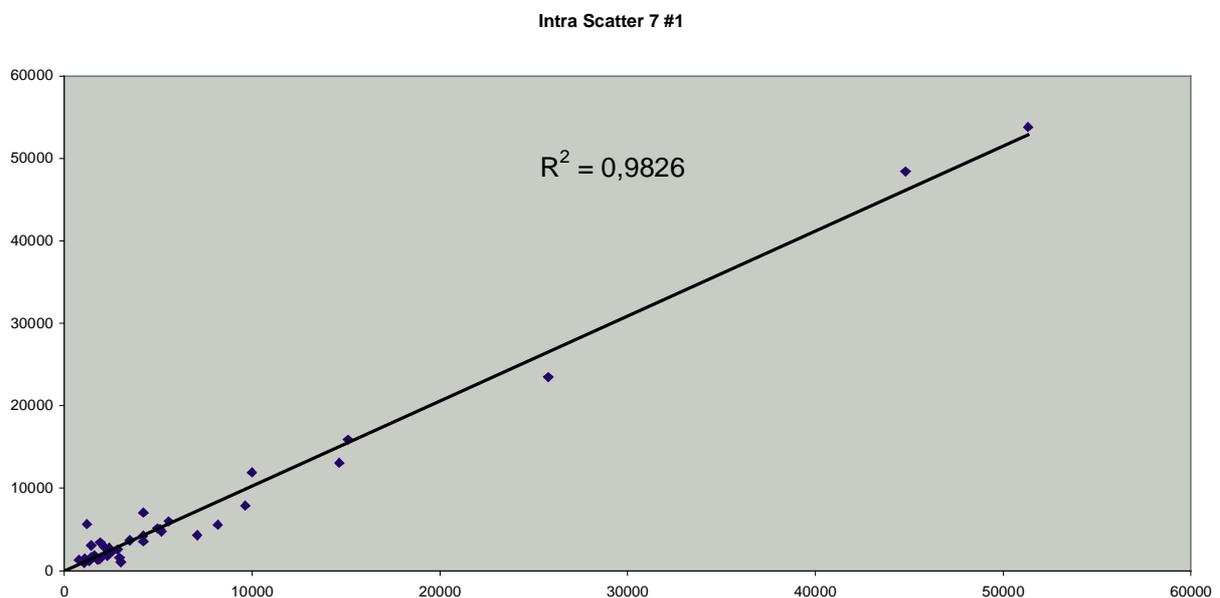


Abb. 3.34 – Auftragung der Messwerte der Replika-Spots des Filters aus Abb. 3.33 gegeneinander. Ergibt sich aus dem Verhältnis der Meßwerte im Idealfall $x/y = 1,0$, so sollten die Datenpunkte auf der Trendlinie und der Regressionskoeffizient (R^2) bei 1,0 liegen.

Es zeigte sich, daß die erhobenen Daten bei optimaler Hybridisierung von hoher Qualität waren und durch die interne Kontrolle bestätigt wurden. Bei stark von einander abweichenden Werten zweier Replika-Spots wurde zunächst die physikalische Ursache überprüft. Überdurchschnittlich stark voneinander abweichende Werte konnten auf starke, punktuelle Unterschiede im Hintergrund zurückgeführt werden. Dieser Zusammenhang wurde bei der Auswertung der Experimente gegebenenfalls berücksichtigt.

Externe Kontrolle - Reproduzierbarkeit

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der gewonnenen Daten, wurden jeweils Replika-Filter des gleichen Klonsatzes, die mit mRNA aus dem gleichen Pool hybridisiert worden waren, miteinander verglichen. Beispielhaft ist hier der Scatter-Plot (Abb. 3.35) der beiden in Abb. 3.33 gezeigten Filter #1 und #2 abgebildet, der sich aus der Auftragung der Mittelwerte zweier Replika-Spots des Filters #1 gegen die entsprechenden Werte des Filters #2 ergibt.

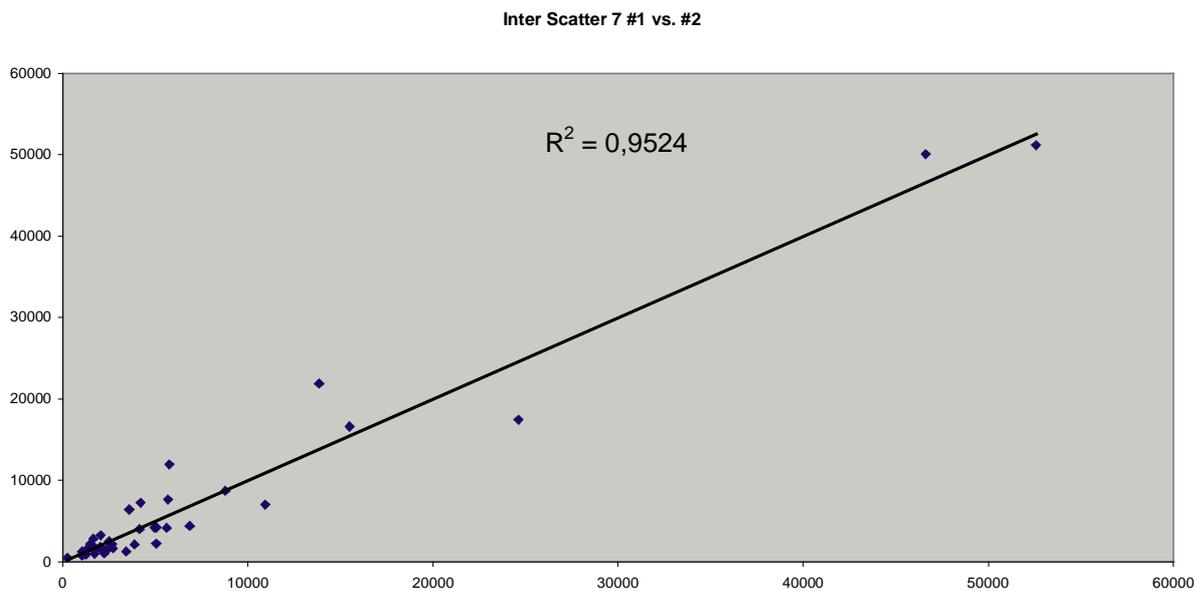


Abb. 3.35 – Scatter-Plot aus der Auftragung der Mittelwerte zweier Replika-Spots von zwei gleichartigen, mit mRNA aus dem gleichen Pool hybridisierten Filter (I #1 und #2), gegeneinander. Auch hier nähert sich der Regressionskoeffizient (R^2) dem Wert 1,0.

Die Auftragung macht deutlich, daß auch im Vergleich zweier unabhängiger Experimente untereinander die Datenqualität sehr gut ist. Die Reproduzierbarkeit der Methode ist damit nachgewiesen.

Differentiell exprimierte Gene

Nach Hintergrund-Bereinigung und Normalisierung (s. 2.2.6.1) wurden die Mittelwerte aller Daten gebildet, die für einen spezifischen cDNA-Klon in verschiedenen Experimenten mit demselben mRNA-Pool generiert worden waren. Um die Frage nach der differentiellen Expression eines bestimmten Gens in zwei Zelllinien zu beantworten, wurde aus den jeweiligen Mittelwerten eines cDNA-Klons,

die sich aus den Datensätzen für zwei Zelllinien ergaben, ein Quotient (Ratio) gebildet. Dieser Quotient wurde gegen die Basis zwei logarithmiert und zur Erleichterung der Auswertung in einem Balken-Diagramm dargestellt. Bei einem gegen eins tendierenden Ratio, also gleichmäßiger Expression eines Gens in den verglichenen Zelllinien, bewegte sich somit der Wert des Logarithmus gegen null. Die Daten konnten auf diese Weise als Ausschlag von der x-Achse, die an den Nullpunkt gesetzt wurde, dargestellt werden.

Nachteilig an der Darstellung logarithmierter Werte wirkt die durch die logarithmische Stauchung bedingte Schwankung relativ kleiner, gegen eins tendierender Quotienten. Dies machte, neben den experimentell bedingten Fehlern in der Daten-Generierung, die Festlegung eines Fehlerbereiches (Cut Off) notwendig. Dieser wurde in Höhe der doppelten Standardabweichung der logarithmierten Ratios der jeweiligen Datensätze der Experimente mit Klonsatz I und derer mit Klonsatz II angesetzt. Ausgehend von der Annahme, daß die Mehrheit der untersuchten Gene nicht dereguliert wird, stellt die Standardabweichung der logarithmierten Quotienten (logRatio) ein Maß für die experimentell bedingte Schwankung der Meßgenauigkeit dar. Ein Gen, dessen logRatio über dem Zweifachen des Cut Offs lag, wurde als dereguliert betrachtet.

Es wurden Daten für die drei Zelllinien (MBECL 5/A; 5/D und 7) mit den Klonsätzen I und II generiert und wie folgt ins Verhältnis gesetzt: 5/A versus 7; 5/D versus 7 und 5/A versus 5/D. Als Zelllinie mit der geringsten Passagenzahl, nicht tumorigenem-, im Vergleich langsamstem Wachstum und diploidem Chromosomensatz, wurde die Linie MBECL 7 als Kontrolle verwendet. Ein Vergleich der Zelllinien 5/A und 5/D sollte Hinweise auf die Ursachen des tumorigenen Wachstums der Linie MBECL 5/A liefern.

Auf den folgenden Seiten sind die Ergebnisse der Hybridisierungs-Experimente (Abb. 3.36-3.45) mit mRNA aus den Zelllinien MBECL 5/A, 5/D und 7 graphisch dargestellt. Die Standardabweichung der Ratios der Experimente mit Klonsatz I betrug 1,1 und die der Experimente mit Klonsatz II 0,5. Der 'Cut Off' wurde daher bei Klonsatz I mit 2,2 und bei Klonsatz II mit 1,0 festgelegt.

Ratio-Werte, die über den zweifachen 'Cut Off' hinausgingen, wurden weiß markiert. Die so markierten Gene gelten als dereguliert, d.h. über- bzw. unterexprimiert.

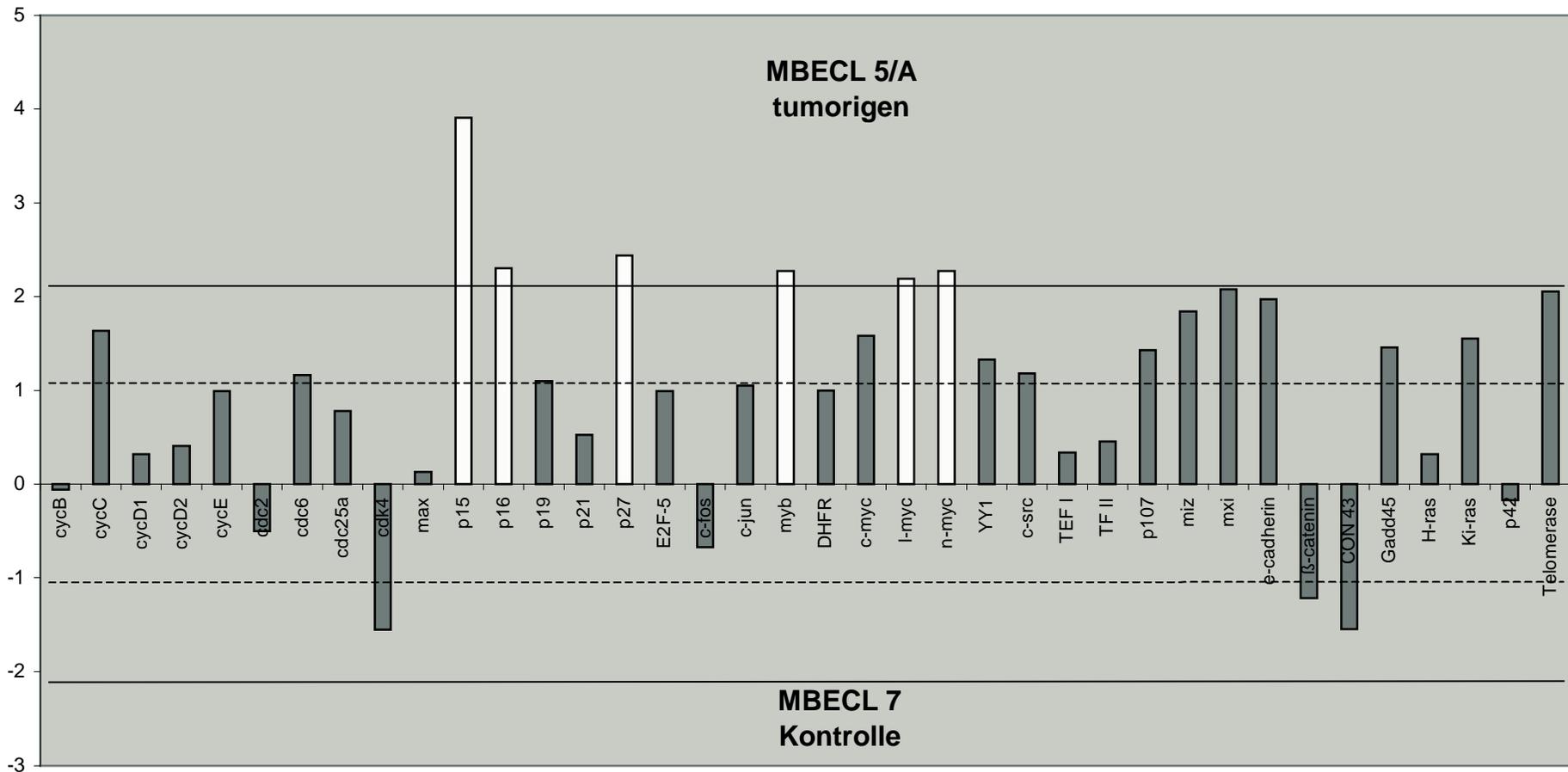


Abb. 3.36 - Klonsatz I (s. Tab. 3.15) - Auftragung der logarithmierten Ratio-Werte aus den mittleren Signalintensitäten der Linien MBECL 5/A (tumorigen) im Verhältnis zu MBECL 7 (Kontrolle): Bei MBECL 5/A sind die Werte für p15, p16, p27, l- und n-myc und e-cadherin im Vergleich zu MBECL 7 erhöht. Ausschlag im positiven Bereich = Überexpression in MBECL 5/A; Ausschlag im negativen Bereich = Überexpression in MBECL 7; durchgezogene Linie = doppelte Standardabweichung der Ratios; gestr. Linie = einfache Standardabweichung; weiße Balken = deregulierte Gene (> doppelte Standardabw.)

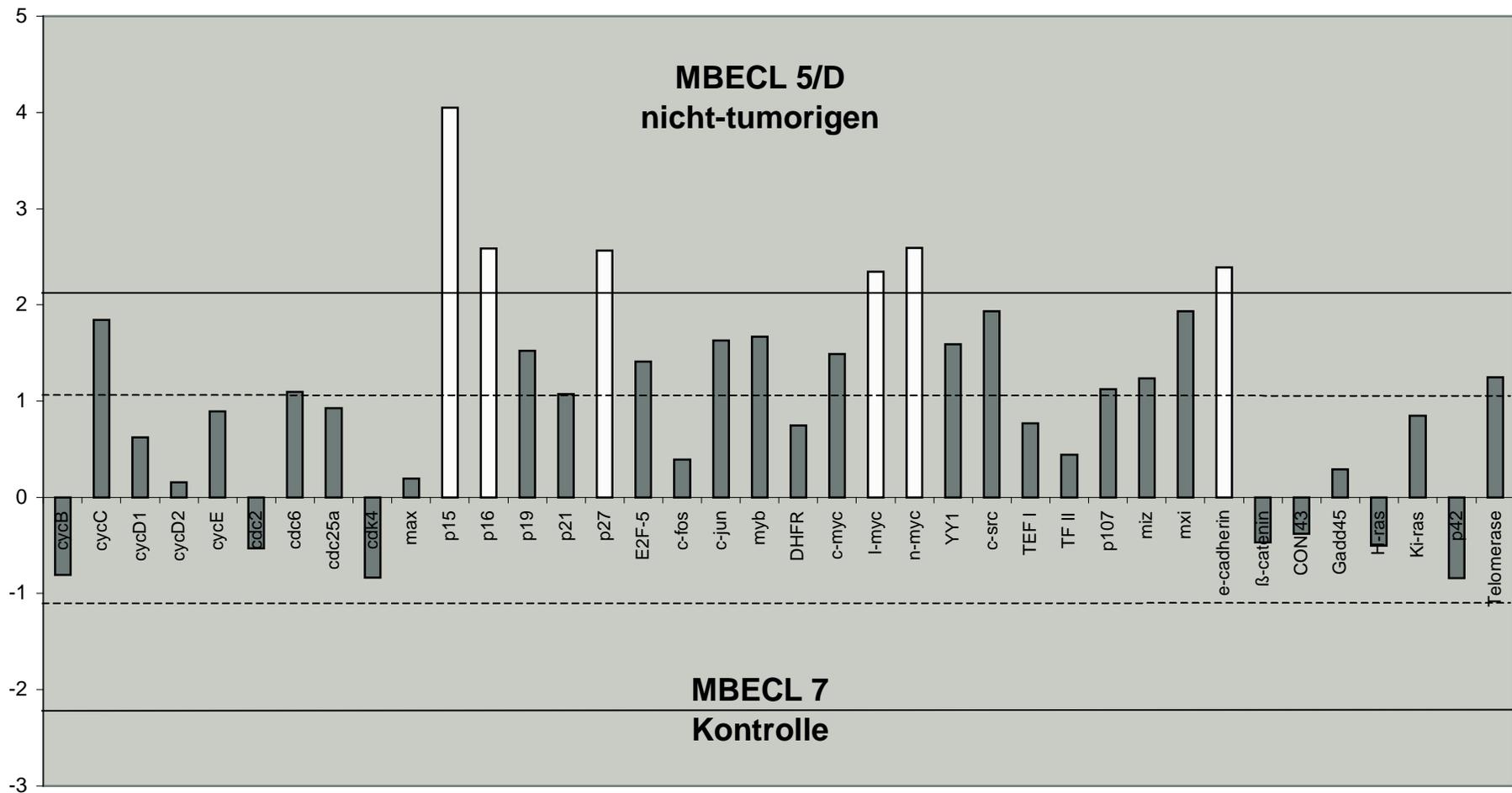


Abb. 3.37 - Klonsatz I (s. Tab. 3.15) - Auftragung der logarithmierten Ratio-Werte aus den mittleren Signalintensitäten der Linien MBCECL 5/D im Verhältnis zu MBCECL 7: Bei MBCECL 5/D sind die Werte für p15, p16, p27, l- und n-myc und e-cadherin im Vergleich zu MBCECL 7 (Kontrolle) erhöht. Ausschlag im positiven Bereich = Überexpression in MBCECL 5/D; Ausschlag im negativen Bereich = Überexpression in MBCECL 7; durchgezogene Linie = doppelte Standardabweichung; gestr. Linie = Standardabweichung; weiße Balken = deregulierte Gene

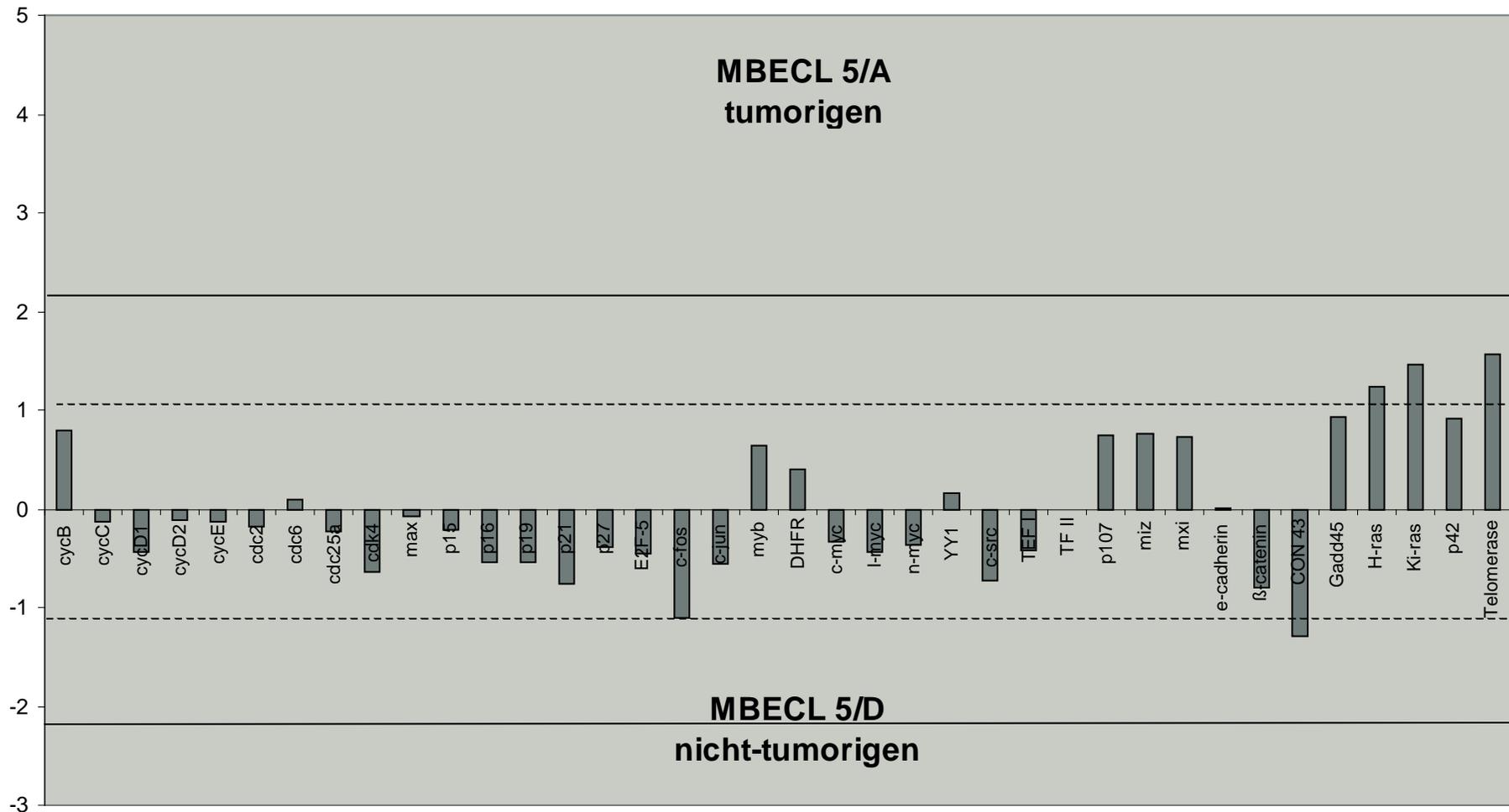


Abb. 3.38 - Klonsatz I (s. Tab. 3.15) - Auftragung der logarithmierten Ratio-Werte aus den mittleren Signalintensitäten der Linien MBECL 5/A im Verhältnis zu MBECL 5/D: Es sind keine Expressionsunterschiede festzustellen. Ausschlag im positiven Bereich = Überexpression in MBECL 5/A; Ausschlag im negativen Bereich = Überexpression in MBECL 5/D; durchgezogene Linie = doppelte Standardabweichung; gestr. Linie = Standardabweichung; weiße Balken = deregulierte Gene

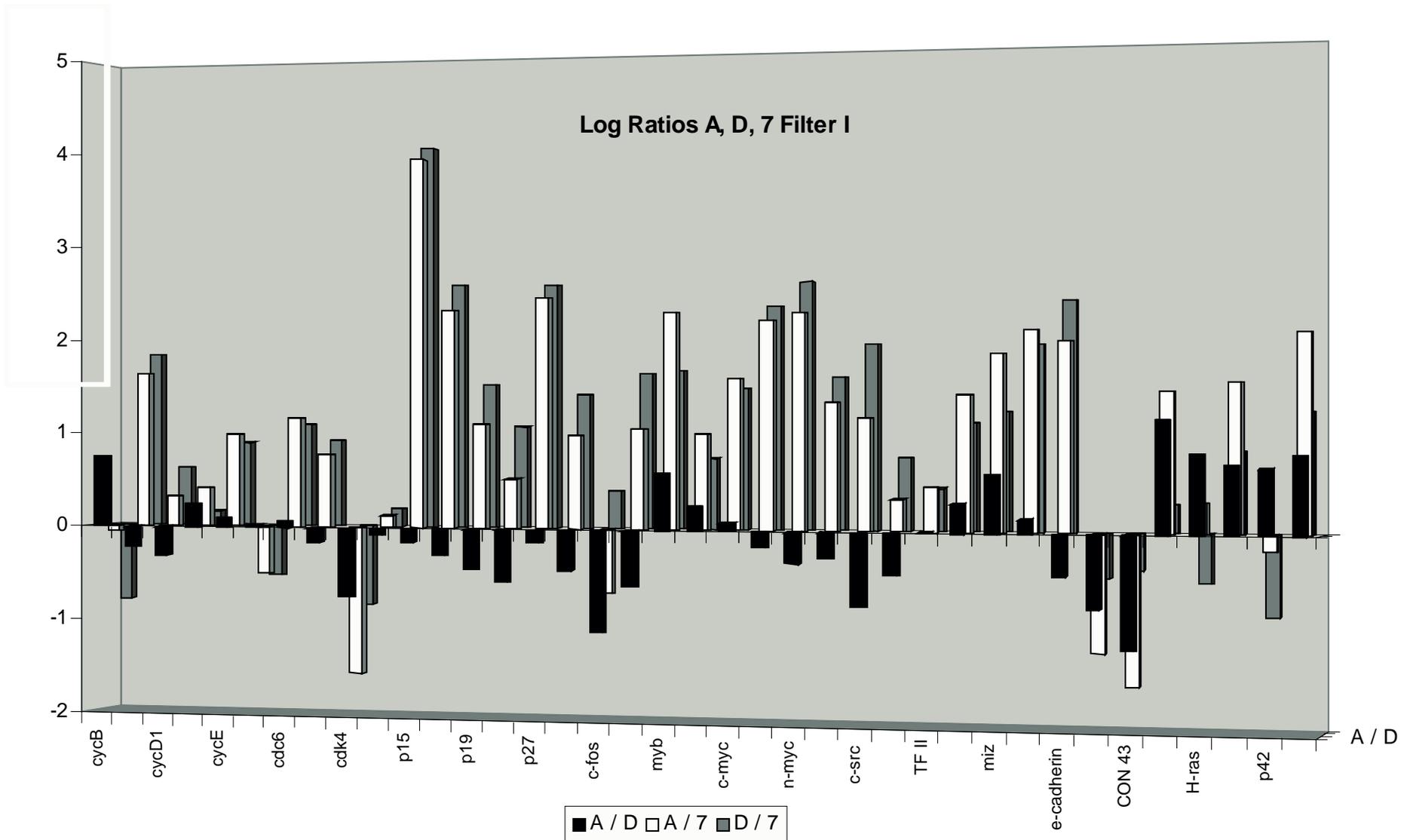


Abb. 3.39 - Klonsatz I: Vergleichende Auftragung der Daten aus den Abbildungen 3.36, 3.37 und 3.38. Die Expressionsmuster der Zelllinien MBECL 5/A und 5/D unterscheiden sich kaum (schwarze Balken), zudem sind die Expressions-Unterschiede von 5/A und 5/D im Vergleich zur Kontrolle (MBECL 7), untereinander sehr ähnlich (weiß, dunkelgrau). Von letzterer weichen die Expressionsmuster der Zelllinien 5/A und 5/D stark ab. Transkriptionsfaktoren und Zellzyklusinhibitoren sind bei MBECL 5/A und /D erhöht.

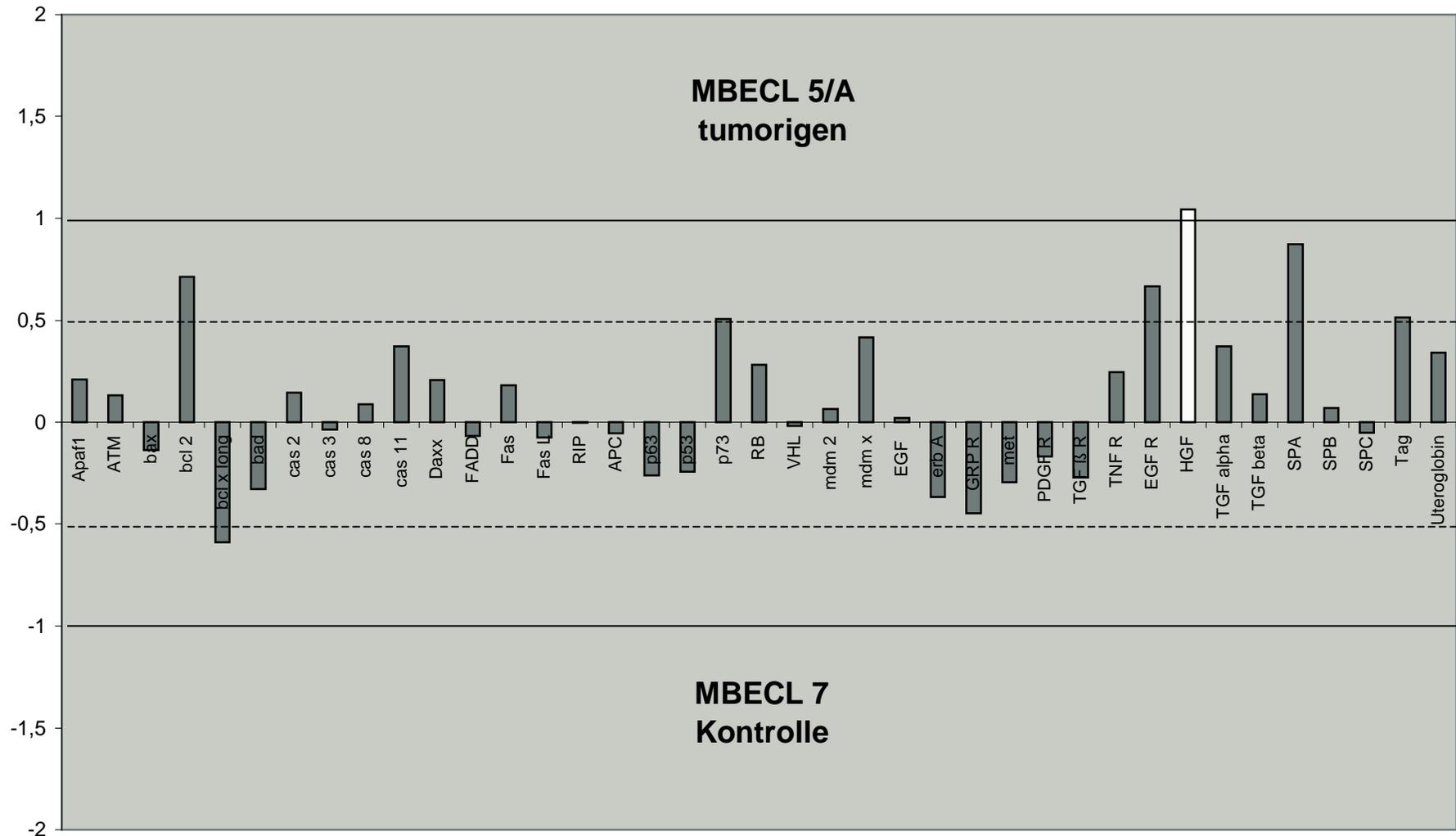


Abb. 3.40 - Klonsatz II (s.Abb. 3.16) - Auftragung der logarithmierten Ratio-Werte aus den mittleren Signalintensitäten der Linien MBECL 5/A (tumorigen) im Verhältnis zu MBECL 7 (Kontrolle): Ausschlag im positiven Bereich = Überexpression in MBECL 5/A; Ausschlag im negativen Bereich = Überexpression in MBECL 7; durchgezogene Linie = doppelte Standardabweichung; gestr. Linie = Standardabweichung; weiße Balken = deregulierte Gene

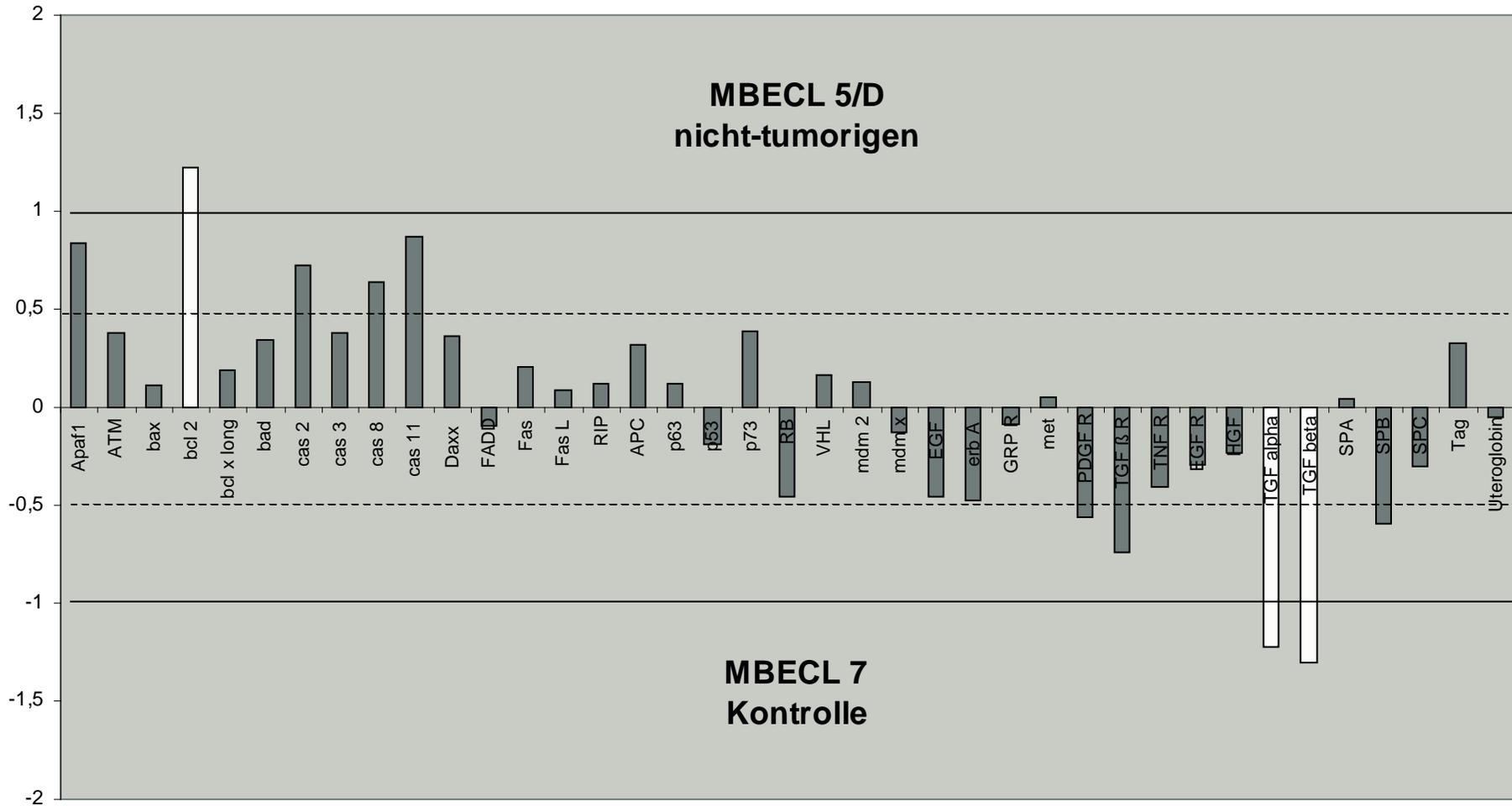


Abb. 3.41 - Klonsatz II (s.Abb. 3.16) - Auftragung der logarithmierten Ratio-Werte aus den mittleren Signalintensitäten der Linien MBECL 5/D im Verhältnis zu MBECL7: Ausschlag im positiven Bereich = Überexpression in MBECL 5/D; Ausschlag im negativen Bereich = Überexpression in MBECL 7; durchgezogene Linie = doppelte Standardabweichung; gestr. Linie = Standardabweichung; weiße Balken = deregulierte Gene

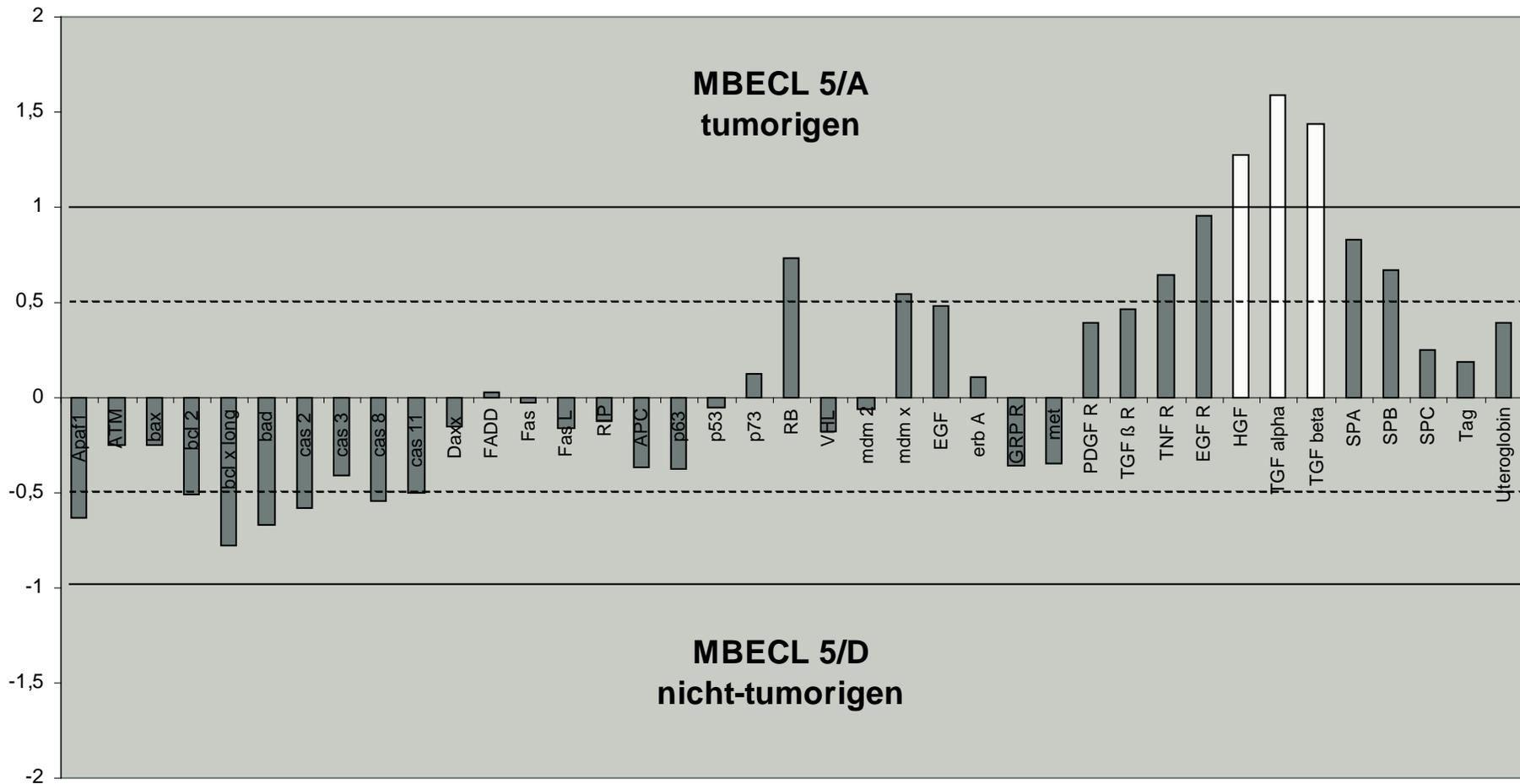


Abb. 3.42 - Klonsatz II (s.Abb. 3.16) - Auftragung der logarithmierten Ratio-Werte aus den mittleren Signalintensitäten der Zelllinien MBECL 5/A im Verhältnis zu MBECL 5/D: Ausschlag im positiven Bereich = Überexpression in MBECL 5/A; Ausschlag im negativen Bereich = Überexpression in MBECL 5/D; durchgezogene Linie = doppelte Standardabweichung; gestr. Linie = Standardabweichung; weiße Balken = deregulierte Gene

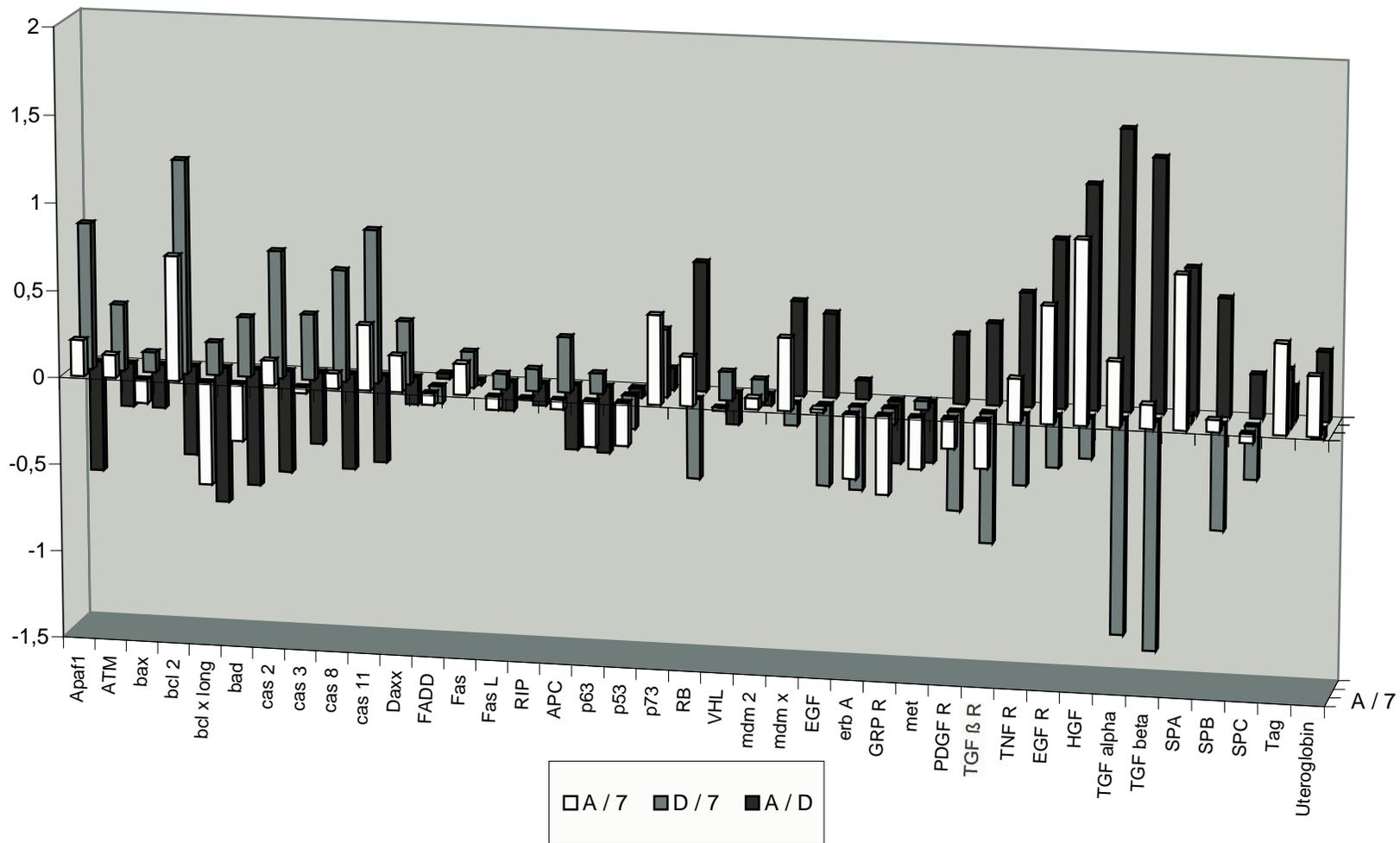


Abb. 3.43 - Klonsatz II: Vergleichende Auftragung der Daten aus den Abbildungen 3.40, 3.41 und 3.42. Deutlich treten hier die Unterschiede in den Expressionsmustern von MBECL 5/A und 5/D (s. schwarze Balken) hervor. Während MBECL 5/A TGF alpha und beta wie MBECL 7 exprimiert, sind diese in 5/D unterrepräsentiert; auch die Apoptose-Gene sind bei MBECL 5/D im Vergleich zu 5/A (schwarz) und 7 (dunkelgrau) beachtenswert (s. graue Pfeile).

Zusammenfassung

Für den Klonsatz I (Zellzyklus, Transkriptionsfaktoren, Gene der Signaltransduktion und der Zell-Zell-Kommunikation) haben sich folgende Überexpressions- bzw. Repressionsmuster ergeben (Tab. 3.13):

	Im Vergleich zu 5/A	Im Vergleich zu 5/D	Im Vergleich zu 7
<i>In 5/A hochreguliert</i>		-	p15, p16, p27, myb, l-myc, n-myc
<i>In 5/D hochreguliert</i>	-		p15, p16, p27, l-myc, n-myc, e-cadherin

Tab. 3.13 – In der Tabelle sind alle Gene des Klonsatzes I (Tab. 3.11) aufgeführt, die im Verhältnis der Expression in zwei Zelllinien zueinander als dereguliert betrachtet werden konnten.

Für den Klonsatz II (Gene der Apoptose, Tumorsuppressoren, Rezeptoren und Zell-Marker) konnte folgendes Muster festgestellt werden (Tabh. 3.14):

	Im Vergleich zu 5/A	Im Vergleich zu 5/D	Im Vergleich zu 7
<i>In 5/A hochreguliert</i>		HGF	HGF
<i>In 5/D hochreguliert</i>	-		Bcl 2
<i>In 5/D herunterreguliert</i>	TGF α , TGF β	-	TGF α , TGF β

Tab. 3.14 - In der Tabelle sind alle Gene des Klonsatzes II (Tab. 3.12) aufgeführt, die im Verhältnis der Expression in zwei Zelllinien zueinander als dereguliert betrachtet werden konnten.

Für die Diskussion der Deregulationseffekte sollten außerdem die Signale nicht außer Acht gelassen werden, die über die einfache Standardabweichung der Quotienten (Ratios) und damit über das experimentelle Rauschen hinausgehen aber durch die Cut Off-Definition als nicht-dereguliert betrachtet werden müssen.

Wenn sich die Daten der verschiedenen Experimente bestätigen, so kann man aus ihnen einige interessante Trends ablesen. So sind z.B. die Werte der meisten Apoptose-relevanten Gene bei MBECL 5/D im Vergleich zu MBECL 7 und der tumorigenen MBECL 5/A erhöht. MBECL 5/A weist im Vergleich zu Linie 7 kaum Unterschiede in der Expression von Apoptose-Genen auf. Daraus läßt sich eine erhöhte Apoptose-Aktivität bei der Linie MBECL 5/D ableiten. Diese Effekte werden in der Diskussion ebenfalls mit berücksichtigt.

4. DISKUSSION

Dem im Begriff 'multi-step'-Karzinogenese zusammengefaßten Tumorigenese-Prozeß, der in seiner Komplexität bislang nur teilweise aufgelöst werden konnte, liegen initiale genetische Ereignisse zu Grunde. Zugleich führt die im Laufe dieses Prozesses zunehmende genetische Instabilität von transformierten Zellen zu weiteren genetischen Alterationen (Lengauer *et al.*, 1998).

Da für verschiedene humane Tumortypen eine große Zahl von deregulierten Genen nachgewiesen werden konnte, stellt sich die Frage nach der funktionellen und temporalen Kausalkette genetischer Alterationen im Fortschreiten der Karzinogenese von Initiation über Promotion und Progression des Tumors.

Diese Fragestellung wurde in dieser Arbeit an zwei unterschiedlichen Systemen, dem Mausmodell (*in vivo*) und Zellkultur (*in vitro*), untersucht.

4.1 Synergie von Onkogenen bei der Progression von Adenokarzinomen der Lunge

Für viele humane Lungenkarzinome ist die Überexpression von c-myc, Cyclin D1 oder EGF gezeigt worden (Wiethage *et al.*, 1994; Malkinson, 1998). Außerdem wurde gezeigt, daß in ca. 50% der humanen NSCLCs zumindest ein Allel des p53-Gens deletiert ist (Wiethage T. *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1992). Vorliegende Untersuchungen sollten daher synergistische Effekte der Onkogene c-myc, IgEGF und Cyclin D1 bei der Entstehung von Adenokarzinomen der Lunge prüfen. Darüber hinaus sollte die Rolle des Tumorsuppressor-Gens p53 bei der Tumorigenese von aus Clara- bzw. AT II-Zellen hervorgegangenen Adenokarzinomen der Lunge untersucht werden. Durch Einkreuzung der Transgene in einen p53-Knock Out-Hintergrund sollte geklärt werden, ob Verluste von Allelen dieses Gens kausal an der Entwicklung von Adenokarzinomen der Lunge beteiligt sind.

4.1.1 Mehrfach transgene Tiere

Von den in den Arbeiten von A. Geick und A. Erhardt (beide 1998) etablierten Mausmodellen für Adenokarzinome der Lunge, die Zell-spezifisch die oben genannten Onkogene exprimieren, entwickelt nur die SPC-c-myc-Linie (exprimiert c-myc unter der Kontrolle des SPC-Promotors), nicht aber die SPC-IgEGF und auch

nicht die Ug-c-myc, Ug-IgEGF und Ug-Cyclin D1-transgenen Linien Lungentumore. Es stellt sich daher die Frage, ob die transgen exprimierten Onkogene tatsächlich nicht kausal an der Tumor-Initiation beteiligt sind. In der Regel sind mehrere genetische Veränderungen notwendig, um eine Zelle zu transformieren (Vogelstein und Kinzler, 1993). Wenn also bei den einfach-transgenen Tieren keine Tumorigenese beobachtet werden konnte, so kann diese bei doppelt- oder mehrfach-transgenen Mäusen möglicherweise auftreten.

Von den aus diesem Grund für diese Arbeit generierten, mehrfach transgenen Tieren, die Zelltyp-spezifisch zwei Onkogene (SPC-c-myc/IgEGF bzw. UG-c-myc/IgEGF; Ug-c-myc/Cyclin D1; Ug-IgEGF/Cyclin D1) überexprimierten, zeigten die SPC- und Ug-c-myc/IgEGF doppelt-transgenen Tiere weder eine beschleunigte Pathogenese (SPC-c-myc/EGF), noch eine Erhöhung des Anteils der Tiere mit pathologischen Veränderungen der Lunge. Die SPC-c-myc/IgEGF-Tiere erreichten beispielsweise wie die Tiere der parentalen SPC-c-myc Zuchtlinie ein mittleres Lebensalter von 12 Monaten. Da nicht alle Tiere der SPC-c-myc/IgEGF-Linie Tumore entwickelten und 12 Monate ungefähr der halben Lebensspanne einer CD2F-1-Wildtyp-Maus entsprechen, kann angenommen werden, daß ein SPC-c-myc-transgenes Tier zwar noch weitere genetische Veränderungen akquirieren muß, um Adenokarzinome zu entwickeln, daß aber eine gleichzeitige IgEGF- neben der c-myc-Expression offenbar keinen Einfluß auf die Entwicklung von Adenokarzinomen hat. Ansonsten müßte eine Beschleunigung der Pathogenese bei der SPC-c-myc-, bzw. bei der Ug-Linie eine Erhöhung des Anteils moribunder Tiere mit Adenokarzinomen oder Hyperplasien der Lunge beobachtet werden.

Die Tiere mit dem Ug-c-myc/Cyclin D1-Genotyp erreichten ein sehr hohes Lebensalter (~21 Monate) und wiesen wie die einfach-transgenen parentalen Linien nur in Einzelfällen pathologische Veränderungen (Hyperplasien, Tumore) der Lunge auf. Demnach gibt es auch hier keine synergistischen Effekte zwischen den beiden Protoonkogenen.

Die Ug-IgEGF/Cyclin D1-doppelt transgenen Tiere zeigten dagegen im Vergleich zu den beiden Stammlinien eine um ca. 40 % reduzierte Lebenserwartung. Gleichzeitig konnte in drei von drei obduzierten Tieren eine pathologische Veränderung der Lunge diagnostiziert werden. Auch hier deutet das erreichte mittlere Alter (~10 Monate) darauf hin, daß zusätzlich noch weitere genetische Defekte notwendig waren, um eine Tumorentwicklung zu ermöglichen. Es zeigt aber auch deutlich, daß

bei den Ug-IgEGF / Cyclin D1-Tieren Synergien wirken, die aus der gleichzeitigen IgEGF- und der Cyclin D1-Überexpression resultieren, da beide parentalen Stamm-Linien entweder gar keine (Ug-IgEGF) oder selten und dann im hohen Alter (Ug-Cyclin D1) Adenokarzinome der Lunge entwickelten. Möglicherweise induziert IgEGF die Expression des endogenen Cyclin D1, so daß zusammen mit dem transgenen Cyclin D1 ein für die Initiation von Zellproliferation kritischer Schwellenwert überschritten wird (Perry *et al.*, 1998). Es stellt sich also die Frage, ob eine Überexpression von EGF nicht eher an der Tumorprogression, d.h. an der Erhöhung der Wachstumsautonomie und der Invasivität, als an der Initiation neoplastischer Veränderungen beteiligt sein könnte. Diese Wirkung von EGF konnte *in vitro* bereits gezeigt werden (Cao *et al.*, 2000).

Ein überraschendes Ergebnis der pathologischen Untersuchungen der Lungen- und Tumorgewebe von den oben beschriebenen Mauslinien war, daß in der großen Mehrheit aller untersuchten Gewebe-Proben Misch-Neoplasien (Typ 3) aus Clara und AT II-Zellen festgestellt worden sind. In einem Fall wurden sogar ATII-Neoplasien in Proben aus einem Ug-Cyclin D1-transgenen Tieres gefunden, welches eigentlich Clara-Zell-spezifische Veränderungen hätte aufweisen sollen. Dieser Befund deutet darauf hin, daß möglicherweise die Zell-Spezifität der SPC- bzw. Ug-Promotoren bislang falsch beurteilt worden ist, bzw. das geltende Dogma der spezifisch von einander zu trennenden Clara und ATII- Zelltypen neu überdacht werden muß (s. hierzu auch 4.2).

4.1.2 Rolle des Tumorsuppressors p53

Es zeigte sich, daß im Gegensatz zu den Ug-c-myc/Cyclin D1-Tieren, von denen keines von 5 obduzierten Tieren eine Veränderung der Lunge aufwies, die Ug-c-myc/Cyclin D1/p53 $-/-$ -Tiere in drei von vier obduzierten Fällen eine pathologische Veränderung der Lunge aufwiesen. Bei den Ug-Cyclin D1/P53 $-/-$ -Tieren konnte sogar in drei von drei Tieren neoplastische Veränderungen nachgewiesen werden. Daraus läßt sich folgern, daß die Entstehung (Initiation) der beobachteten neoplastischen Veränderungen durch die Deletion von Allelen des Tumorsuppressorgens p53 begünstigt wird. Ob aber die Promotion der Neoplasie zu Adenom oder Karzinom beschleunigt wird, ließ sich nicht feststellen, da die Tiere mit p53 $-/-$ -Hintergrund alle im Alter von 4-6 Monaten starben. Ursächlich hierfür war i.d.R. die

spontane Entwicklung von malignen Lymphomen (Donehower *et al.*, 1992; Finlay, 1992).

Von den p53 +/- -Tieren zeigten nur die Ug-myc/p53 +/- -Tiere eine im Vergleich zu den Zuchtlinien um ca. 30% verkürzte Lebenserwartung, jedoch wies nur eines von drei obduzierten Tieren eine pathologische Veränderung der Lunge auf. Auch hier muß auf Grund der mittleren Lebenserwartung dieser Tiere (ca. 10 Monate) davon ausgegangen werden, daß noch weitere genetische Defekte zu den transgenen Alterationen hinzutreten mußten, um die Tumorigenese zu beschleunigen. Außerdem verendeten diese Tiere offenbar nicht an einer Wucherung des Lungengewebes. Vermutlich führten bei ihnen Lymphome und möglicherweise Nierenversagen zum Tod, da die Ug-c-myc transgenen Mäuse häufig cystische Nieren entwickelten.

Tatsächlich müssen für Lungen-Adenokarzinome aus AT II- und Clara-Zellen also wohl mindestens zwei, vermutlich sogar noch mehr genetische Defekte akkumuliert werden, wofür statistisch eine gewisse Zeitspanne erforderlich ist. Aus diesem Grund sterben p53- -/- -Tiere an Lymphomen, bevor sie überhaupt Adenokarzinome der Lunge entwickeln.

Der Wachstumsfaktor EGF scheint einen beschleunigenden Effekt auf die Tumorentwicklung zu haben, selbst aber nicht an der Tumorentstehung (Initiation) beteiligt zu sein.

4.2 Murine Clara-Zellen als Modell der humanen Adenokarzinogenese

Mit der Etablierung muriner Clara-Zelllinien verfolgte diese Arbeit das Ziel, immortale, möglichst differenzierte Zelllinien für toxikologische und Karzinogenese-Studien zu generieren und darüber hinaus deren Relevanz als *in vitro*-Modell für die humane Adenokarzinogenese nachzuweisen. Aus den Kultivierungsexperimenten mit Lungengewebe aus SV40-TAg-transgenen Mäusen gingen mehrere Zelllinien hervor, die zu diesem Zweck zunächst hinsichtlich ihrer Clara-Zell-spezifischen Eigenschaften und ihres Differenzierungsgrades untersucht wurden.

4.2.1 Charakterisierung der Zelllinien auf ihren Differenzierungsgrad

Die nach der Krise (~20ste Passage) aus der Zelllinie MBECL 5 durch Klonierung hervorgegangenen MBECL 5/A und 5/D wuchsen ebenso, wie die MBECL 7 zunächst als epitheliale Monolayer mit rundlichen Zellen, wie es von Epithelzellen zu erwarten ist.

Bei der Untersuchung der Ultrastruktur dieser Zelllinien durch Elektronenmikroskopie zeigte sich eine deutliche Übereinstimmung mit Literaturangaben zur Clara-Zell-Morphologie. Alle drei Zelllinien wiesen Microvilli, jedoch keine Zilien, viel Endoplasmatisches Reticulum, rundliche, große Mitochondrien und eine Vielzahl vesikulärer Einschlüsse auf, die auf einen sekretorischen Charakter der Zellen hindeuteten (Literaturvergleich s. Tab. 4.1). Daß zunächst *in vitro* nur wenige der *in situ* für Clara-Zellen typischen elektronendichten Vesikel beobachtet werden konnten, kann als Anzeichen für eine Reduktion des zelltypischen Metabolismus betrachtet werden. Diese läßt sich dem Verlust mesenchymaler Signale, der fehlenden epithelialen Architektur und Zell-Zell-Kommunikation zuschreiben, da den Zellen *in vitro* die komplexe Nachbarschaft verschiedenster z.T. hochspezialisierter Zellen fehlt, in die Clara-Zellen im Lungenepithel normalerweise eingebettet sind (Forbes, 2000; Plopper, 1983). Eine Ultrastruktur-Analyse von Tumorgewebe, das aus Injektionen von MBECL 5/A-Zellen in Nacktmäuse entstanden ist, ergänzte das *in vitro* gewonnene Bild, da die Tumorzellen sich in einer *in situ*-Situation entwickeln konnten. In den Tumorzellen konnten elektronendichte, von singulären Membranen umgebene Vesikel (Abb. 3.30 und 3.31) z.T. mit Lokalisation am Golgi Apparat ebenso gezeigt werden, wie desmosomale Strukturen und auch, üblicherweise als AT II-Zell-Marker beschriebene, 'multi lamellar-bodies' (s. Abb. 3.32). Die Existenz elektronendichter Vesikel wird in der Literatur als charakteristisches Merkmal von Clara-Zellen genannt (Pankow *et al.*, 1989; Plopper, 1983; Widdicombe und Pack, 1982). Häufig werden sie als sekretorische Vesikel bezeichnet (Devereux, 1984). Möglicherweise handelt es sich jedoch auch um Peroxisomen-ähnliche Strukturen (Widdicombe und Pack, 1982; Goldenberg *et al.*, 1978). Diese könnten als 'Detoxifikations-Organellen' auch die Cytochrom-P450-Monooxygenase Systeme beherbergen, die für Clara-Zellen beschrieben wurden (Forbes, 2000). Auf eine Peroxisomen-Identität deutet die singuläre Membran und das von dieser umschlossene elektronendichte Lumen der beobachteten Vesikel hin.

Die sogenannten 'multi-lamellar-bodies' wurden vereinzelt auch für Clara-Zellen beschrieben (Masuda *et al.*, 1997; Gazdar *et al.*, 1990) und sind daher kein ausschließliches Merkmal von AT II-Zellen. Auch hier deutet sich an, daß Clara- und ATII-Zellen funktional und morphologisch nah miteinander verwandt sind und möglicherweise einen gemeinsamen Vorläufer-Zelltyp besitzen (Pankow *et al.*, 1989). Morphologische Untersuchungen können auf Grund der teilweise auch widersprüchlichen Aussagen in der Literatur lediglich Hinweise auf die Identität eines Zelltyps geben. Dennoch begründen die oben beschriebenen Befunde bereits die Annahme, daß es sich bei den isolierten Zellen um Zellen des Lungenepithels und dabei mit großer Wahrscheinlichkeit um AT II- oder Clara-Zellen handelt. In einzelnen Publikationen wird darüber hinaus die Vermutung geäußert, daß es sich bei den sogenannten Clara-Zellen um eine ganze Gruppe von Zellen handelt, die oft auch als „nicht-zilientragende, sekretorische Zellen des bronchiolaren Epithels“ bezeichnet werden (Pankow *et al.*, 1989; Widdicombe und Pack, 1982). Daher ist es notwendig, die morphologischen Befunde um Expressions-Analysen für zelluläre Marker auf RNA- und Protein-Ebene zu ergänzen.

Expressions-Analysen mittels RT-PCR ergaben, daß alle drei Zelllinien den wesentlichen Marker für Clara-Zellen, die mRNA für das sogenannte Clara Cell 10kd-Protein (CC10kd) exprimierten (Magdaleno *et al.*, 1998; Ray *et al.*, 1996 und 1993). Darüber hinaus konnte in frühen Passagen (erste und zweite) die mRNA der Surfactant Proteine-A und -B nachgewiesen werden. Dies bestätigte die Prognose, daß erfolgreich AT II- oder Clara-Zellen isoliert worden waren. Die Surfactant Proteine-A und -B wurden aber in höheren Passagen herunterreguliert, was auf Dedifferenzierung der Zellen in Kultur zurückgeführt werden kann. Mit Hilfe von Western Blots konnte die Expression von CC10kd und SP-B schließlich aber auf Proteinebene in den Zelllinien MBECL 5/A, 5/D und 7 nachgewiesen werden. Die mRNA des AT II-spezifischen Surfactant Protein-C konnte jedoch ebenso wie das Protein zu keiner Zeit nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse belegen, daß es sich bei den etablierten Zelllinien eher um Clara- als um AT II –Zellen handelt.

Darüber hinaus konnte auf mRNA-Ebene die Expression der Cytokeratine 8 und 19 durch RT-PCR gezeigt werden, die in der Literatur als Marker epithelialer Zellen beschrieben sind (Nakajima *et al.*, 1998; Kasper und Singh, 1995). Auf diese Weise war es möglich, den epithelialen Ursprung der Zelllinien zu belegen.

Außerdem bestätigten RT-PCR-Analysen für verschiedene Cytochrom-P450-Monooxygenasen, daß die Zellen noch einige dieser z.T. für Clara-Zellen spezifischen (z.B. Cyp 2F2) Enzymsysteme exprimierten (Magdaleno *et al.*, 1998; Fanucchi *et al.*, 1997; Baron und Voigt, 1990). Die Konservierung der Expression von Cytochrom-P450-Systemen ist von großer Bedeutung, da ihrem Anteil am Xenobiotika-Metabolismus der Lunge ein entscheidender Einfluß auf tumorogene Schädigungen des Lungenepithels zugeschrieben wird. Erst dadurch erhalten die Zelllinien ihren Wert als *in vitro*-Modelle für toxikologische Studien.

Zusammen mit den Ergebnissen der histochemischen Färbungen bestätigte das Gesamtbild aus molekularen, proteinchemischen und morphologischen Befunden den epithelialen Charakter der Zelllinien und deren Identität als Clara-Zellen. Darüber hinaus deuteten die Ergebnisse darauf hin, daß die Expression zellulärer Marker in den Zelllinien lediglich herunterreguliert ist und nicht komplett verloren gegangen ist. Die Charakterisierungs-Ergebnisse sind im Vergleich mit Literatur-Angaben zu Clara-Zellen in Tabelle 4.1 zusammengefaßt:

Eigenschaft	Diese Arbeit <i>in vitro</i>	Vorwiegend <i>in situ</i> -Untersuchungen	
<i>Microvilli</i>	Ja	Ja	Malkinson (murine Zelllinie), 1998; Masuda (human; <i>in vitro</i>) <i>et al.</i> , 1997; Gazdar <i>et al.</i> , 1990 (humane Zellen); Widdicombe/Pack 1982 (<i>in situ</i> und <i>in vitro</i>); Plopper <i>et al.</i> , 1980 (<i>in situ</i>)
<i>Rundliche, große Mitochondrien</i>	Ja	Ja	Walker <i>et al.</i> , 1989 (<i>in vitro</i>); Widdicombe/Pack 1982; Gazdar <i>et al.</i> , 1990; Plopper <i>et al.</i> , 1980 (div. Spez., u.a. Maus; <i>in situ</i>)
<i>Irregulärer Nucleus</i>	Ja	Ja	Widdicombe/Pack 1982 (<i>in situ</i> und <i>in vitro</i>)
<i>Elektrondendichte Vesikel</i>	Ja	Ja	Pankow <i>et al.</i> , 1989 (<i>in situ</i>); Walker <i>et al.</i> , 1989; Widdicombe/Pack 1982; Plopper <i>et al.</i> , 1980
<i>Viel ER</i>	Ja	Ja	Pankow 1989; Walker <i>et al.</i> , 1989; Plopper <i>et al.</i> , 1980; Cutz <i>et al.</i> , 1970 (human und Kaninchen, <i>in situ</i>)
<i>Lysosomen</i>	Ja	Ja	Smith <i>et al.</i> , 1974 (Ratte, <i>in situ</i>)
<i>Desmosomen/Tight junctions</i>	Ja	Ja	Gazdar <i>et al.</i> , 1990; Widdicombe/Pack 1982; Plopper <i>et al.</i> , 1980; Cutz <i>et al.</i> , 1970
<i>Lamellare Einschlüsse</i>	Ja	Ja	Masuda <i>et al.</i> , 1997; Smith <i>et al.</i> , 1974

Eigenschaft	Diese Arbeit <i>in vitro</i>	Vorwiegend <i>in situ</i> -Untersuchungen	
<i>Lipid-Granula</i>	Ja	Ja	Widdicombe/Pack 1982
<i>Cytopl. Glykogen</i>	Nein	Nein	Widdicombe/Pack 1982
<i>Cytokeratine 8,19</i>	Ja	Ja	Nakajima <i>et al.</i> , 1998; Kasper und Singh, 1995
<i>Cytochrom-P450-Monooxygenasen</i>	Ja	Ja	Magdaleno <i>et al.</i> , 1998; Pankow <i>et al.</i> , 1989
<i>CC10kd Expression</i>	Ja	Ja	Magdaleno <i>et al.</i> , 1998; Pankow <i>et al.</i> , 1989
<i>SP-B Expression</i>	Ja	Ja	Magdaleno <i>et al.</i> , 1998
<i>SP-C Expression</i>	Nein	Nein	Kasper und Singh, 1995

Tab. 4.1 – Charakteristika von Clara-Zellen *in situ* und daraus abgeleiteten Zelllinien: Befunde aus der Literatur, geben vor allem Daten aus *in situ*-Untersuchungen wieder. Die eigenen Befunde zeigen, daß die etablierten Zelllinien in vielen Punkten Eigenschaften von Clara-Zellen *in situ* aufweisen. Dies unterstreicht die Bedeutung der Zelllinien als *in vitro*-Modell.

Hieraus ergibt sich, daß es erstmalig gelungen ist murine Clara-Zelllinien zu etablieren, die einen hohen Differenzierungsgrad aufweisen und somit von großem Wert für Clara-Zell-spezifische toxikologische und tumorbiologische Studien sein werden.

Darüber hinaus wurden die Zellen wachstumsphysiologisch untersucht. Eine Karyotypen-Analyse ergab zuvor, daß die Zelllinien MBECL 5/A und 5/D einen triploiden Chromosomensatz aufweisen, wohingegen die Linie 7 einen normalen, diploiden Chromosomensatz besitzt. Aneuploidien sind für viele SV40 TAg-immortalisierte Zelllinien belegt (Masuda *et al.*, 1997). Die diploide Linie 7 erwies sich in den Wachstumsexperimenten als die am langsamsten wachsende der drei Zelllinien. MBECL 5/A wuchs am schnellsten und 5/D lediglich geringfügig langsamer als diese aber deutlich schneller als MBECL 7. Diese Ergebnisse und die Karyotypen-Analyse ließen vermuten, daß die Linie 7 durch die *in vitro*-Kultivierung möglicherweise die geringsten Veränderungen erfahren hatte. Diese Vermutung wurde durch die nachfolgenden Tumorigenitäts-Experimente gestützt, die zeigten, daß nur die Linie 5/A befähigt war, Tumoren in Nacktmäusen zu bilden.

Trotz der Veränderungen, die die Zelllinien durch die Transformation mittels SV40-TAg und die nachfolgende Kultivierung erfahren hatten, zeigte sich bei allen eine Sensitivität für die Peptide EGF und TGF beta. Während EGF i.d.R. Proliferations-

stimulierend wirkt, kann TGF beta die Formation von extrazellulärer Matrix induzieren, auf diese Weise inhibierend auf das Zellwachstum wirken und die Differenzierung der Zellen fördern, es kann aber ebenso gegenteilig wirken (Cross und Dexter, 1991).

Während TGF beta-Gabe bei allen drei Zelllinien zu einer konzentrationskorrelierenden Inhibition des Wachstums führte, stimulierte EGF erwartungsgemäß bei den Linien 5/D und 7 die Proliferation. Bei MBECL 5/A jedoch zeigte sich nach EGF-Zugabe überraschend eine deutliche Inhibition der Proliferationsrate.

Es ist bereits gezeigt worden, daß EGF ebenso wie TGF beta Zellzyklus-stimulierend wie auch –inhibierend wirken kann. So haben Cao *et al.* (2000) an der Karzinom-Zelllinie A431 epithelialen Ursprungs zeigen können, daß EGF bei diesen Zellen in Suspensions-Kultur Zellproliferation förderte, jedoch in Monolayer-Kulturen wachstumsinhibierend und Apoptose-stimulierend wirken konnte. Die Ursache dieses Effekts wurde von Cao *et al.* in der EGF induzierten Reduktion der zellulären Adhäsion und Zell-Zell-Interaktion gesehen. Tatsächlich zeigten jedoch eigene Experimente, daß alle drei Zelllinien auf Collagen I-Matrix ebenfalls langsamer proliferierten, verbesserte Zelladhäsion demnach keinen Proliferations-fördernden Effekt hatte. Die Befunde von Cao *et al.* und die eigenen Beobachtungen von EGF-induzierter Proliferations-Inhibition stützen jedoch die in Kapitel 4.1.1 postulierte Hypothese von einer Erhöhung der zellulären Wachstums-Autonomie (Invasivität) durch EGF-Expression *in vivo*.

Es konnte durch diese Experimente gezeigt werden, daß die kultivierten Zelllinien nicht nur epithelialen Ursprungs und mit Eigenschaften von Clara-Zellen ausgestattet, sondern auch in ihrer kulturbedingten Dedifferenzierung unterschiedlich weit fortgeschritten sind. Dabei unterscheiden sie sich vor allem in ihrem proliferativen und ihrem tumorigenen Potential. Diese Eigenschaften machen die drei Zelllinien zum idealen Modell für die Identifizierung potentiell an der tumorigenen Promotion von Clara-Zellen beteiligter Gene, da die drei Zelllinien verschiedene Stufen des Tumorigenese-Prozesses darstellen [immortalisiert (MBECL 7); stark proliferierend (MBECL 5/D); tumorigen (MBECL 5/A)]. Die transformierte aber langsam und als Monolayer wachsende, diploide MBECL 7 (Tumor-Initiation) wurde hierbei als Kontrolle für die beiden schnell wachsenden, triploiden und in unterschiedlichen Stadien der tumorigenen Entartung befindlichen Linien 5/A

(Progression) und 5/D (Promotion) eingesetzt. Außerdem wurde MBECL 5/A direkt mit 5/D verglichen, um Kandidaten-Gene für die Vermittlung der Tumorigenität von 5/A zu identifizieren.

4.2.2 Identifikation potentiell an der tumorigenen Promotion beteiligter Gene

Für die Identifikation möglicherweise an der Tumor-Initiation, -Promotion und Progression beteiligter Gene wurden mRNAs der drei Zelllinien MBECL 5/A, 5/D und 7 mit entsprechend konzipierten cDNA-Arrays auf Membran-Basis hybridisiert. Hierbei wurden ausschließlich bekannte Gene betrachtet und die Expressionsprofile der drei Zelllinien miteinander verglichen und auf differentielle Expressionen untersucht.

Die aus den Hybridisierungs-Experimenten resultierenden Expressionmuster ließen, nach Definition eines ‘Cut Offs’ zur Unterdrückung der experimentellen Streuung, mehrere differentiell exprimierte Gene erkennen. Darüber hinaus wurden Expressionsmuster von Genen bestimmter Gruppen (z.B. Apoptose-Gene) berücksichtigt, die Unterschiede in der Expression aufwiesen, welche über die einfache Standardabweichung hinausreichten, jedoch unterhalb des ‘Cut Offs’ verblieben. Teilweise ließen sich hieraus ‘Trends’ ableiten.

Diese Befunde sind in der Tabelle 4.2 noch einmal vergleichend zusammengefaßt:

In	DEREGULIERTE STRUKTURGENE
MBECL 5/A versus 7	p15, p16, p27, l-myc, n-myc, myb, HGF
MBECL 5/D versus 7	p15, p16, p27, l-myc, n-myc, e-cadherin, bcl-2
MBECL 5/A versus 5/D	HGF, TGF α , TGF β
Gen-Gruppen	TRENDS
Transkriptions Faktoren	A > D > 7
Wachstums Faktoren	A > 7 > D
Apoptose-Gene	D > A = 7
Suppressoren	A = D > 7

Tab. 4.2 – In der Tabelle sind die mittels cDNA-Array detektierten deregulierten Gene und Gen-Gruppen im Überblick dargestellt. A>D>7 = in A stärker als in D und dort wiederum stärker als in 7 exprimiert. Die Gene, die zwischen Zelllinie 5/A und 5/D differentiell exprimiert sind spielen möglicherweise eine Rolle bei der tumorigenen Transformation der Zellen.

Das erste transformierende Ereignis, welches zur Immortalisierung der betrachteten Zelllinien führte, war die transgene Expression des SV40 TAg. Diese führt i.d.R. zu nicht tumorigenen Zelllinien mit annähernd normaler Differenzierung, welche durch eine Co-Transfektion mit H-ras oder Ki-ras eine maligne Transformation erfahren können (Harris *et al.*, 1991). In den Expressionsprofilen der MBEC-Zelllinien müssen sich demnach neben den SV40 TAg induzierten Veränderungen noch weitere Deregulationen nachweisen lassen, die entweder kausal oder als Folgeerscheinung mit dem unterschiedlichen Wachstumsverhalten der Zelllinien korrelieren.

Es zeigt sich, daß in den beiden schnell wachsenden Linien (MBECL 5/A und 5/D) im Vergleich zu der Zelllinie 7 die Zellzyklus-Inhibitoren p15, p16 und p27 überexprimiert vorliegen, was als zelluläre Antwort auf eine anormale Stimulation der Proliferation gedeutet werden kann. p15 und p16 inhibieren die cdk4, welche wiederum im Komplex mit Cyclin D1 für die Phosphorylierung des Tumorsuppressors RB verantwortlich ist, in deren Folge u.a. der Transkriptionsfaktor Myb hochreguliert wird. Dieser sogenannte 'RB-Pathway' reguliert die Zellzyklus-Passage (Sharpless und DePinho, 1999). Diese Befunde korrelieren nicht mit den gefundenen Proliferationsraten der Zelllinien, daher ließe sich vermutet werden, daß die negative Regulation des Zellzyklus in den Zelllinien 5/A und 5/D zwar aktiviert wird, aus unbekanntem Gründen jedoch nicht wirksam ist. Die Ursachen hierfür konnten in dieser Arbeit nicht untersucht werden.

Gleichzeitig zeigen MBECL 5/A und 5/D beide eine Überexpression der Transkriptionsfaktoren n-Myc und l-Myc, nicht jedoch von c-Myc. Es ist gezeigt worden, daß Myc-Proteine zusammen mit dem H-ras-Onkogen in der Lage sind, primäre Ratten-Fibroblasten zu transformieren (Yancopoulos *et al.*, 1985; Land *et al.*, 1983). Myc-Proteine wirken in der G1-Phase des Zellzyklus Proliferationsstimulierend, können aber unter bestimmten Bedingungen auch Apoptose induzieren (Bouchard *et al.*, 1998). Dieser Befund korreliert mit dem Wachstumsverhalten der Zelllinien. Die drei Mitglieder der myc-Genfamilie sind in vielen Tumoren durch chromosomale Translokation oder Gen-Amplifikation aktiviert. In der Lunge gilt dies vor allem für Small Cell Lung Carcinomas (SCLC), bei denen eine Überexpression oder Amplifikation von c-myc, n-myc und l-myc nachgewiesen werden konnte (Prins *et al.*, 1993). Bei NSCLC und daraus hervorgegangenen Zelllinien ist eine myc-Überexpression gewöhnlich nicht (Wiethage *et al.*, 1994; vergl. auch Tab. 4.3) oder nur sehr selten zu beobachten (Salgia und Skarin, 1998).

Die tumorigene Zelllinie 5/A unterscheidet sich darüber hinaus von der ihr im Proliferations-Verhalten ähnlichen MBECL 5/D dadurch, daß sie den Hepatocyte Growth Factor (HGF) überexprimiert. HGF wirkt auf epitheliale Zellen, indem es Proliferation, Zell-Wachstum und Zell-Migration stimuliert und Angiogenese fördert (Zarnegar *et al.*, 1993). Dieses multifunktionale Zytokin spielt offenbar eine signifikante Rolle in Wachstum und Differenzierung humaner Adenokarzinom-Zellen. In Zellen transfiziert, ist es in der Lage, Zell-Wachstum in Weichagar und subkutane Tumorbildung in der Nacktmaus zu induzieren (Yi und Tsao, 2000) und spielt offenbar eine Rolle in der mesenchymalen Konversion ursprünglich epithelialer Zellen, wodurch die Invasivität und Metastasierung gefördert wird (Noe *et al.*, 1999; Birchmeier *et al.*, 1996). Während HGF die Metastasierung fördert, bewirkt e-cadherin das Gegenteil (Birchmeier *et al.*, 1997). E-cadherin spielt im Komplex mit beta-catenin eine essentielle Rolle in der epithelialen Zell-Zell Adhäsion, ist an der Organisation epithelialer Strukturen beteiligt und beeinflusst die Invasivität von Tumoren negativ (Beavon, 2000; Wijnhoven *et al.*, 2000; Takeichi *et al.*, 1994). E-cadherin wird von MBECL 5/D im Vergleich zu MBECL 7 überexprimiert, im Vergleich zur tumorigenen MBECL 5/A ergibt sich jedoch kein Expressions-Unterschied. In der Zelllinie 7 die Werte für beta-catenin und Connexin 43 im Vergleich zu MBECL 5/A und 5/D erhöht. Dies deutet darauf hin, daß die Zell-Zell-Adhäsion und – Kommunikation in MBECL 7 noch intakt ist. Die Überexpression von e-cadherin stellt demnach möglicherweise wie die Expression der Zellzyklus-Inhibitoren einen kompensatorischen Effekt dar. Die Befunde deuten auf einen schrittweisen Verlust der Zell-Zell-Adhäsion und – Kommunikation von MBECL 7 über 5/D zu 5/A hin und lassen vermuten, daß die Zelllinie 5/A möglicherweise tumorigen wächst. Ein Befund, der durch die *in vivo*-Befunde schließlich bestätigt wurde.

Zugleich zeigt MBECL 5/D eine Überexpression des anti-apoptotischen Faktors Bcl-2. Bcl-2 wird als Mediator eines anti-apoptotischen Signals (Smit *et al.*, 1996) und direkter Modulator der Telomerase-Aktivität in NSCLC beschrieben (Ohmura *et al.*, 2000). Ohmura *et al.* beobachten eine inverse Korrelation zwischen Bcl-2-Expression und der Telomerase-Aktivität, wobei sie aggressiven Tumoren hohe Telomerase-Aktivitäten assoziieren. Zugleich wird Bcl-2 ein negativer Einfluß auf die Neovaskularisation zugeschrieben (Boldrivil *et al.*, 2000). Eine hohe Bcl-2 Expression (MBECL 5/D) kann somit als Zeichen anti-tumorigener Aktivität der Zellen gewertet werden.

Gleichzeitig exprimiert die Zelllinie 5/D im Vergleich zu 5/A und 7 weniger TGF alpha und beta. Obwohl einige klinische Befunde auf eine Korrelation von hoher bcl-2 und TGF beta-Expression mit einer guten Überlebens-Prognose von Tumorpatienten hindeuten (Boldrivil, 2000), gibt es auch Untersuchungen, die TGF beta als Mediator von TGF alpha und EGF-Wirkung beschreiben und einen starken positiven synergistischen Effekt von TGF alpha und TGF beta auf die Proliferation von murinen Zellen in Weich-Agar konstatieren (Anzano *et al.*, 1982). Andere Untersuchungen haben gezeigt, daß TGF beta entgegen ersten Erwartungen auf mRNA und Protein-Ebene in humanen Tumoren häufig hochreguliert ist und Angiogenese-stimulierende Wirkung hat. Dort korreliert TGF beta-Expression häufig mit Malignität und verkürzter Lebenserwartung (Gold, 1999).

Das in MBECL 5/A und 5/D überexprimierte p27 ist ein Mediator des Wachstums-inhibitorischen Effekts von TGF beta (Gold, 1999). Bei p27 handelt es sich um einen Zellzyklus-Inhibitor, der in der G1-Phase des Zellzyklus mit dem Cyclin E / cdk2 – Komplex interagiert (Bouchard *et al.*, 1998); seine Überexpression konnte in humanen Karzinomen gezeigt werden (Weinstein, 2000). TGF alpha hingegen kompetitiert mit EGF um den EGF-Rezeptor, hat eine Proliferations-stimulierende Wirkung und schützt myc-überexprimierende Zellen vor Apoptose (Amundadottir *et al.*, 1996).

Faßt man diese Beobachtungen mit den 'Trend'-Beobachtungen (Tab. 4.2) zusammen, so zeigt sich, daß die rasch proliferierenden Zelllinien auf die anormale Proliferation mit einer möglichen 'Schutzreaktion', der Expression von Zellzyklus-Inhibitoren der G1-Phase (p15, p16, p27), antworten. Erwartungsgemäß exprimiert 5/A Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktoren am stärksten. Darüber hinaus könnte die Überexpression von HGF in MBECL 5/A und der gleichzeitig bei Zelllinie 5/D gegenüber der Zelllinie 7 aber auch gegenüber der Zelllinie 5/A erhöhten Expression von Apoptose-Faktoren mit der Tumorigenität der Zelllinie 5/A zusammenhängen. Die Linie 5/A hat demnach möglicherweise neben der Fähigkeit zur erfolgreichen Selbstkontrolle des Zellzyklus auch ihre Fähigkeit zur Apoptose verloren. Gleichzeitig scheint sie eine autokrine Stimulation der Proliferation und einen Verlust der Zell-Zell-Interaktion durch HGF-Überexpression akquiriert zu haben. Für eine starke mesenchymale Konversion der Zellen spricht auch das histologische Erscheinungsbild des aus injizierten MBECL 5/A-Zellen hervorgegangenen Nacktmaustumors (s. Abb. 3.27).

Die Zelllinie MBECL 5/D wiederum, die sich durch fehlende Tumorigenität von 5/A unterscheidet, zeigt dahingegen mit der Überexpression von e-cadherin und Bcl-2 scheinbar Bestrebungen, tumorigenes Wachstum zu supprimieren (erhöhte Zell-Zell-Adhäsion, Apoptose), was ihr offensichtlich auch gelingt.

Aus den Ergebnissen der cDNA-Arrays kann demnach eine Prognose über proliferative Eigenschaften der Zelllinien abgeleitet werden, die durch die Proliferations- und Tumorigenese-Studien bestätigt worden ist. Damit konnte der etablierte cDNA-Array als zuverlässiges Werkzeug für die rasche Charakterisierung neuer Zelllinien und für die Identifikation potentiell deregulierter Gen-Expressionen validiert werden.

In Tabelle 4.3 sind exemplarisch einige Literaturangaben zusammengestellt, die die Deregulation der humanen Homologe, der durch die cDNA-Arrays in den Clara-Zelllinien identifizierten deregulierten murinen Gene, in Adenokarzinomen belegen.

<i>Gen</i>	<i>Literatur</i>	<i>Genet. Alteration</i>	<i>Tumortyp</i>
Myc-Familie	Wiethage et al., 1994	Überexpression	SCLC
Bcl-2	Wiethage et al., 1994	Überexpression	NSCLC
Myb	Wiethage et al., 1994	Überexpression	SCLC / NSCLC
TGF beta	Gold, 1999	Überexpression	Lungen-Tumore
HGF	Yi und Tsao, 2000	Überexpression	NSCLC
p16	Belinsky et al. 1997	Überexpression	NSCLC
p27	Weinstein, 2000	Überexpression	Humane Tumore

Tab. 4.3 – Genetische Alterationen in humanen Tumoren, die auch in den Zelllinien MBECL 5/A, 5/D und 7 nachgewiesen werden konnten. NSCLC = Non Small Cell Lung Carcinoma; SCLC = Small Cell Lung Carcinoma

Hieraus ergibt sich, daß die für diese Arbeit etablierten murinen Clara-Zelllinien ein geeignetes Modell für das Studium der humanen Adenokarzinogenese sind.

4.3 Ausblick

Die grundlegenden Untersuchungen zum Einfluß synergistischer Effekte mehrerer Onkogene und des Tumorsuppressors p53 auf die Entwicklung von Adenokarzinomen der Lunge haben die Schwierigkeiten tierexperimenteller Ansätze im Transgen-Bereich noch einmal verdeutlicht. Ein hoher zeitlicher und materieller

Aufwand resultierte letztlich in interessanten Befunden (verkürzte Lebenserwartung der Ug-c-myc/p53 +/-; Ug-Cyclin D1/EGF und Ug-c-myc/EGF), die jeweils durch höhere Tierzahlen und durchgehende histopathologische Analysen (im besten Falle des ganzen Tieres) validiert werden müssen. Diese Untersuchungen sollten durch die Erstellung von Tumor-Expressionsprofilen mittels cDNA-Array-Analysen ergänzt werden.

Zugleich bieten die für diese Arbeit etablierten und charakterisierten Clara-Zelllinien ein gut geeignetes Modell, um die *in vivo*-Befunde durch *in vitro*-Untersuchungen zu bestätigen. Dies könnte z.B. durch die Transfektion der im Maus-Modell verwendeten Onkogene in die Zelllinie MBECL 7 geschehen. Zugleich wäre es aber auch denkbar, die Befunde aus den cDNA-Array-Analysen zu nutzen, z.B. die Zelllinie 5/D zusätzlich mit HGF zu transfizieren und diese erneut Tumorigenitäts-Analysen mit Nacktmäusen zu unterziehen, um den Anteil von HGF an der Tumorigenität der Zelllinie 5/A zu verifizieren. Diese Studien sollten durch möglichst breit angelegte Expressionsprofile mittels cDNA-Chip Technologie begleitet und durch Proteom-Analysen (2D-Gelelektrophorese) ergänzt werden, um ein Gesamtbild der physiologischen Deregulation im Verlauf der Karzinogenese zu erhalten. Denkbar sind darüber hinaus auch weitergehende molekularbiologische und histochemische Studien an den entstehenden Nacktmaus-Tumoren.

Schließlich wäre es wünschenswert, die Differenzierung der etablierten Zelllinien zu optimieren. Dies könnte durch Wachstumsexperimente auf verschiedenen Matrix-Proteinen oder 'feeder-layers' geschehen und würde zugleich weitere Fragen über den Einfluß der zellularen Matrix auf das tumorigene Wachstum epithelialer Zellen der Lunge beantworten. Im Anschluß könnten bereits durch HPLC-Analysen des Mediums vor und nach Substrat-Gabe der Metabolismus der Zelllinien aufgeklärt und so ihren speziellen Wert für *in vitro*-toxikologische Studien belegt werden.

5. Literaturverzeichnis

- Aida S., Takahashi Y., Suzuki E., Kimura Y., Ito Y., Miura T. (1992): Electron-microscopic evidence for cytochrome P450 in Clara cells and Type I pneumocytes of the rat lung. *Respiration*, **59**, 201-210
- Ballard, P.L., Ertsey R., Gonzales L.W. und Gonzales J. (1996): Transcriptional Regulation of human pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C by Glucocorticoids. *Am- J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **14**, 599-607
- Balmain A., Nagase H. (1998): Cancer resistance genes in mice: models for the study of tumour modifiers. *TIG*, **14 (4)**, 139-144
- Baron J. und Voigt J.M. (1990): Localization, distribution and induction of xenobiotic-metabolizing enzymes and aryl hydrocarbon hydroxylase activity within lung. *Pharmac. Ther.*, **47**, 419-445
- Beavon I.R. (2000): The e-cadherin-catenin complex in tumor metastasis. Structure, function and regulation. *Eur. J. Cancer*, **36(13)**, 1607-1620
- Belinsky S.A., Swafford D.S., Middleton S.K., Kennedy A.H. und Tesfaigzi J. (1997): Deletion and differential expression of p16^{INK4a} in mouse lung tumors. *Carcinogenesis*, **18 (1)**, 115-120
- Birchmeier C., Birchmeier W., Brand-Saberi B. (1996): Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Acta Anat.*, **156(3)**, 217-226
- Birchmeier W., Brinkmann V., Niemann C., Meiners S., Dicesare S., Naundorf H., Sachs M. (1997): Role of HGF/SF and c-met in morphogenesis and metastasis of epithelial cells. *Ciba Found. Symp.*, **212**, 230-240
- Bishop J.M. (1987): The molecular genetics of cancer, *Science*, **235**, 305-311
- Bittner M., Meltzer P., Hayward N. und Trent J. (2000): Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*, **406**, 536-540
- Boldrini L., Calcinai A., Samaritani E., Pistolesi F., Mussi A., Lucchi M., Angeletti C.A., Basolo F., Fontanini G. (2000): TNFalpha and TGF beta are significantly associated with better prognosis in small-cell lung carcinoma: putative relation with Bcl-2-mediated neovascularization. *Br. J. Cancer*, **83(4)**, 480-486
- Bouchard C., Staller P. und Eilers Martin (1998): Control of cell proliferation by c-Myc. *Trends in Cell Biology*, **8**, 202-206
- Boyd M.R., Reznik-Schüller H.M. (1984): Metabolic basis for the pulmonary Clara cell as a target for pulmonary carcinogenesis. *Toxicologic Pathology*, **12 (1)**, 56-61

- Buckpitt A., Chang A.M., Weir A., Van Winkle L., Duan X., Philpot R., Plopper C. (1995): Relationship of cytochrome P450 activity to Clara cell cytotoxicity. Metabolism of naphthalene and naphthalene oxide in microdissected airways from mice, rats and hamsters. *Mol. Pharmacol.*, **47** (1), 74-81
- Cao L., Yao Y., Lee V., Kiani C., Spaner D., Lin Z., Zhang Y., Adams M.E., Yang B.B. (2000): Epidermal growth factor induces cell cycle arrest and apoptosis of squamous carcinoma cells through reduction of cell adhesion. *J. Cell. Biochem.*, **77** (4), 569-83
- Cariou S., Catzavelos C., Slingerland J.M. (1998): Prognostic factors of expression of the cell cycle inhibitor protein p27kip1. *Breast Cancer Res. Treat.*, **52**(1-3), 29-41
- Clara M. (1937): Zur Histologie des Bronchialepithels. *Z. Mikr. Anat. Forsch.*, **41**, 321 - 330.
- Clark E.A., Golub T.R., Lander E.S. und Hynes R.O. (2000): Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature*, **406**, 532-535
- Clark J.C., Wert S.E., Bachurski C.J., Stahlman M.T., Stripp B.R., Weaver T.E. und Whitsett J.A. (1995): Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7794-7798
- Cohen B. (1999): Modelling cancer in the mouse. *Nature Genetics*, **21**, 249-251
- Cornelisse C.J., Devilee P. (1997): Facts in cancer genetics. *Patient Education and Counseling*, **32**, 9-17
- Corti M., Brody A.R., Harrison J.H. (1996): Isolation and primary culture of murine alveolar type II cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **14**, 309-315
- Cross M. und Dexter M. (1991): Growth Factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell*, **64**, 271-280
- Crouch E., Parghi D., Kuan S.F., Persson A. (1992): Surfactant protein D: subcellular localization in nonciliated bronchiolar epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, **263**(1Pt1), 60-66
- Cutz E. und Conen P.E. (1971): Ultrastructure and cytochemistry of Clara cells. *Am. J. Pathol.*, **62** (1), 127-148
- D'Amore-Bruno M.A., Wikenheiser K.A., Carter J.E., Clark J.C., Whitsett J.A. (1992): Sequence, ontogeny and cellular localization of murine surfactant protein B mRNA. *Am. J. Physiol.*, **262** (1Pt1), 40-47
- Dean M. (1998): Cancer as a complex developmental disorder. *Cancer Research*, **58**, 5633-5636
- Devereux T.R. (1984): Alveolar Type II and Clara Cells: Isolation and xenobiotic metabolism. *Environmental Health Perspectives*, **56**, 95-101

- Dey A., Jones J.E., Nebert D.W. (1999): Tissue and cell type-specific expression of cytochrome P450 1A1 and cytochrome P450 1A2 mRNA in the mouse localized by *in situ* hybridization. *Biochem. Pharmacol.* **58** (3), 525-537
- Donehower L.A., Harvey M., Slagle B.L., McArthur M.J., Montgomery C.A., Butel J.S. und Bradley A. (1992): Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Natur*, **356**, 215-221
- Dong Q. und Wright J.R. (1998): Degradation of surfactant protein D by alveolar macrophages. *AJP – Lung Cellular and Molecular Physiology* **274** (1), 97-105
- Driscoll K.E., Carter J.M., Iype P.T., Kumar H.L., Crosby L.L., Aardema M.J., Isfort R.J., Cody D., Chestnut M.H., Burns J.L. and LeBouef R.A. (1995): Establishment of immortalized Alveolar Type II epithelial cell lines from adult rats. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, **31**, 516-527
- Ehrhardt A. (1998): Etablierung transgener Mausmodelle für humane Lungenkarzinome. *Dissertationsschrift*, Hannover
- Fannon M.R. (1996): Gene expression in normal and disease states – identification of therapeutic targets. *Tibtech*, **14**, 294-298
- Facchini L.M. und Penn L.Z. (1998): The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J.*, **12**, 633-651
- Fanucchi M.V., Murphy M.E., Buckpitt A.R., Philpot R.M. und Plopper C.G. (1997): Pulmonary Cytochrome P450 Monooxygenase and Clara Cell Differentiation in Mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **17**, 302-314
- Finlay C.A. (1992): p53 Loss of function: Implications for the processes of immortalization and tumorigenesis. *BioEssays*, **Vol. 14** (8), 557-560
- Forbes B. (2000): Human airway epithelial cell lines for *in vivo* drug transport and metabolism studies. *PSTT*, **3** (1), 18-27
- Frisch S. (1997): The epithelial cell default-phenotype hypothesis and its implications for cancer. *BioEssays*, **19** (8), 705-709
- Furth P.A. (1998): SV40 rodent tumour models as paradigms of human disease: transgenic mouse models. *Brown F., Lewis A.M. (eds.), Simian Virus 40 (SV40): A possible human polyomavirus. Dev. Biol. Stand. Basel, Karger*, **Vol. 94**, 281-287
- Gazdar A.F., Linnoila R.I., Kurita Y., Oie H.K., Mulshine J.L., Clark J.C. und Whitsett J.A. (1990): Peripheral airway cell differentiation in human lung cancer cell lines. *Cancer Research*, **50**, 5481-5487
- Gazzeri S., Brambilla E., Caron de Fromental C., Gouyer V., Moro D., Perron P., Berger F. and Brambilla C. (1994): p53 genetic abnormalities and myc activation in human lung carcinoma. *Int. J. Cancer*, **58**, 24-32

- Geick A. (1998): Transgene Mausmodelle zur Analyse der Aktivität des Uteroglobulin-Promotors und der Entstehung von Clara-Zell-Karzinomen, renalen Tumoren und lymphoblastischen Lymphomen, *Dissertationsschrift*, Hannover
- Giaccia A.J. und Kastan M.B. (1998): The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes and Development*, **12**, 2973-2983
- Gold L.I. (1999): The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit. Rev. Oncog.*, **10(4)**, 303-360
- Goldenberg H., Hüttinger M., Kollner U., Kramar R., Pavelka M. (1978): Catalase positive particles from pig lung. *Histochemistry*, **56**, 253-264
- Gunning W.T., Goldblatt P.J., Stoner G.D. (1992): Keratin expression in chemically induced mouse lung adenomas. *Am. J. Pathol.*, **140 (1)**, 109-118
- Hackett B.P., Gitlin J.D. (1992): Cell-specific expression of a Clara cell secretory protein – human growth hormone gene in the bronchiolar epithelium of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89 (19)**, 9079-9083
- Haller T., Ortmayer J., Friedrich F., Völkl H. und Dietl P. (1998): *PNAS*, **95 (4)**, 1579-1584
- Hartwell L.H. und Kastan M.B. (1994). Cell cycle control and cancer. *Science*, **266**, 1821-1827
- Harris C.C., Reddel R., Pfeifer A., Iman D., Mcmenamin M., Trump B.F., Weston A. (1991): Role of oncogenes and tumor suppressor genes in human lung carcinogenesis. *IARC Sci. Publ.*, **105**, 294-304
- Hashimoto S., Nakagawa K., Sueishi K. (1996): Monkey Clara cell 10kDa protein (cc10): a characterization of the amino acid sequence with an evolutionary comparison with humans, rabbits, rats and mice. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **15 (3)**, 361-366
- Helling R.B., Goodman H.M., Boyer H.W. (1974): Analysis of R*Eco RI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J. Virol.*, **14**, 1235-1244
- Hibi K., Qing L., Beaudry G.A., Madden S.L., Westra W.H., Wehage S.L., Yang S.C., Heitmiller R.F., Bertelsen A.H., Sidransky D., Jen J. (1998): Serial analysis of gene expression in non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, **58**, 5690-5694
- Hoffmann B., Piasecki A. und Paul D. (1989): Proliferation of fetal rat hepatocytes in response to growth factors and hormones in primary culture. *J. Cell. Physiol.*, **139 (3)**, 654-662
- Hopfer U., Jacobberger J.W., Gruenert D., Eckert R.L., Parmjit S. Jat und Whitsett J.A. (1996): Immortalization of epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, **270**, C1-11
- Hukkanen J., Lassila A., Paivarinta K., Valanne S., Sarpo S., Hakkola J., Pelkonen O., Raunio H. (2000): Induction and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in the human A549 lung adenocarcinoma cell line. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **22 (3)**, 360-366

- Hunter T. (1997): Oncoprotein networks. *Cell*, **88**, 333-346
- Jetten A.M., Vollber T.M., Nervi C. und George M.D. (1990): Positive and negative regulation of proliferation and differentiation in tracheobronchial epithelial cells. *American Review of Respirational Diseases*, **142**, 36-39
- Jeffrey P.K. (1983): Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **128**, 14-20
- Ji C.M., Plopper C.G., Pinkerton K.E. (1995): Clara cell heterogeneity in differentiation: Correlation with proliferation, ultrastructural composition and cell position in the rat bronchiole. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **13**, 144-151
- Jones P.L., Schmidhauser C. und Bissell M. (1993): Regulation of gene expression and cell function by extracellular matrix. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, **3(2)**, 137-154
- Karrer H.E. (1956): Electron microscopic study of bronchiolar epithelium of normal mouse lung. *Experimental Cell Research.*, **10**, 237
- Kasper M. und Singh G. (1995): Epithelial lung cell marker: current tool for cell typing. *Histol. Histopathol.*, **10 (1)**, 155-169
- Kawada H, Horiuchi T., Shannon J.M., Kuroki Y., Voelker D., Mason R.J. (1989): Alveolar type II cells, surfactant protein A (SP-A), and the phospholipid components of surfactant in acute silicosis in the rat. *Am Rev Respir Dis.*, **140(2)**, 460-470
- Kelly D.L. und Rizzino A. (2000): DNA microarray analyses of genes regulated during the differentiation of embryonic stem cells. *Mol. Reprod. Dev.*, **56**, 113-123
- Korfhagen T.R., Sheftelyevich V., Burhans MS., Bruno M.D., Ross G.F., Wert S.E., Stahlman M.T., Jobe A.H., Ikegami M., Whitsett J.A. und Fisher J.H. (1998): Surfactant Protein-D regulates surfactant phospholipid homeostasis in vivo. *J. Biol. Chem.*, **273 (43)**, 28438-28443
- Kuroki Y., Takahashi H., Chiba H., Akino T. (1998): Surfactant proteins A and D: disease markers. *Biochim Biophys Acta.*, **1408(2-3)**, 334-345
- Kuroki Y., Mason R.J., Voelker D.R. (1988): Pulmonary surfactant apoprotein A structure and modulation of surfactant secretion by rat alveolar type II cells. *J. Cell. Chem.*, **263**, 3388-3394
- Lane D.P. und Benchimol S. (1990): p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes & Development*, **4**, 1-8
- Lebel M., Webster M., Muller W.J., Royal A., Gauthier J., Mes-Masson A.M. (1995): Transgenic mice bearing the polyomavirus large T antigen directed by 2.1 kb of the keratin 19 promotor develop bronchiolar papillary tumors with the progression to lung adenocarcinomas. *Cell Growth Differ.*, **6 (12)**, 1591-1600

- Lee M.J., Dinsdale D. (1995): The subcellular distribution of NADPH-cytochrome P450 reductase and isoenzymes of cytochrome P450 in the lung of rats and mice. *Biochem Pharmacol*, **49** (10), 1387-1394
- Lengauer C., Kinzler K.W. und Vogelstein B. (1998): Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, **396**, 643-649
- Lesur O., Arsalane K. und Lane D. (1996): Lung alveolar epithelial cell migration in vitro: modulators and regulation processes. *American Journal of Physiology*, **270**, 311-319
- Lorenz J., Friedberg T., Paulus R., Oesch F., Ferlinz R. (1994): Oncogene overexpression in non-small-cell-lung cancer tissue: prevalence and clinicopathological significance. *Clinical Investigations*, **72**(2), 156-163
- Magdaleno S.M., Barrish J., Finegold M.J., DeMayo F.J. (1998): Investigating stem cells in the lung. *Advances in Pediatrics*, **45** (14), 363-397
- Malkinson A.M. (1991): Genetic studies on lung tumor susceptibility and histogenesis in mice. *Environmental Health Perspectives*, **93**, 149-159
- Malkinson A.M. (1998): Molecular comparison of human and mouse pulmonary adenocarcinomas. *Experimental Lung Research*, **24**, 541-555
- Mango G.W., Johnston C.J., Reynolds S.D., Finkelstein J.N., Plopper C.G. und Stripp B.R. (1998): Clara cell secretory protein deficiency increases oxidant stress response in conducting airways. *AJP – Lung Cell. and Mol. Physiol.*, **275** (2), 348-356
- Margraf L.R., Finegold M.J., Stanley L.A., Major A., Hawkins H.K., DeMayo F.J. (1993): Cloning and tissue-specific expression of the cDNA for the mouse Clara cell 10 kD protein: comparison of endogenous expression of rabbit uteroglobin promoter-driven transgene expression. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **9** (3), 231-238
- Massey T.E., Geddes B.A., Forkert P.G. (1987): Isolation of nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cells and alveolar type II cells from mouse lungs. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **65**, 2368-2372
- Masuda A., Kondo M., Saito T., Yatabe Y., Kobayashi T., Okamoto M., Suyama M., Takahashi T., Takahashi T. (1997): Establishment of human peripheral lung epithelial cell lines (HPL1) retaining differentiated characteristics and responsiveness to epidermal growth factor, Hepatocyte Growth Factor and Transforming Growth Factor β 1. *Cancer Research*, **57**, 4898-4904
- McKinnon R.A., McManus M.E. (1996): Localization of cytochromes P450 in human tissues: implications for chemical toxicity. *Pathology*, **28**, 148-155
- McLaughlin R.F., Tyler W.S., Canada R.O. (1961): A study of the subgross pulmonary anatomy in various mammals. *Am. J. Anat.*, **108**, 149-165
- Miller C.W., Simon K., Aslo A., Kok K., Yokota J., Buys C.H., Terada M., Koeffler H.P. (1992): p53 mutations in human lung tumors. *Cancer Res*, **52**(7), 1695-1698.

- Motwani M., White R.A., Guo N., Dowler L.L., Taubner A.I., Sastry K.N. (1995): Mouse surfactant protein-D. cDNA cloning, characterisation and gene localisation to chromosome 14. *J. Immunol.*, **155**, 5671-5677
- Nakajima M., Kawanami O., Jin E., Ghazizadeh M., Hond M., Asano G., Horiba K., Ferrans V.J. (1998): Immunohistochemical and ultrastructural studies of basal cells, Clara cells and bronchiolar cuboidal cells in normal human airways. *Pathol. Int.*, **48** (12), 944-953
- Noe V., Chastre E., Bruyneel E., Gespach C., Mareel M. (1999): Extracellular regulation of cancer invasion: the e-cadherin-catenin and other pathways. *Biochem. Soc. Symp.*, **65**, 43-62
- Obinata M. (1997): Conditionally immortalized cell lines with differentiated functions established from temperature-sensitive T-Antigen transgenic mice. *Genes to Cells*, **2**, 235-244
- Ohmura Y., Aoe M., Andou A., Shimizu N. (2000): Telomerase activity and bcl-2 expression in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, **6**(8), 2980-2987
- Paine R., Ben-Zeév A., Farmer S.R., Brody J.S. (1988): The pattern of cytokeratin synthesis is a marker of type 2 cell differentiation in adult and maturing fetal lung alveolar cells. *Dev. Biol.*, **129** (2), 505-515
- Palmer K.C. (1985): Clara cell adenomas of the mouse lung. Interaction with alveolar type 2 cells. *Am. J. Pathol.*, **120** (3), 455-463
- Patton S.E., Gilmore L.B., Jetten A.M., Nettesheim P., Hook G.E.R. (1986): Biosynthesis and release of proteins by isolated pulmonary Clara cells. *Experimental Lung Research*, **11**, 277-294
- Pankow W., Bittinger A., Wichert P. v. (1989): Die Clara-Zelle. *Pneumologie*, **43**, 277-283
- Paul D. (1985): Growth Factors, Oncogenes and Transformation. *Drug Res.*, **35** (1), #4, 772-779
- Paul D. (1985): Growth Factors, Oncogenes and Transformation. *Drug Res.*, **35** (1), #5, 890-897
- Perry JE, Grossmann ME, Tindall DJ (1998): Epidermal growth factor induces cyclin D1 in a human prostate cancer cell line. *Prostate*, **35**(2), 117-24
- Pfeifer M.A., Jones R.T., Bowden P.E., Mann D., Spillare E., Klein-Szanto A.J.P., Trump F., Harris C.C. (1991): Human bronchial epithelial cells transformed by the c-raf-1 and c-myc protooncogenes induce multidifferentiated carcinomas in nude mice: a model for lung carcinogenesis. *Cancer Research*, **51**, 3793-3801
- Plopper C.G., Mariassy A.T. und Hill L.H. (1980): Ultrastructure of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell of mammalian Lung: 1. A comparison of rabbit, guinea pig, rat, hamster and mouse. *Experimental Lung Research*, **1**, 139-154
- Plopper C.G. (1983): Comparative morphologic features of bronchiolar epithelial cells. The Clara cell. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **128**, 37-41

- Porter A.C. und Vaillancourt R.R. (1998): Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene*, **16**, 1343-1352
- Raunio H., Hakkola J., Hukkanen J., Pelkonen O., Edwards R., Boobis A., Anttila S. (1998): Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in human pulmonary tissues. *Arch. Toxicol. Suppl.*, **20**, 465-469
- Ray M.K., Magdaleno S., O'Malley B.W., DeMayo F.J. (1993): Cloning and characterization of the mouse Clara cell specific 10kDa protein gene: comparison of the 5'-flanking region with the human rat and rabbit gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197** (1), 163-171
- Ray M.K., Wang G., Barrish J., Finegold M.J., DeMayo F.J. (1996): Immunohistochemical localization of mouse Clara cell 10-kd protein using antibodies raised against the recombinant protein. *J. Histochem. Cytochem.*, **44** (8), 919-927
- Reynolds S.D., Giangreco A., Power J.H., Stripp B.R. (2000): Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *Am. J. Pathol.*, **156** (1), 269-278
- Ridley A. (2000): Molecular switches in metastasis. *Nature*, **406**, 466-467
- Ruch R.J., Cesen-Cummings K., Malkinson A.M. (1998): Role of gap junctions in lung neoplasia. *Exp. Lung Research*, **24** (4), 523-39
- Salgia R. and Skarin A.T. (1998): Molecular abnormalities in lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **16** (3), 1207-1217
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989): Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory press
- Sandmöller A., Halter R., Gomez-La-Hoz E., Gröne H.-J., Suske G., Paul D. & Beato M. (1994): The uteroglobin promoter targets expression of the SV40 T antigen to a variety of secretory epithelial cells in transgenic mice. *Oncogene*, **9**, 2805-2815
- Sandmöller A., Halter R., Suske G., Paul D. & Beato M. (1995): A transgenic mouse model for lung adenocarcinomas. *Cell Growth & Diff.*, **6**, 97 - 103
- Sawaya P.L., Stripp B.R., Whitsett J.A. und Luse D.S. (1993): The lung-specific CC10 Gene is regulated by transcription factors from the AP-1, Octamer and Hepatocyte Nuclear Factor 3 families. *Molecular and Cellular Biology*, **13** (7), 3860-3871
- Scagliotti G.V., Masiero P., Pozzi E. (1995): Biological prognostic factors in non-small cell lung cancer. *Lung cancer*, **12** (1), 13-25
- Schägger H. und Jagow G. von (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kD. *Anal. Biochem.*, **166**, 368-379
- Schlage W.K., Bulles H., Friedrichs D., Kuhn M., Teredesai A. (1998): Cytokeratin expression patterns in the rat respiratory tract as markers of epithelial differentiation in

- inhalation toxicology. I. Determination of normal cytokeratin expression patterns in nose, larynx, trachea and lung. *Toxicol. Pathol.*, **26** (3), 324-344
- Schlage W.K., Bulles H., Friedrichs D., Kuhn M., Teredesai A., Terpstra P.M. (1998): Cytokeratin expression patterns in the rat respiratory tract as markers of epithelial differentiation in inhalation toxicology. II. Changes in cytokeratin expression patterns following 8-day exposure to room-aged cigarette sidestream smoke. *Toxicol. Pathol.*, **26** (3), 344-360
- Sclafani R.A., Schauer I.E. (1996): Cell cycle control and cancer: lessons from lung cancer. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **1**(2), 123-127
- Sharpless N.E. und DePinho R.A. (1999): The Ink4a/ARF locus and its two gene products. *Current Opinion in Genetics and Development*, **9**, 22-30
- Sherr C.J. (1996): Cancer cell cycles. *Science*, **274**, 1672-1677
- Serabjit-Singh C.J., Wolfe C.R., Philpot R.M. (1980): Cytochrome P-450: Localization in rabbit lung. *Science*, **207**, 1469-1470
- Singh G., Katyal S.L., Brown W.E. und Kennedy A.L. (1993): Mouse Clara Cell 10-kDa (CC10) Protein: cDNA nucleotide sequence and molecular basis for the variation in progesterone binding of CC10 from different species. *Experimental Lung Research*, **19**, 67-75
- Smit E.F., Groen H.J.M., Splinter T.A.W., Ebels T., Postmus P.E. (1995): New prognostic factors in resectable non-small cell lung cancer. *Thorax*, **51**, 638-646
- Smith M.L. und Fornace A.J. (1995): Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. *Current Opinion in Oncology*, **7**, 69-75
- Smith B.R. und Brian W.R. (1991): The role of metabolism in chemical-induced pulmonary toxicity. *Toxicologic Pathology*, **19**, 4(1), 470-481
- Smith P., Heath D., Moosavi H. (1974): The Clara cell. *Thorax*, **29**, 147-163
- Spiro S.G. (1988): *Epidemiology*, **1-6, Part I**, aus Lung Tumors, Lung, Mediastinum, Pleura, Chest Wall, Springer Verlag Berlin, heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo
- Stoner G.D. (1998): Introduction to mouse lung tumorigenesis. *Experimental Lung Research*, **24**, 375-383
- Strum J.M., Compton R.S., Katyal S.L., Singh G. (1992): The regulated expression of mRNA for Clara cell protein in the developing airways of the rat, as revealed by tissue in situ hybridization. *Tissue Cell*, **24** (4), 461-471
- Szallasi Z. (1998): Gene expression patterns and cancer. *Nature Biotechnology*, **16**, 1292-1293
- Takeichi M., Watabe M., Shibamoto S., Ito F. (1994): Cadherin-dependent organization and disorganization of epithelial architecture. *Princess Takamatsu Symp.*, **24**, 28-37

- Tenner A.J., Robinson S.L., Borchelt J., Wright J.R. (1989): Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to Clq, can enhance FcR- and CR1-mediated phagocytosis. *J. Biol. Chem.*, **264**, 13923-13928
- Thaete L.G., Malkinson A.M. (1990): Differential staining of normal and neoplastic mouse lung epithelia by succinate dehydrogenase histchemistry. *Cancer Lett.*, **52 (3)**, 219-227
- van Dorst E.B., van Muijen G.N., Litvinov S.V., Fleuren G.J. (1998): The limited difference between keratin patterns of squamous cell carcinomas and adenocarcinomas is explicable by both cell lineage and state of differentiation of tumour cells. *J. Clinical. Pathol.*, **51 (9)**, 679-684
- van Winkle L.S., Buckpitt A.R., Plopper C.G. (1996): Maintenance of differentiated Clara cells in microdissected airway cultures. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **14 (6)**, 586-598
- van Winkle L.S., Isaac J.M., Plopper C.G. (1996): Distribution of epidermal growth factor receptor and ligands during bronchiolar epithelial repair from naphthalene-induced Clara cell injury in the mouse. *Am. J. Pathol.*, **151 (2)**, 443-459
- Vogelstein B. und Kinzler K.W. (1993): The multistep nature of cancer. *Trends Genet.*, **9(4)**, 138-141
- Voorhout W.F., Veenendaal T., Kuroki Y., Ogasawara Y., van Golde L.M., Geuze H.J. (1992): Immunocytochemical localization of surfactant protein D (SP-D) in type II cells, Clara cells and alveolar macrophages of rat lung. *J. Histochem. Cytochem.*, **40 (10)**, 1589-1497
- Walker S.R., Hale S., Malkinson A.M. und Mason R.J. (1989): Properties of isolated nonciliated bronchiolar cells from mouse lung. *Experimental Lung Research*, **15**, 553-573
- Wang J., Souza P., Kuliszewski M., Tanswell A.K., Post M. (1994): Isolation of neuronal precursors by sorting embryonic forebrain transfected with GFP regulated by the Talpha1 tubulin promoter. *Nature Biotechnology*, **16**, 196-199
- Watanabe I., Kurosawa N., Nishihira T. (1998): Establishment and characterization of a murine cell-line derived from malignant fibrous histiocytoma of a Jackson mouse. *Tohoku J. Exp. Med.*, **184**, 173-187
- Watanabe J., Shimada T., Gillma E.M., Ikuta T., Suemasu K., Higashi Y., Gotoh O., Kawajiri L. (2000): Association of CYP1B1 genetic polymorphism with incidence to breast and lung cancer. *Pharmacogenetics*, **10 (1)**, 25-33
- Weaver T.E. und Whitsett J.A. (1991): Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins. *Biochem. J.*, **273**, 249-264
- Weinberg R.A. (1989): Oncogenes, antioncogenes and the molecular bases of multistep carcinogenesis, *Cancer Research*, **49**, 3713-3721
- Weinstein I.B. (2000): Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. *Carcinogenesis*, **21 (5)**, 857-864

- Wijnhoven B.P., Dinjens W.N., Pignatelli M. (2000): E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br. J. Surg.*, **87(8)**, 992-1005
- Widdicombe J.G. und Pack R.J. (1982): The Clara cell. *Eur. J. Respir. Dis.*, **63**, 202-220
- Wiethage T., Voss B. und Müller K.-M. (1994): Onkogene und Tumorsuppressorgene bei der Pathogenese von Lungentumoren. *Pathologe*, **15**, 321-330
- Wikenheiser K.A., Whitsett J.A. (1997): Tumor progression and cellular differentiation of pulmonary adenocarcinomas in SV40 large T antigen transgenic mice. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **16 (6)**, 713-723
- Willey J.C., Coy E.L., Frampton M.W., Torres A., Apostolakos M.J., Hoehn G., Schuermann W.H., Thilly W.G., Olson D.E., Hammersley J.R., Crespi C.L., Utell M.J. (1997): Quantitative RT-PCR measurement of cytochromes p450 1A1, 1B1, and 2B7, microsomal epoxide hydrolase, and NADPH oxidoreductase expression in lungs of smokers and nonsmokers. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **17 (1)**, 114-124
- Wu W., Fan Y.H., Kemp B.L., Walsh G. und Mao L. (1998): Overexpression of cdc25A and cdc25B is frequent in primary non-small cell lung cancer but is not associated with overexpression of c-myc. *Cancer Research*, **58**, 4082-4085
- Yarus S., Greenberg N.M., Wei Y., Whitsett J.A., Weaver T.E., Rosen J.M. (1997): Secretion of unprocessed human surfactant protein B in milk of transgenic mice. *Transgenic Res.*, **6 (1)**, 51-57
- Yi S., Tsao M.S. (2000): Activation of HGF-met autocrine loop enhances tumorigenicity in a human lung adenocarcinoma cell line. *Neoplasia*, **2(3)**, 226-234
- Yu S.H., Possmayer F. (1988): Comparative studies on the biophysical activities of the low-molecular-weight hydrophobic proteins purified from bovine pulmonary surfactant. *Biochem Biophys Acta*, **961(3)**, 337-350
- Zarnegar R., DeFrances M.C. (1993): Expression of HGF-SF in normal and malignant human tissues. *EXS*, **65**, 181-199
- Zetter B.R. (1993): Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin. Cancer Biol.*, **4(4)**, 219-229
- Zweiger G. und Scott R.W. (1997): From expressed sequence tags to 'epigenomics': an understanding of disease processes. *Current Opinion in Biotechnology*, **8**, 684-687

Lebenslauf

Name: Philipp Werner Wabnitz
Geburtstag: 31. März 1972
Geburtsort: Aachen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1978-1982 Grundschule (Aachen und Leichlingen; NRW)
1982-1991 Gymnasium (Leichlingen, NRW; Winsen/L., Nds.)
Mai 1991 Abitur

Wehrdienst:

1991-1993 Wehrdienst als ROA

Hochschulbildung:

1993-1998 Studium der Biologie an der
Georg-August-Universität Göttingen
1997 Diplom-Prüfung; Hauptfach: Biochemie
1998 Diplomarbeit zum Thema: „Untersuchung über
die Verteilung von Zuckern in Stickstoff-fixierenden
Wurzelknöllchen“ am Albrecht-von-Haller-Institut für
Pflanzenwissenschaften; Abtlg. Biochemie der
Pflanze

Promotion: als Stipendiat des Graduiertenkolleg „Charakterisierung von
regulatorischen Peptiden und ihrer Zielproteine“, Hannover,

Okt. 1998 - Feb. 2001 am Fraunhofer Institut für Toxikologie und
Aerosolforschung, Abtlg. Zellbiologie; Hannover
Seit April 2000 bei Ingenium Pharmaceuticals AG;
Martinsried

Titel „Murine Clara-Zelllinien aus transgenen Mäusen
als *in vitro*-Modell für die humane Lungen-
Adenokarzinogenese – Studien zu Synergien von
Onko- und Tumorsuppressorgenen *in vivo*“

Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben auf verschiedenen Ebenen viele Menschen und Institutionen beigetragen:

Herrn Prof. Dr. W. Müller habe ich herzlich dafür zu danken, daß er sich bereit erklärt hat, diese Arbeit als Referent zu betreuen.

Herrn Prof. Dr. D. Paul unter dessen Anleitung ich die Arbeit anfertigen durfte, bin ich für die Übernahme des Korreferates ebenso zu Dank verpflichtet, wie auch ganz besonders für seine fortwährende Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gilt natürlich auch dem Graduiertenkolleg „Charakterisierung von regulatorischen Peptiden und ihren Zielproteinen“, das diese Arbeit finanziell ermöglicht und meine wissenschaftliche Ausbildung in der Breite gefördert hat. Stellvertretend für die vielen Personen aus dem Graduiertenkolleg, möchte ich hier nur meine Kobetreuer, Herrn Prof. Dr. Bauer und Herrn Prof. Dr. Resch und die geduldige Koordinatorin Frau Dr. Sabine Barlach-Bölle nennen.

Dem Fraunhofer ITA, Hannover, der Firma Ingenium Pharmaceuticals AG, Martinsried möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Arbeiten in ihren Räumlichkeiten durchführen zu dürfen.

Herrn Dr. Roman Halter bin ich ebenso, wie Herrn Dr. Rainer Klocke für die fachliche Betreuung und die Diskussionsbereitschaft dankbar, die ich häufig in Anspruch genommen habe.

Herrn Ingo Jerx danke ich für die Unterstützung bei den Chromosomen- und Frau Dr. Julia Guinoaud für die histopathologischen Analysen. Herrn Dr. Bargsten habe ich für seine Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen zu danken, die in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. Redeker durchgeführt worden sind.

Der Abteilung von Herrn Prof. Dr. Otto, die mich in guter Nachbarschaft ihre Geräte hat nutzen lassen, und hier besonders den Herren Dr. Marco Kresin und Dr. Hayssam Zakaria, muß ich ebenfalls einen besonderen Dank sagen.

Darüber hinaus habe ich Dr. Stefan Lampel und Dr. Claudia Färber für ihre sehr hilfreiche Unterstützung zu danken, bei der sie mir viel Zeit geopfert haben.

Mein besonderer und abschließender Dank gilt aber vor allem meinen Eltern und Frau Constanze Passow, die mich immer unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit wurde bisher nicht an einer anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Weiterhin erkläre ich, daß die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Philipp Wabnitz