

Aus der Abteilung Allgemein- und Viszeralchirurgie  
(Prof. Dr. med. H. Becker)  
im Zentrum Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

***In-vitro*-Untersuchungen zu transkriptionellen und translationalen  
Zusammenhängen von *COX2* und *MUC4* im Pankreaskarzinom**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Yong-Jun Peter Jo  
aus  
Ahlen

Göttingen 2011

**Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel**

**I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. BM. Ghadimi**

**II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. P. Burfeind**

**III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann**

**Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2011**

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Pankreaskarzinom</b>	<b>1</b>
<b>1.2 COX2</b>	<b>2</b>
<b>1.3 MUC4</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Ziel der Arbeit</b>	<b>5</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Zellkultur</b>	<b>6</b>
2.1.1 Aufbereitung der Zelllinien für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	8
2.1.2 Isolation der RNA für die semi-quantitative real-time PCR (qPCR)	8
2.1.3 Herstellung von Zytospins für die Immunzytochemie (ICC)	9
<b>2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)</b>	<b>10</b>
2.2.1 Prinzip der FISH	10
2.2.2 DNA-Sonden für die FISH	10
2.2.3 Herstellung der DNA-Gensonden für <i>COX2</i> und <i>MUC4</i>	12
2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	15
2.2.5 Nicktranslation von PAC- und BAC-DNA	16
2.2.6 Präzipitation und Hybridisierung	17
2.2.7 Detektion	18
2.2.8 Auswertung und Bildaufnahme	18
2.2.9 Herstellung von Metaphasenpräparaten zur Validierung der Gensonden	19
<b>2.3 Immunzytochemie (ICC)</b>	<b>20</b>
2.3.1 Einführung in die Immunzytochemie	20
2.3.2 Immunzytochemische Färbung zum Nachweis des COX2- und MUC4-Proteins	22
2.3.3 Auswertung der Immunzytochemie	22
<b>2.4 Semi-quantitative real-time PCR</b>	<b>23</b>
2.4.1 Prinzip der semi-quantitativen real-time PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)	23

---

2.4.2	Durchführung der semi-quantitativen real-time PCR	24
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
3.1	Ziel dieser Arbeit	28
3.2	Etablierung der Zentromer- und Gensonden für die FISH	28
3.3	FISH-Analysen	29
3.3.1	FISH-Auswertungen für <i>COX2</i>	29
3.3.2	FISH-Auswertungen für <i>MUC4</i>	31
3.4	Immunzytochemie-Analysen	34
3.4.1	COX2	34
3.4.2	MUC4	35
3.5	Semi-quantitative real-time PCR-Analysen	37
3.6	Vergleich der FISH-, der ICC- und der qPCR-Ergebnisse	38
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>40</b>
4.1	<i>COX2</i> -Überexpression im Pankreaskarzinom	40
4.2	<i>MUC4</i> -Überexpression im Pankreaskarzinom	42
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>47</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidest. – zweifach destilliertes Wasser
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
ATCC	American Tissue Culture Collection
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
°C	Grad Celsius
CCD	Charged Coupled Device
cDNA	Komplementäre DNA
CEP	Centromeric Probe
CIN	Chromosomale Instabilität
COX	Cyclooxygenase
Ct	Cycle Threshold, Schwellenwert Zyklus
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fc	Kristallines Fragment
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

---

For	Forward
g	Gramm
h	Stunde(n)
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HETE	Hydroxyeicosatetraenoic acid
HRP	Horseradish Peroxidase
ICC	Immunzytochemie
K-Acetat	Kaliumacetat
Kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
LB	Luria Bertani
l	Liter
LOX	Lipoxygenase
LT	Leukotriene
m	Meter
M	Molarität
Mb	Megabasenpaare
Mg	Magnesium
Min.	Minute(n)
miRNA	microRNA
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
MUC	Muzin
MUC4	Muzin 4
NaOH	Natriumhydroxid
NaCl	Natriumchlorid
OT	Objektträger
PAC	P1-derived Artificial Chromosome
PanIN	Pancreatic Intraepithelial Neoplasia
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PG	Prostaglandin
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionen-Konzentration

---

PLA2	Phospholipase A2
qPCR	Quantitative real-time Polymerase-Ketten-Reaktion
Rev	Reverse
RIN	RNA-Integritätsnummer
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde(n)
SSC	Standard Saline Citrat
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Salzsäure
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
U/ Min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
vs	versus
VT	Volumenteile
z.B.	zum Beispiel

## Dekadische Vorsilben

n (nano)	$10^{-9}$	G (giga)	$10^9$
μ (mikro)	$10^{-6}$	M (mega)	$10^6$
m (milli)	$10^{-3}$	k (kilo)	$10^3$
c (zenti)	$10^{-2}$	h (hekto)	$10^2$
d (dezi)	$10^{-1}$	da (deka)	$10^1$

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Seite	3
Abbildung 2.1	Seite	11
Abbildung 2.2	Seite	12
Abbildung 2.3	Seite	21
Abbildung 3.1	Seite	28
Abbildung 3.2	Seite	32
Abbildung 3.3	Seite	33
Abbildung 3.4	Seite	35
Abbildung 3.5	Seite	36



---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Seite	6
Tabelle 2.2	Seite	7
Tabelle 2.3	Seite	9
Tabelle 2.4	Seite	14
Tabelle 2.5	Seite	14
Tabelle 2.6	Seite	15
Tabelle 2.7	Seite	16
Tabelle 2.8	Seite	20
Tabelle 2.9	Seite	21
Tabelle 2.10	Seite	22
Tabelle 2.11	Seite	25
Tabelle 2.12	Seite	26
Tabelle 3.1	Seite	30
Tabelle 3.2	Seite	30
Tabelle 3.3	Seite	30
Tabelle 3.4	Seite	31
Tabelle 3.5	Seite	31
Tabelle 3.6	Seite	32
Tabelle 3.7	Seite	34
Tabelle 3.8	Seite	36
Tabelle 3.9	Seite	37
Tabelle 3.10	Seite	37
Tabelle 3.11	Seite	39
Tabelle 3.12	Seite	39

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist in Deutschland die vierthäufigste Krebstodesursache bei Männern und Frauen. Dabei ist in etwa 95% der Fälle der exokrine Anteil des Organs Ausgangspunkt für die malignen Tumoren. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate aller Pankreaskarzinome liegt für Männer bei etwa 6,4%, für Frauen bei 7,6%. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt für Männer 69, für Frauen 76 Jahre. Als Risikofaktoren werden Tabak und Alkohol ebenso wie eine Ernährung, die reich an tierischen Fetten ist, sowie rezidivierende Pankreatitiden diskutiert (Robert-Koch-Institut 2008).

Charakteristisch für das Pankreaskarzinom ist neben seinem aggressiven Wachstum das späte Auftreten von Symptomen, so dass häufig zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits ein fortgeschrittenes Stadium besteht. In etwa 80% der Fälle ist die Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits nicht mehr operabel (Ahrendt und Pitt 2002) und die Prognose damit überaus schlecht, da die primäre Resektion den einzigen kurativen Ansatz des Pankreaskarzinoms darstellt. Je nach Lage des Tumors (Pankreaskopf vs. Pankreasschwanz) wird im Wesentlichen zwischen der Pankreaskopf- und der Pankreaslinksresektion unterschieden. In seltenen Fällen muss die gesamte Bauchspeicheldrüse entfernt werden. Aber auch bei vollständiger Entfernung des Pankreas beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate lediglich 30% (Javle und Hsueh 2009).

Histologisch werden zu den exokrinen Pankreastumoren fünf Haupttypen unterschieden: 1.) duktale Adenokarzinome, 2.) intraduktale papilläre Karzinome, 3.) seröse Zystadenokarzinome, 4.) muzinöse Zystadenokarzinome und 5.) Azinuszell-Karzinome, wobei das duktale Adenokarzinom mit einem Anteil von bis zu 90% aller Pankreastumore am häufigsten ist (Kloppel 2000).

In der adjuvanten Situation sowie im Rahmen palliativer Konzepte spielt das Chemotherapeutikum Gemcitabin eine wesentliche Rolle. In den letzten Jahren sind zahlreiche Kombinationen von Chemotherapeutika eingesetzt worden. Im Rahmen mehrerer größerer Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Kombinationen keinen wesentlichen Vorteil gegenüber der Monotherapie mit Gemcitabin haben (Javle und Hsueh 2009). Auch der Einsatz der Strahlentherapie oder neoadjuvante Therapiekonzepte haben bisher keinen entscheidenden Durchbruch erbracht.

Aufgrund der hohen Rate an fortgeschrittenen Erkrankungen und der meist inoperablen Situation käme der Verbesserung der Früherkennung bzw. der Einführung von Screening-Verfahren für einen sicheren Ausschluss eines Pankreaskarzinoms bei unspezifischen Beschwerden wie Rückenschmerzen oder Völlegefühl im Oberbauch eine entscheidende Rolle zu. Bisherige Untersuchungstechniken wie Ultraschall, endoskopische-retrograde Pankreatikographie, Computertomographie und Magnetresonanztomographie ermöglichen meist nur die Darstellung fortgeschrittener Tumoren. Die Bestimmung der bislang eingesetzten Serumentumormarker ist als Suchtest ungeeignet, da deren Sensitivität und Tumorspezifität zu gering ist. Von den bekannten Markern hat das CA-19-9 die höchste Sensitivität (ca. 70%) und Spezifität (75–87%) (Safi et al. 1997). Bei einer Stauung des Gallengangs kann dieser Wert aber unabhängig von der Dignität der Erkrankung deutlich erhöht (bis ca. 800 U/ml) sein. CA-19-9-Werte über 1000 U/ml finden sich allerdings fast nur bei Patienten mit Pankreaskarzinom.

Eine mögliche Verbesserung der Früherkennung könnte durch den Einsatz genetischer Marker erreicht werden. Bisher zeigten sich diese Bemühungen allerdings nur wenig erfolgreich (Goggins et al. 2000), sodass weitere Untersuchungen z.B. zur Karzinogenese von wesentlicher Bedeutung sind. Ein möglicher Ansatz hierbei ist die Identifizierung differentiell regulierter Gene zwischen Normal- und Tumorgewebe. Entsprechend konnte ein Expressionsanstieg im Pankreaskarzinom für *COX2* (Hasan et al. 2008) und *MUC4* (Andrianifahanana et al. 2001) gezeigt werden. Daher sind beide Marker bereits in den Mittelpunkt der aktuellen Forschung gerückt (Andrianifahanana et al. 2001; Chaturvedi et al. 2007; Kokawa et al. 2001; Matsubayashi et al. 2007; Merati et al. 2001; Singh et al. 2007).

## 1.2 *COX2*

Die Cyclooxygenase (COX) metabolisiert Arachidonsäure zu Prostaglandin (PG) und Thromboxan und ist in zwei Isoformen vorzufinden (Samuelsson 1987), siehe Abb. 1. Die konstitutiv exprimierte Cyclooxygenase 1 (*COX1*) ist in den meisten Zellen präsent, in denen sie kontinuierlich Prostaglandine synthetisiert, um die physiologischen Funktionen wie z.B. die Zellprotektion der Magenschleimhaut (Kawai et al. 2002) aufrecht zu erhalten. (Gilroy et al. 2001), (Smith et al. 1996). Im Gegensatz dazu wird die Expression der Cyclooxygenase 2

(*COX2*) durch pro-inflammatorische Stimuli wie Zytokine und Mitogene induziert und synthetisiert eine große Menge an Prostaglandinen (Hla et al. 1997; Jones et al. 1993). *COX2* ist physiologisch äußerst wichtig bei der Entzündungsantwort (Vane et al. 1994) und nicht-steroidale Antirheumatika werden selektiv zur Inhibierung der Cyclooxygenase therapeutisch genutzt.

Die tumorigenöse Eigenschaft von *COX2* scheint durch *COX2*-katalysierte Prostaglandine zustande zu kommen, wobei insbesondere Prostaglandin E2 (*PGE2*) in vielen Tumoren häufig vorkommt. Unter der Wirkung von Prostaglandin E2 zeigt sich ein vermehrtes Tumorwachstum sowie weitere vielfältige Mechanismen, die in der Karzinogenese eine wichtige Rolle spielen, wie z.B. die Stimulation der Zellproliferations, Invasion, Angiogenese, Inhibierung der Apoptose und die Modulierung der Immunantwort (DuBois 2006).

Im Pankreaskarzinom wurde nachgewiesen, dass *COX2* und das durch *COX2* abgeleitete Prostaglandin E2 eine stimulierende Wirkung auf Wachstum, Invasion und Angiogenese besitzen (Eibl et al. 2003a), (Eibl et al. 2005), (Murakami et al. 2007).

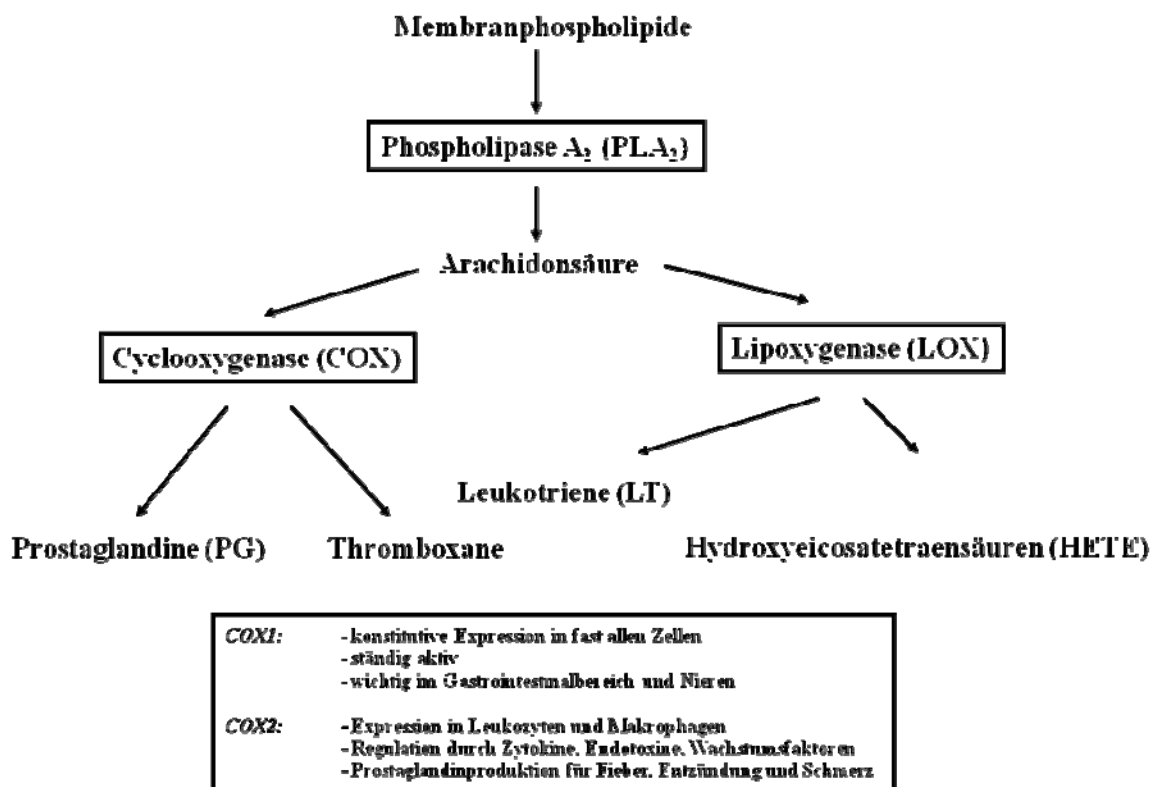


Abb. 1.1: Schematische Abbildung der Prostaglandinsynthese

### 1.3 *MUC4*

Muzine sind hochmolekulare Glykoproteine, die an der Oberfläche epithelialer Zellen exprimiert werden. Bisher wurden 16 verschiedene Muzine identifiziert und als *MUC1*, 2, 3A, 3B, 4, 5AC, 5B, 6-9, 11-13, 16 und 17 klassifiziert (Mall 2008). Muzine sind Glykoproteine aus einer zentralen Proteinkette und langen Seitenketten aus Polysacchariden. Die Polysaccharide verleihen den Muzinen eine hohe Wasserbindungskapazität und schützen das zentrale Protein vor Proteolyse (Hanisch et al. 1999). Unter physiologischen Bedingungen besitzen Muzine eine protektive Rolle für epitheliales Gewebe: Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Erneuerung und Differenzierung des Epithels, bei der Modellierung der Zelladhäsion und im Rahmen des Zellsignalweges (Singh et al. 2007).

Veränderungen in der Expression und in der Struktur von Muzinen sind sowohl in dysplastischen als auch in neoplastischen Läsionen berichtet worden (Ringel und Lohr 2003). Eine erhöhte Produktion von Muzinen wird bei vielen Adenokarzinomen, wie beispielsweise Kolon-, Magen-, Bronchial-, Prostata- oder auch Ovarialkarzinomen beobachtet (Singh et al. 2007).

Bei *MUC4* handelt es sich im Gegensatz zu den sekretorischen Muzinen (*MUC2*, 5AC, 5B, 6 und 7) um ein membrangebundenes Muzin (Perez-Vilar und Hill 1999) und *MUC4* wird in sekretorisch aktiven Epithelzellen synthetisiert und sorgt für einen Schutzfilm in verschiedenen Gängen und Lumina (Porchet et al. 1991). Physiologisch wird *MUC4* in zahlreichen Normalgeweben wie Trachea, Lunge, Magen, Kolon, Uterus und Prostata exprimiert (Audie et al. 1993), (Audie et al. 1995).

Während *MUC4* im Pankreasnormalgewebe nahezu nicht detektierbar ist (Andrianifahanana et al. 2001), zeigt sich ein Expressionsanstieg schon in frühen präkanzerösen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) mit weiterer Zunahme in Abhängigkeit des Fortschreitens des Tumors (Swartz et al. 2002).

Erste Untersuchungen als möglicher Marker zur Früherkennung wurden von Jhala et al. (Jhala et al. 2006) durchgeführt, die an Feinnadel-Aspirations-Material aus dem Pankreasgang mit einer Sensitivität von 91% und einer Spezifität von 100 % Karzinome nachweisen konnten. Eine Überexpression von *MUC4* scheint darüber hinaus mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein (Shibahara et al. 2004), (Saitou et al. 2005), (Tamada et al. 2006). Auch der Einsatz als potentiell therapeutisches Ziel wurde schon untersucht (Singh et al. 2007).

## 1.4 Ziel der Arbeit

Wenngleich in der aktuellen Literatur zahlreiche Arbeiten zu *MUC4* und *COX2* beim Pankreaskarzinom vorliegen, so gibt es bisher wenige Daten, welche den direkten Zusammenhang der Regulation erklären. Ausgehend von der ausgeprägten Polyploidie des Pankreaskarzinoms ist die grundlegende Frage dieser Arbeit, inwieweit die Expression von *COX2* und *MUC4* im Pankreaskarzinom einer Amplifikation zu Grunde liegt oder durch eine vermehrte Expression dieser Gene begründet wird. Darüber hinaus soll die Frage geklärt werden, ob die beiden untersuchten Gene möglicherweise als zukünftiges Ziel der Früherkennung von Pankreaskarzinomen z. B. durch die Gewinnung von Zellen bei der Bürstenzytologie im Pankreasgang dienen können.

Hierzu werden in dieser Arbeit zunächst lokusspezifische in-situ-Hybridisierungen mittels FISH an ausgesuchten Pankreaskarzinom-Zelllinien durchgeführt und im Folgenden das Transkriptionsprofil von *COX2* und *MUC4* mittels semi-quantitativer real-time PCR erfasst. Im nächsten Schritt wird die Proteinexpression mittels Immunzytochemie untersucht, um mögliche Abweichungen auf der Translationsebene zu erfassen.

## 2 Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu *COX2* und *MUC4* auf genomischer, transkriptioneller und translationaler Ebene durchgeführt. Hierzu wurden ausschließlich repräsentative Pankreaskarzinom-Zelllinien sowie eine Fibroblasten-Zelllinie verwendet. Die Amplifikationen wurden mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) untersucht. Die entsprechende mRNA-Expression wurde durch eine semi-quantitative real-time PCR bestimmt. Für die semi-quantitative Analyse der Proteinexpression wurde die Immunzytochemie verwendet.

### 2.1 Zellkultur

Als Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten *in-vitro*-Versuche dienten neun ATCC (American Tissue Culture Collection, Rockville, MD, USA)-Pankreaskarzinom-Zelllinien (siehe Tab. 2.1). Als Kontrolle diente uns eine Fibroblasten-Zelllinie (VH7), die uns freundlicherweise von Herrn Prof. Max Lakomek, Abteilung Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Pädiatrie I, Universitätsmedizin Göttingen, zur Verfügung gestellt wurde.

Zelllinie	Herkunft	Referenz	Medium
AsPc-1	Pankreas-Adenokarzinom, Aszites, 62j, w	MH Tan, 1981	RPMI
BxPc-3	Pankreas-Adenokarzinom, Primärtumor, 61j, w	MH Tan, 1986	RPMI
Capan-1	Pankreas-Adenokarzinom, Lebermetastase, 40j, m	J Fogh, 1977	RPMI
Capan-2	Pankreas-Adenokarzinom, Primärtumor, 56j, m	J Fogh, 1975	RPMI
CFPAC-1	Pankreas-Adenokarzinom, Lebermetastase, 26j, m	RA Schoumacher, 1990	DMEM
Hs766T	Pankreaskarzinom, Lymphknotenmetastase, 46j, m	RB Owens, 1976	RPMI
MiaPaCa-2	Pankreaskarzinom, Primärtumor, 65j, m	A Yunis, 1977	RPMI
Panc-1	Pankreas-Adenokarzinom, Primärtumor, 56j, m	M Lieber, 1975	DMEM
SU.86.86	Pankreas-Adenokarzinom, Lebermetastase, 57j, w	BJ Drucker, 1988	RPMI

**Tab. 2.1: Verwendete Pankreaskarzinom-Zelllinien**

Die Tumorzelllinien AsPc-1, BxPc-3, Capan-1, Capan-2, Hs766T, MiaPaCa-2, SU.86.86 wurden in RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin, 10% fötalem Kälberserum und 1%

Penicillin-Streptomycin kultiviert. Bei CFPAC-1 und Panc-1 wurde das Medium DMEM mit L-Glutamin, 10% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin-Streptomycin verwendet. Alle Zelllinien wuchsen adhärent als Monoschicht auf dem Boden der Zellkulturflaschen. Die Zellen wurden zunächst in einer T-25-Kulturflasche (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3 bis 4 Tage (Mediumansätze für die Zellkultur siehe Tab. 2.2). In Abhängigkeit von der Proliferationsrate wurden die Zelllinien vor konfluentem Wachstum passagiert. Dazu wurde das Medium abgesogen und die Zellen zunächst in 1x PBS geschwenkt und vom Medium gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Untergrund wurde die Kulturflasche mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,25% Trypsin in Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-freier PBS-Lösung) für 5 bis 10 Min. im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf zwei T-75-Kulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verteilt und weiter für die folgenden Experimente im Brutschrank kultiviert.

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
RPMI	88 ml RPMI 1640 Medium mit 25 mM HEPES 1 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration 100 E/ml) 1 ml L-Glutamin (Endkonzentration 2 mM) 10 ml Fötale Kälberserum (Endkonzentration 10%)	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
DMEM	88ml DMEM Medium 1 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration 100 E/ml) 1 ml L-Glutamin (Endkonzentration 2 mM) 10 ml Fötale Kälberserum (Endkonzentration 10%)	Gibco, Karlsruhe, Deutschland

**Tab. 2.2: Mediumansätze für die Zellkultur**



### 2.1.1 Aufbereitung der Zelllinien für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Zellen aus der Zellkultur wurden nach Gewinnung zunächst für 5 Min. bei 3000 U/ Min. zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet zweimal mit 1x PBS gewaschen, zentrifugiert und der Überstand bis auf 50 µl abgenommen. Das Pellet wurde re-suspendiert und mit 500 µl 0,4 % KCl (37° C) für 15-30 Min. inkubiert, wobei es durch Plasmolyse zu einer Isolation der Zellkerne kam. Danach wurde das Lysat zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde mit 500 µl Fixans (3:1 Gemisch aus Methanol und Eisessig) für 10 Min. bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wurde die Kernsuspension nochmals zweimal mit Fixans gewaschen und das Pellet in 30 µl Fixans resuspendiert, auf Objektträger getropft und luftgetrocknet. Die Präparate wurden nach Dehydrierung in einer Alkoholreihe (70%, 85%, 100%) entweder sofort für FISH-Analysen benutzt oder bei -20° C trocken aufbewahrt.

### 2.1.2 Isolation der RNA für die semi-quantitative real-time PCR (qPCR)

Die Isolation der RNA aus den abgeernteten Zelllinien erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers (siehe Tab. 2.3). Die isolierte RNA wurde bei -80° C aufbewahrt.

- 
1. Abtrypsinieren der Zellen, 1x Waschen mit PBS, Zentrifugation für 5 Min. bei 800 U/Min. und Abnahme des Überstandes

---

  2. Lysieren der Zellen durch Hinzugabe von 600 µl RLT-Puffer und anschließendem Vortexen

---

  3. Überführen des Lysats in eine QIAshredder Spin Column mit einem 2 ml Collection Tube und Zentrifugation für 2 Min. bei maximaler Geschwindigkeit

---

  4. Hinzugabe von 1 Volumenteil 70% Ethanol und anschließendem Mischen mit der Pipette

---

  5. Transfer von 700 µl der Probe in eine RNeasy Spin Column mit einem 2 ml Collection Tube, Zentrifugation für 15 Sek. bei 10000 U/Min. und Verwerfen des Durchflusses

---

  6. Hinzugabe von 350 µl RW1 Puffer, Zentrifugation für 15 Sek. bei 10000 U/Min. zum Waschen der Spin Column Membran und Verwerfen des Durchflusses

---

  7. Pro Probe Hinzugabe von 10 µl DNase I Stock Solution zu 70 µl RDD Puffer

---

  8. Hinzugabe des DNase I Inkubations Mix (80 µl) direkt auf die RNeasy Spin Column Membran und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Min.
-

- 
9. Hinzugabe von 350 µl RW1-Puffer zur RNeasy Spin Column, Zentrifugation für 15 Sek. bei 10000 U/Min. und Verwerfen des Durchflusses

---

  10. Hinzugabe von 500 µl RPE-Puffer in die RNeasy Spin Column zum Waschen der Spin Column Membran, Zentrifugation für 15 Sek. bei 10000 U/ Min. und Verwerfen des Durchflusses

---

  11. Hinzugabe von 500 µl RPE-Puffer in das RNeasy Spin Column zum Waschen der Spin Column Membran und Zentrifugation für 2 Min. bei 10000 U/Min.

---

  12. Platzieren der RNeasy Spin Column in ein neues 1,5 µl Collection Tube, Hinzugabe von 30 µl RNase freien Wassers, und anschließender Zentrifugation für 1 Min. bei 10000 U/Min., um die RNA zu eluieren
- 

**Tab. 2.3: Protokoll für die RNA-Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)**

### **2.1.3 Herstellung von Zytospins für die Immunzytochemie (ICC)**

Die Zellen aus der Zellkultur wurden nach dem Abtrypsinieren zunächst für 5 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet zwei Mal mit je 1x PBS gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abgesogen. Das auf Eis gelagerte Pellet wurde dann mit 500 µl 1x PBS verdünnt, davon wurden nachfolgend 100 µl in 10 ml Casy®Ton, einer komplett teilchenfreien Flüssigkeit (Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland) gemischt und am Zellzählgerät Casy®-1 (Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland) gezählt. Entsprechend der benötigten Zellzahl von ca. 20.000 wurde die Zellsuspension mit Zellkulturmedium verdünnt und für die Zytospins weiter verarbeitet.

In jede Zytospinkammer wurden 20 µl Zellsuspension gegeben und 10 Min. lang mit einer Zytozentrifuge (Shandon Zytospin 4, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA) bei 800 U/Min. zentrifugiert. Die Objektträger wurden unter dem Mikroskop kontrolliert, bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet und entweder sofort für ICC-Analysen benutzt oder bei -20° C trocken aufbewahrt.

## 2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

### 2.2.1 Prinzip der FISH

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist eine molekularbiologische Methode, um bestimmte Genabschnitte auf der DNA oder RNA nachzuweisen. Die hierzu verwendeten Gensonden bestehen aus der komplementären Sequenz des gewünschten Bindungsorts und können durch ihre vorherige Fluoreszenzmarkierung oder über einen Sekundär-Antikörper nach erfolgreicher Bindung (Hybridisierung) entsprechend sichtbar gemacht werden.

Die Fluoreszenzfarbstoffe können dann in einem Fluoreszenzmikroskop zur Emission von Licht bestimmter Wellenlänge angeregt werden und mit Hilfe von Emissionsfilter selektiv dargestellt werden, die zumeist im sichtbaren Wellenlängenbereich liegt. Mit Hilfe dieser Filter können einzelne (Single Bandpass Filter Set) oder gleichzeitig zwei (Dual Bandpass Filter Set) oder drei (Triple Bandpass Filter Set) verschiedene Fluoreszenzfarben betrachtet werden.

Markiert man verschiedene Sonden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, so können diese Sonden zusammen auf einen Gewebsschnitt aufgebracht werden und somit verschiedene Genomabschnitte mit Hilfe von geeigneten Lichtfiltern gleichzeitig untersucht werden.

### 2.2.2 DNA-Sonden für die FISH

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Gene *COX2* und *MUC4* als Zweifarben-FISH-Experiment durchgeführt. Entsprechend wurde neben dem genspezifischen Locus das entsprechende Zentromer des Chromosoms angefärbt, auf dem sich die Gene befinden (siehe Abb. 2.2). Für *COX2* war dies das Zentromer von Chromosom 1, für *MUC4* war es das Chromosom 3. Die Zentromersonden erstreckten sich jeweils über die Chromosomen-Bande 1p11.1-q11.1 bzw. 3p11.1-q11.1. Beide Sonden waren mit SpectrumOrange<sup>TM</sup> Probe markiert und wurden käuflich erworben (Firma Vysis, Downers Grove, IL, USA).

Die Sonden zum Nachweis der Gene *COX2* und *MUC4* wurden entgegen der Zentromersonden nicht gekauft, sondern selbst hergestellt. Grundlage dieses Verfahrens sind hierbei künstliche Chromosomen, welche die komplementäre Sequenz der Zielstruktur aufweisen und nach Einbringen in einen entsprechenden Organismus leicht vermehrt,

selektiert und aufgereinigt werden können. Entsprechend der Herkunft unterscheidet man u.a. zwischen einer sog. PAC-Präparation (P1 Artificial Chromosome), welche aus dem P1-Vektor des temperenten Bakteriophagen P1 entwickelt wurde, und BAC-Präparation (Bacterial Artificial Chromosome) welche aus dem Single-Copy F-Plasmid des Bakteriums *Escherichia coli* entwickelt wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden für *MUC4* BACs und für *COX2* PACs verwendet, welche bereits in *E.coli* kloniert wurden und uns freundlicherweise von Dr. Thomas Ried, Genetics Branch, NCI/NIH, Bethesda, USA, zur Verfügung gestellt wurden (siehe Abb. 2.1).

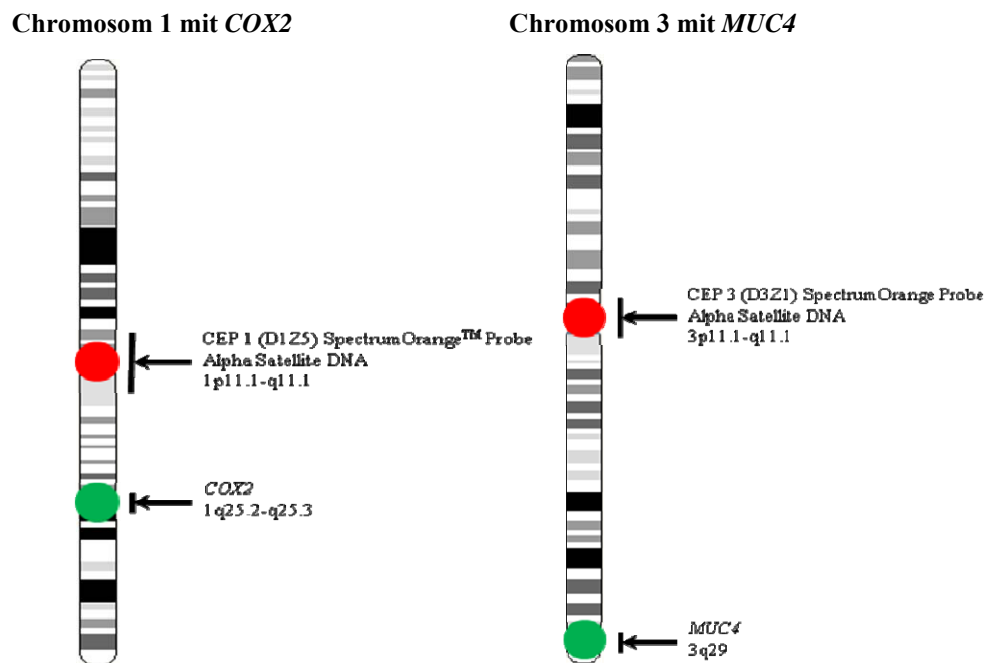


Abb. 2.1: Lokalisation der Zentromersonden (CEP) (rot) und der Gensonden (grün) für das Chromosom 1 mit *COX2* und für das Chromosom 3 mit *MUC4*

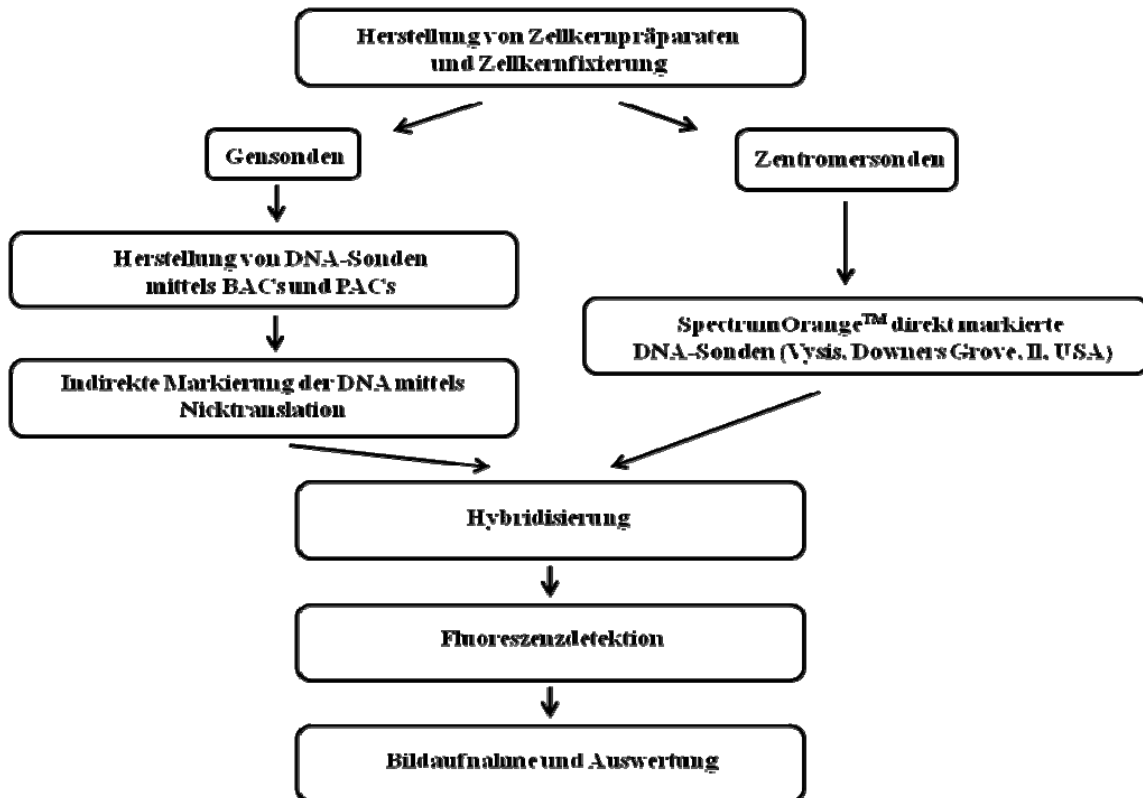


Abb. 2.2: Schematische Darstellung einzelner Schritte der durchgeführten FISH-Experimente

### 2.2.3 Herstellung der DNA-Gensonden für *COX2* und *MUC4*

Zum Vermehren der PAC- und BAC-DNA wurden die DNA-Vektoren in *E. coli* vervielfältigt. Um gleichzeitig eine Selektion von Bakterien zu erreichen, welche auch das artifizielle Chromosom beinhalten, wurde bei der initialen Klonierung des Chromosoms ein Gen integriert, welches eine Antibiotikaresistenz vermittelt. Dies erlaubt bei der Anzucht der Bakterien im LB-Nährmedium durch die Hinzugabe des jeweiligen Antibiotikums die Selektion eben der *E. coli*-Bakterien, welche das Resistenz-Gen tragen und somit auch die Selektion der speziell zu vermehrenden Vektoren. Für *COX2* erfolgte die Selektion durch Hinzugabe von Kanamycin (Sigma, Schnelldorf, Deutschland - Konzentration: 25 µg/ml), für *MUC4* wurde Chloramphenicol (Sigma, Schnelldorf, Schnelldorf - Konzentration: 12,5 µg/ml) verwendet.

Im ersten Schritt wurde hierzu der LB-Agar (Applichem, Darmstadt, Deutschland) zunächst autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 50° C wurde das entsprechende Antibiotikum steril

hinzugegeben und in Petrischalen ausgegossen. Nachdem der Agar auf Raumtemperatur abgekühlt war, konnte die Platte mit jeweils einem Bakterienstamm beimpft werden und wurde über Nacht bei 37° C bebrütet.

In der Folge wurde dann von der frischen Agar-Platte eine Kolonie mit der Impfüse aufgenommen und zu 3 ml Selektivmedium, welches ebenfalls das Selektions-antibiotikum enthielt, hinzugegeben. Bei 37° C erfolgte eine erneute Inkubation für 4 Stunden im Schüttler bei 200 U/Min. Mit der 3-ml-Kultur wurden unter gleichen Bedingungen nun 50 ml Selektivmedium beimpft. Zuletzt wurde die Lösung zu 450 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) hinzugegeben und unter gleichen Bedingungen über Nacht inkubiert. Die Zellernte erfolgte somit in der späten exponentiellen Wachstumsphase und wurde durch eine zehnmünütige Zentrifugation bei 4° C und 10.000 g durchgeführt. Das Zellpellet wurde anschließend durch Abgießen des Überstandes erhalten.

Die Isolation der Gensonden-DNA erfolgte mittels modifizierter alkalischer Lyse und nachfolgender Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe Tab. 2.2). Die erhaltene Sonden- DNA wurde als rein bezeichnet, wenn sich bei der photometrischen Messung ein Extinktionsverhältnis  $E(260)/E(280)$  über 1,8 zeigte.

- 
1. Resuspension des Zellpellets in 20 ml Resuspensionspuffer

---

  2. Zugabe von 20 ml Lysispuffer und vorsichtige Durchmischung

---

  3. Inkubation für 5 Min. bei Raumtemperatur

---

  4. Zugabe von 20 ml Neutralisationspuffer und vorsichtige Durchmischung

---

  5. Inkubation für 5 Min. bei Raumtemperatur auf Eis

---

  6. Zentrifugation für mindestens 25 Min. bei 4° C und 14000 U/Min.

---

  7. Abnahme des klaren Überstandes und Fällung mit Isopropanol (in 1,5 ml Reaktionsgefäß)

---

  8. Lösung in 700 µl Aqua bidest

---

  9. Zugabe von 200 µg RNase A und Inkubation bei 37° C

---

  10. Zugabe von 1 VT Phenol/ Chloroform (1:1), Schütteln für 2 Min. und Zentrifugation für 5 Min. bei 14000 U/Min.

---

  11. Abnahme der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß

---

  12. Wiederholung der Schritte 7-11 bis zum Ausbleiben einer Trübung

---

  13. Zugabe von 1 VT Chloroform, Schütteln für 2 Min. und Zentrifugation 5 Min. bei 14.000 U/Min.

---

  14. Abnahme der oberen Phase und Zugabe von 2 VT Ethanol
-

- 
15. Inkubation für 30 Min. bei -20° C und Zentrifugation für 30 Min. bei 4° C und 14.000 U/Min.

---

  16. Waschen des Zellpellets mit 70% Ethanol und trocknen lassen bei Raumtemperatur

---

  17. Resuspension des Pellets in 100 µl Aqua bidest über Nacht unter leichtem Rühren mit 300 U/Min. bei Raumtemperatur

---

  18. Photometrische Quantifizierung der DNA (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg)

---

**Tab. 2.4: Isolation der Vektor-DNA**

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
Resuspensionspuffer, pH 8,0	Tris-HCl 50 mM EDTA 10 mM RNase A 100 µg / ml	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lyselösung	NaOH 200 mM SDS 1% (v/v)	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Neutralisationspuffer, pH 5,5	K-Acetat / HAc 3 M	
QBT Äquilibriumspuffer, pH 7,0	MOPS 50 mM NaCl 750 mM Isopropanol 15% (v/v) TritonX-100 0,15% (v/v)	Applichem, Darmstadt, Deutschland Sigma, Schnelldorf, Deutschland
QC Waschpuffer, pH 7,0	MOPS 50 mM NaCl 1 M Isopropanol 15% (v/v)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
QF Elutionspuffer, pH 8,5	Tris-HCl 50 m NaCl 1,25 M Isopropanol 15% (v/v)	Merck, Darmstadt, Deutschland

**Tab. 2.5: Lösungen für die Plasmidpräparation**

### 2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die isolierten PAC- bzw. BAC-DNA wurde anschließend in der Gelelektrophorese auf ihre Länge hin kontrolliert. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern negativ geladene Moleküle (z. B. das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA) zur Anode. Zum Vergleich wurde ein Mix aus Fragmenten bekannter Länge aufgetragen (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland).

Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller
10 x TBE-Puffer	Tris-Base 54,45 g	Merck, Darmstadt, Deutschland
	Borsäure 27,5 g	
	EDTA [0,5M] pH 8,0 20 ml A. bidest. ad 500 ml	Merck, Darmstadt, Deutschland
Agarosegel	Agarose 0,8 -1,0 g TBE-Puffer 100 ml	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
DNA-Probenpuffer	Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol 0,25 % (w/v) Ficoll 400 1,5 % (w/v)	Sigma, Schnelldorf, Deutschland
Ethidiumbromid-Färbelösung	Ethidiumbromid 1 mg/l	Sigma, Schnelldorf, Deutschland

**Tab 2.6: Zusammensetzung der Reagenzien für die Gelelektrophorese**

Es wurde eine DNA-Lösung mit einer Konzentration von ca. 100 ng/μl mit der entsprechenden Menge 5x Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V für eine Stunde. Das Gel wurde für ca. 25 Min. im Ethidiumbromid-Färbebad gefärbt und für 5 Min. in A. bidest entfärbt. Durch UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von 312 nm wurde die DNA im Gel auf einem UV-Transluminator sichtbar gemacht.



### 2.2.5 Nicktranslation von PAC- und BAC-DNA

Die Farbmarkierung der Gensonden-DNA erfolgte in dieser Arbeit enzymatisch mittels Nicktranslation mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescein-12-dUTP (FITC), Roche, Pansberg, Deutschland). Bei der Nicktranslation führt man mit Hilfe von DNase I in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  in die DNA-Einzelstrangbrüche (Nicks) ein; die exponierten Bruchstellen dienen als Ausgangspunkt für eine Reaktion, bei der die Polymerase-Aktivität der DNA-Polymerase I am 3'-Ende des Bruchs neue, markierte Nukleotide einbaut. Gleichzeitig baut sie durch ihre 5'-3'-Exonuklease-Aktivität auf der anderen Seite des Bruchs Nukleotide ab.

Es wurde ein Ansatz von 100  $\mu$ l nach dem folgenden Pipettierschema erstellt (Tab. 2.7):

Menge	Reagenz	Zusammensetzung	Hersteller
20 $\mu$ l	DNA		
10 $\mu$ l	10x Puffer	500 mM Tris-HCl pH 7,5 100 mM Magnesiumchlorid 10 mM DTT	MBI Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
3,0 $\mu$ l	dNTP-Mix	1 mM dATP, dCTP, dGTP	Pharmacia Biotech; Freiburg, Deutschland
1,0 $\mu$ l	dTTP	1 mM dTTP's	Pharmacia Biotech; Freiburg, Deutschland
2,0 $\mu$ l	Fluorescein- dUTP		Roche, Pansberg, Deutschland
2,0 $\mu$ l	DNA-Polymerase I		MBI Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland
5,0 $\mu$ l	DNase I, 1:250 verdünnt	498 $\mu$ l 1 M Tris-HCl pH 7,5 2 $\mu$ l DNase I Stock (DNase I Stock: 1 mg DNase I Lyophilisat (9000 U) in 50 % Glycerin, 20 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM $MgCl_2$ )	Merck; Darmstadt, Deutschland Boehringer; Mannheim, Deutschland
ad 100 $\mu$ l	Aqua bidest.		

Tab. 2.7: Pipettierschema für die Nicktranslation

Dieser Ansatz wurde auf Eis in Eppendorf-Gefäße pipettiert und für 120 Min. bei 15° C inkubiert. Im Anschluss wurden zur Kontrolle der Fragmentlänge 5 µl des Ansatzes in ein 1%-Agarosegel aufgetragen. Die optimale Fragmentgröße für FISH-Sonden liegt zwischen etwa 300 und 600 bp. Waren die Fragmente zu lang, wurden weitere 2 µl der DNase (1:100) eingesetzt und für weitere 15 Min. bei 15° C inkubiert. Abschließend wurden die Enzyme durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA für 10 Min. bei 65° C deaktiviert. Die Sonden wurden bei -20° C gelagert. Die Validierung der erzeugten Sonden erfolge an Metaphasepräparaten (siehe Kap. 2.2.9).

### 2.2.6 Präzipitation und Hybridisierung

Zur Vorbereitung der Zellkernobjektträger (OT) für die Hybridisierung erfolgte eine 5-7 Min. enzymatische Behandlung in 0,005% Pepsin in 0,01 N HCl bei 37° C. Im Anschluss wurden die OT in 2x SSC bei Raumtemperatur für 5 Min. gewaschen, in PBS/MgCl<sub>2</sub> fixiert und in der Folge in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und luftgetrocknet. Parallel konnte die Vorbereitung der Sonden erfolgen.

Es wurden jeweils ca. 200 ng markierter Sonden-DNA unter Zugabe von 5-10 µl humaner COT1-DNA (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) präzipitiert. Die Aufgabe der COT1-DNA bestand darin, die repetitiven Sequenzen der BAC- und PAC- DNA, welche sonst ubiquitär auf den Chromosomen hybridisieren und die exakte Messung der Fluoreszenzintensitäten der Einzelkopie-Sequenzen verhindern würde, zu binden. Nach der Präzipitation erfolgte eine Resuspendierung der DNA in 50% Formamid/10% Dextransulfat/2x SSC. Dieses Gemisch wurde auf den Objektträger aufgetragen, mit einem 22 x 22 mm Deckgläschen bedeckt und dieses mit Fixogum (Marabu, Tamm, Deutschland) versiegelt, um ein Verdampfen des Hybridisierungsgemisches zu verhindern. Nach der Codenaturierung für 5 Min. bei 80° C auf einer Heizplatte wurden die Objektträger für 16 Stunden in einer feuchten Kammer bei 37° C inkubiert.

### 2.2.7 Detektion

Nach der Hybridisierung schloss sich die Detektion an. Hier wurden die Objektträger zunächst einer Reihe von Waschvorgängen unterzogen, um den Hybridisierungsmix von den Objektträgern abzuwaschen. Die Waschschritte bestanden zunächst aus drei 5-Min.-Waschungen mit 50% Formamid/2x SSC bei 45° C und dann drei weiteren 5-Min.-Waschungen mit 0,1x SSC bei 60° C. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen vor dem Nachweis der Reportermoleküle wurden die Präparate mit 300 µl Blockierungslösung (3% BSA) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in 4x SSC und 0,1% Tween-20 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) bedeckt, mit einem 22 x 60 mm großen Deckglas versehen und bei 37° C 30 Min. lang in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach schlossen sich drei 5-Min.-Waschschritte mit 4x SSC und 0,1% Tween-20 bei 45° C an. Die Nuklei wurden mit DAPI (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gegengefärbt.

### 2.2.8 Auswertung und Bildaufnahme

Die einzelnen Fluorochrome wurden mit einem 63x- oder 100x-Objektiv nacheinander mit einem DM-RBE (Leica)-Epifluoreszenz-Mikroskop mit einer CCD-Kamera (Sensys, Photometrics, Tucson, AZ) aufgenommen und mit der FISH-Software CW-4000 (Leica, Cambridge, UK) gespeichert. Das Mikroskop war mit einem 4-Filterrad sowie hochspezifischen Filtern (Chroma Technology Corporation, Bellow Falls, VT, USA) ausgestattet, die es ermöglichten, jedes Fluorochrom mit einem separaten Anregungs-, Teilungs- und Emissionsfilter zu analysieren. Die Fluorochrome wurden als skalierbare zweidimensionale Grauwertbilder aufgenommen und diesen dann eine bestimmte Farbe zugeordnet. Auf diese Weise erhielt man eine Bildsequenz der verwendeten Fluorochrome, aus der, durch Überlagerung der Farbkanäle (Fluorochrome), ein sogenanntes Pseudofarbbild entstand.

Es wurden von jeder Hybridisierung 100 Zellkerne ausgewertet. Die Hybridisierungssignale wurden in jedem Zellkern für jede FISH DNA-Sonde getrennt ausgezählt und in eine Tabelle übertragen. Als amplifiziert wurden Zellen bezeichnet, deren Quotient aus Gen- und Zentromersignal größer 2 bestand.

### 2.2.9 Herstellung von Metaphasenpräparaten zur Validierung der Gensonden

Zur Etablierung der Gensonden wurden Voruntersuchungen an Metaphasepräparaten aus Blut-Lymphozyten eines normalen männlichen Individuums durchgeführt. Die Metaphasenpräparate wurden nach folgendem Protokoll hergestellt:

1. Zentrifugation von 10 ml Blut für 10 Min. bei 1000 U/Min., Absaugen und Verwerfen des Serums
2. Abnahme von 2 ml der verbliebenen Lymphozytenschicht (Buffy-Coat) und Hinzugabe in eine 50 ml Kulturflasche
3. Erstellung einer speziellen Nährlösung mit 500 ml RPMI-Medium 1640 (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) und 5 ml einer konzentrierten antibiotischen-antimykotischen Lösung (Antibiotic-Antimycotic 100x; Gibco, Karlsruhe, Deutschland) versetzt
4. Hinzugabe von 40 ml Nährlösung, 8 ml fetalem Rinderserum (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) und 400 µl Phytohämagglutinin (Murex Diagnostics Ltd., Dartford, England) zum Buffy-Coat in die Kulturflasche
5. Inkubation für 72 Stunden bei 37° C im Inkubator
6. Zugabe von 400 µl des Spindelgiftes Colcemid (10 µg/ml, Gibco, Karlsruhe, Deutschland) für den Mitosestop
7. Gründliches Schütteln der Flasche, Verteilen des Inhaltes auf zwei neue Kulturflaschen, Inkubation für 20 Min. bei 37° C, Zentrifugation für 10 Min. bei 1.000 U/Min.
8. Abnehmen des Überstandes bis 5 ml in der Flasche verbleiben, sorgfältiges Mischen und Zugabe von 35 ml einer auf 37° C vorgewärmten 0,4%-KCl- Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland), um die Lymphozyten zu lysieren
9. Inkubation für 15 Min. in einem 37° C warmen Wasserbad und anschließender Zentrifugation für 10 Min. bei 1.000 U/Min., Verwerfen des Überstandes bis auf einen Rest von 5 ml
10. Sorgfältiges Mischen, Fixierung mit 20 ml frischer Methanol-Eisessiglösung (3:1, Merck, Darmstadt, Deutschland)
11. Inkubation für 20 bis 30 Min. bei Raumtemperatur, Zentrifugation für 10 Min. bei 1.000 U/Min., Verwerfen des Überstandes
12. Wiederholung der Schritte 10.-11. für insgesamt 3 Mal, Überführung des verbliebenen Zellpellets in ein neues Gefäß, Lösung des Zellpellets in 4 ml der Fixierlösung
13. Auftropfen von 100 µl der Zellsuspension auf saubere, fettfreie Objektträger
14. Waschen und Dehydrierung der Objektträger in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70%,

---

85%, 99%)

---

15. Lagerung bei -20°C in 99% Ethanol oder direkter Einsatz für die FISH-Analysen

---

**Tab. 2.8: Protokoll zur Herstellung von Metaphasenpräparaten**

## 2.3 Immunzytochemie (ICC)

### 2.3.1 Einführung in die Immunzytochemie

Die Immunzytochemie ermöglicht den Nachweis von bestimmten Proteinen (Antigene) in einem Gewebsschnitt mit Hilfe von spezifischen Antikörpern (AK). Hierbei binden sog. Primär-Antikörper analog zur physiologischen Funktion der Antikörper bei der Immunabwehr an Proteine, die sich z.B. auf der Zellmembran, aber auch zytoplasmatisch oder nukleär befinden. Die Primärantikörper können je nach Herstellungsart polyklonal oder monoklonal sein.

Um den an das gesuchte Protein gebundenen mono- oder polyklonalen Antikörper sichtbar zu machen, wird ein Sekundärantikörper auf das Schnittpräparat aufgebracht, der an die Fc-Region des Primärantikörpers bindet. Der Sekundärantikörper kann je nach Nachweissystem mit verschiedenen Substanzen (z.B. Peroxidase-Enzym oder Dextran-Technik) gekoppelt werden, die dann einen zugegebenen Farbstoff chemisch umsetzen und z.B. in einen Farbniederschlag verwandeln, der im Lichtmikroskop gesehen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Dextran-Technik mit dem EnVision™ 2-Schritt-Detektionssystem (DakoCytomation, GmbH, Hamburg, Deutschland) zur Detektion des Primärantikörpers verwendet.

Bei der Dextran-Technik wird ein Sekundärantikörper verwendet, der mit einer Dextrankette konjugiert wurde. An der Dextrankette befinden sich zahlreiche kovalent gebundene Enzyme, die wiederum mit einem zugegebenen Farbstoff, in dieser Arbeit 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) Substrat-Chromogen, reagieren und einen Farbniederschlag erzeugen.

Es handelt sich um eine signalverstärkende und damit die Sensitivität der Untersuchung erhöhende Methode.

HRP = Horse radish Peroxidase (Enzym)

AP = Alkalische Phosphatase (Enzym)

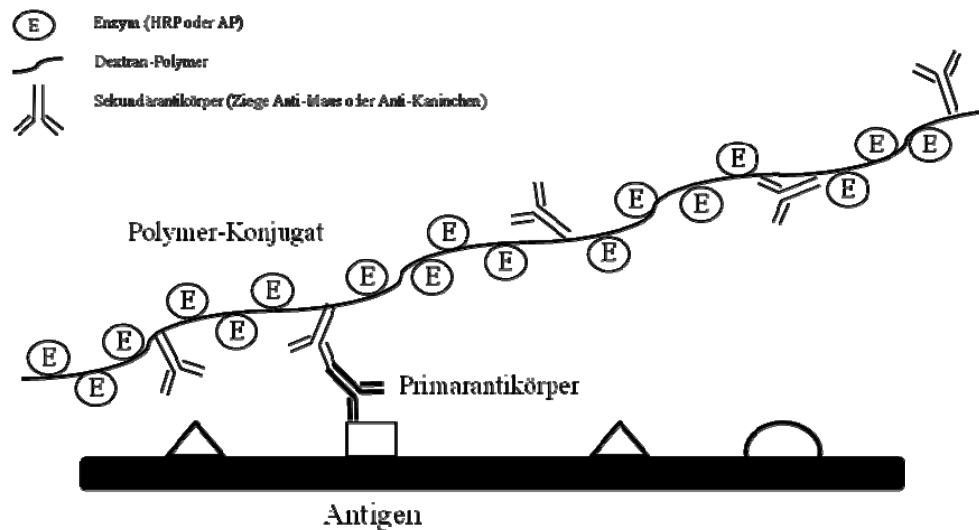


Abb. 2.3: Immunzytochemie - Dextran-Technik

Die in dieser Arbeit gesuchte Proteinstruktur war das *COX2*- bzw. das *MUC4*-Protein, die sich beide sowohl zytoplasmatisch als auch membranständig anfärben lassen.

	Primärantikörper COX2	Primärantikörper MUC4
<b>Bezeichnung</b>	COX2 Epitope Specific Rabbit Antibody, Labvision, Fremont, CA, USA	Mouse anti-MUC4, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA
<b>Klon-Name</b>	SP21	1G8
<b>Klonalität</b>	Polyklonal	Monoklonal
<b>Herkunft</b>	Kaninchen	Maus
<b>Epitop-Bindungsstelle der Antikörper</b>	C-Terminus	ASGP-2-Untereinheit
<b>Verdünnung</b>	1:100	1:100

Tab. 2.9: verwendete Primärantikörper

### 2.3.2 Immunzytochemische Färbung zum Nachweis des COX2- und MUC4- Proteins

COX2 und MUC4 wurden nach folgendem Färbeprotokoll nachgewiesen:

	<b>COX2</b>	<b>MUC4</b>
<b>Hitzevorbehandlung I</b>	Citrate Buffer Epitope, pH 6 Retrieval Method, 20 Min.	Citrate Buffer Epitope, pH 6 Retrieval Method, 20 Min.
<b>Waschen</b>	2x 5 Min. in Tris-Puffer	2x 5 Min. in Tris-Puffer
<b>Vorbehandlung II</b>	10 Min. in H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,3%	10 Min. in H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,3%
<b>Waschen</b>	2x 5 Min. in Tris-Puffer	2x 5 Min. in Tris-Puffer
<b>Primärantikörper</b>	COX2-Antikörper, 1:100, über Nacht bei 4° C	MUC4-Antikörper, 1:100, über Nacht bei 4° C
<b>Waschen</b>	2x 5 Min. in Tris-Puffer	2x 5 Min. in Tris-Puffer
<b>Sekundärantikörper</b>	EnVisionTM + HRP, Ziege Anti-Kaninchen (Fa. DAKO Deutschland GmbH, Hamburg)	EnVisionTM + HRP, Ziege Anti-Maus (Fa. DAKO Deutschland GmbH,, Hamburg)
<b>Substrat für HRP</b>	AEC Substrat-Chromogen, (Fa. DAKO Deutschland GmbH, Hamburg)	AEC Substrat-Chromogen, (Fa. DAKO Deutschland GmbH, Hamburg)
<b>Gegenfärbung</b>	Hämatoxylinlösung	Hämatoxylinlösung

Tab. 2.10: Färbeprotokoll des immunzytochemischen Nachweises des COX2- und MUC4-Proteins

### 2.3.3 Auswertung der Immunzytochemie

Für die Auswertung der immunzytochemischen Färbungen wurde das Mikroskop Axioskop der Firma Carl Zeiss (Jena) eingesetzt. Dabei wurde ein 10x-Okular und die Objektive 5x, 10x, 20x und 40x verwendet.

Die Bewertung der Färbungen erfolgte anhand der Intensität und des prozentualen Anteils der gefärbten Zellen. Die jeweilige Einteilung beruhte auf keiner bzw. einer schwachen, mäßigen oder starken Färbung, der prozentuale Anteil wurde in 10%-Schritten gewählt.

## 2.4 Semi-quantitative real-time PCR

### 2.4.1 Prinzip der semi-quantitativen real-time PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Ziel der semi-quantitativen real-time PCR (qPCR) ist die mRNA-Menge eines bestimmten Gens in Zellen nachzuweisen (Rappolee et al. 1988), (Weis et al. 1992) und beruht prinzipiell auf drei sich wiederholenden Schritten. Nach Isolation der RNA aus einer definierten Menge an Zellen wird der mRNA-Anteil in cDNA umgeschrieben. Zunächst wird im Denaturierungsschritt die Template-DNA (cDNA) auf 94° C erhitzt, sodass sich Stränge, welche sich aneinandergelagert haben, trennen. In der Annealing-Phase wird die Temperatur wieder gesenkt, um den Primern (kurze DNA-Abschnitte, welche als Start und Endpunkt der nachzuweisenden mRNA-Sequenz und als Ansatz für die Polymerase (s.u.) dienen) Gelegenheit zu geben, an die DNA zu hybridisieren. Im letzten Schritt (Elongations-Phase) wird die Temperatur wieder erhöht (auf das Temperatur-Optimum der Polymerase), um eine optimale Zweitstrangsynthese zu erlauben. Am Ende eines Zyklus (Denaturierung, Annealing und Elongation) ist die DNA-Menge verdoppelt worden. Der Zyklus wird meist zwischen 30 und 40 Mal wiederholt.

Um eine Quantifizierung vornehmen zu können, ist die Messung der neu synthetisierten DNA nötig. Hierzu wird dem Ansatz ein Fluoreszenzfarbstoff hinzugegeben, welcher mit der neu erzeugten doppelsträngigen DNA interkaliert, nach Laser-Anregung Licht der Wellenlänge 520 nm emittiert und während der Amplifikationsreaktion detektiert wird.

Nach einer bestimmten Zykluszahl der PCR übersteigt das Fluoreszenzsignal signifikant das Hintergrundrauschen und steigt exponentiell an. Die Zykluszahl, an dem der Zugewinn erstmalig über dem Hintergrundrauschen liegt, wird als „threshold“ (Schwellenwert) oder Ct-Wert bezeichnet. Der Ct-Wert ist abhängig von der Menge an Ausgangs-mRNA: Je mehr „template“-Moleküle zu Beginn der Reaktion vorliegen, desto weniger PCR-Zyklen müssen durchlaufen werden um die Menge an DNA zu amplifizieren, die zum Überschreiten der Schwellenwert-Fluoreszenz führt. Somit führt eine relativ große Menge an Ausgangs-cDNA zu einem kleinen Ct-Wert und umgekehrt. Der Ct-Wert ist damit ein indirektes, aber quantifizierbares Maß für die Menge an Ziel-cDNA und insofern auch für die ursprüngliche Menge an Ziel-mRNA. Nun werden die Ct-Werte des Zielgens mit den Ct-Werten sogenannter Referenzgene normalisiert (18S und B2M). Dies dient dazu, die mRNA-Menge des Zielgens in Relation zu einem Gen darzustellen, von dem man ausgeht, dass es



unabhängig von äußeren Einflüssen immer in gleicher Menge abgelesen wird. Mit Hilfe der Ct-Werte und der Formel  $2^{(\Delta Ct \text{ Probe A}) - (\Delta Ct \text{ Probe B})}$  lassen sich Aussagen zu der relativen mRNA-Expression in den verschiedenen Proben treffen. Ist beispielsweise der  $\Delta Ct$ -Wert der Probe A um „1“ größer als der der Probe B, bedeutet dieses, dass in Probe B doppelt so viel cDNA vorhanden ist wie in Probe A.

## 2.4.2 Durchführung der semi-quantitativen real-time PCR

### Oligonukleotid-Primer

Als Primer werden DNA-Sequenzen bezeichnet, welche den zu amplifizierenden Abschnitt auf der cDNA flankieren. Dabei werden sie so gewählt, dass sie möglichst gut das zu untersuchende Gen repräsentieren, im vorliegenden Fall die Zielgene *COX2* und *MUC4* sowie die beiden Normalisierungsgene 18S und B2M.

Die verwendeten Primer wurden Mithilfe der Software Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) entworfen und von der MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Um eine ungewollte Amplifikation von genomischer DNA in der Messung der quantitativen real-time PCR auszuschließen, welche im Rahmen des Isolationsprozesses nicht vollständig herausgewaschen werden konnte, wurden die Primer Intron-überspannend gewählt, so dass Anteile eines Primers auf einem und der Rest auf einem anderen Exon lag. Das dazwischen liegende Intron sollte dabei so lang sein, dass es bei Vorhandensein von DNA in der Elongationsphase nicht zu einer vollständigen Synthese des DNA-Strangs kommt.

Name	Sense	Exon	Sequenz	Amplikon
MUC4 E23B	For	23	5'-CATTGACTTCCTGAACAACCAG-3'	183 bp
MUC4 E24A	Rev	24	5'-GTAGCCATCGCATCTGAAGTAAG-3'	
COX2 E5B	For	5	5'-ACATGATGTTTGCATTCTTTGC-3'	221 bp
COX2 E7A	Rev	7	5'-TCTTTGACTGTGGGAGGATACAT-3'	
18S	For		5'-ACATCCAAGGAAGGCAGCAG-3'	62 bp
18	Rev		5'-TCGTCACTACCTCCCCGG-3'	
B2M	For		5'-ACCCCCACTGAAAAAGATGA-3'	114 bp
B2M	Rev		5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3'	

**Tabelle 2.11: PCR-Primer für die semi-quantitative real-time PCR**

### Messung der RNA-Qualität

Die Qualität der gesamten RNA wurde mit dem RNA 6000 nano LabChip auf einem Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers bestimmt. Es wurde nur RNA mit einer hohen Qualität (RIN 9-10) verwendet.

### cDNA-Synthese

cDNA (complementary DNA) ist eine Einzelstrang-DNA, die mittels des Enzyms Reverse Transkriptase aus mRNA synthetisiert wird.

Die cDNA-Synthese erfolgte in dieser Arbeit mit dem Superscript II Kit (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers (siehe Tab. 2.12 ). Es wurden 5 µg RNA von jeder Probe zur Umschreibung eingesetzt. Reverse Transkriptase Produkte wurden in gleiche Volumina aliquotiert und bei -20° C gelagert.

---

1.	Erhitzen der RNA für 5 Min. bei 65°C mit anschließendem Abkühlen auf Eis für mind. 5 Min.
2.	Vorbereitung des Mastermix 1: dNTPs (10mM) 1 µl x 1,1/ Probe Random Primer (3 µg/µl) 1 µl x 1,1/Probe
3.	Verdünnung von 5µg RNA mit deionisiertem, demineralisiertem und destilliertem Wasser zu einem Volumen von 16 µl
4.	Zugabe von 2µl Mastermix 1, Vortexen und Runterzentrifugation
5.	Inkubation für 5 Min. bei 65°C mit anschließendem Abkühlen auf Eis für mind. 5 Min.
6.	Vorbereitung des Mastermix 2: 5x First-Strand Buffer 4 µl x 1,1/Probe DTT (0,1M) 1 µl x 1,1/Probe RNaseOUT 1 µl x 1,1/Probe
7.	Zugabe von 6 µl Mastermix 2, mit der Pipette hoch und runter mischen
8.	Inkubation für 5 Min. bei 25° C
9.	Zugabe von 1 µl SuperScript II/ Probe
10.	Inkubation für 60 Min. bei 50° C
11.	Inkubation für 15 Min. bei 70° C
12.	Abkühlen auf Eis
13.	Zugabe von 98 µl deionisiertem, demineralisiertem und destilliertem Wasser zu einem Volumen von 125 µl (1:5-Verdünnung)

---

**Tab. 2.12: SuperScript II Kit cDNA Synthese Protokoll (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)**

### **Semi-quantitative real-time PCR**

Genspezifische Primer für *COX2* und *MUC4* wurden mit einer Schmelztemperatur von 60° C wie oben beschrieben (2.4.2.1 Oligonukleotid-Primer) entworfen. Primer für die Referenzgene B2M und 18S wurden freundlicherweise von Dr. Florian Haller (Abteilung für Pathologie, Georg-August-Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt. Die PCR wurde in 20-µl-Reaktionen in Triplikaten auf einem iCycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) mit dem QuantiTect™ SYBR® Green RT-PCR KIT (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers mit einer Konzentration von 300 nM der genspezifischen Primer durchgeführt. Das Temperaturprogramm bestand aus einer initialen Denaturierung bei 95° C zur Aktivierung der Taq-Polymerase, 40 Zyklen von 95° C für 15

Sek. und 60° C für 1 Min. sowie einer Schmelzkurvenanalyse mit einer Temperaturrampe von 60 bis 95° C mit einer Heizrate von 3°C/Min. Die PCR-Effizienz wurde mit Hilfe einer relativen Standardkurve eines cDNA-Mixes (eine zweifach Verdünnungsreihe mit sieben Messpunkten in Triplikaten) bestimmt und gab einen Regressionskoeffizienten größer 0,98 und einer Effizienz größer 95%. Die genspezifische Amplifikation wurde durch einen Einzelpeak in der Schmelzkurvenanalyse bestätigt. Negativkontrollen (PCR ohne cDNA) und genomische Kontrollen (Durchführung der cDNA Synthese ohne Reverse Transkriptase) wurden für jedes Gen zur Bestimmung von genomischen Amplifikationen und Primer-Dimerisierungen mitgeführt.

Die Normalisierung und die Berechnung der relativen Expression von *COX2* und *MUC4* erfolgten unter Einsatz der beiden Referenzgene *18S* und *B2M* nach der Formel:

Expression =  $((2^{\text{CT Gen} - \text{CT } 18\text{S}} + 2^{\text{CT Gen} - \text{CT } B2\text{M}}) / 2)^{-1}$  (Haller et al. 2004), (Pfaffl 2001).

## 3 Ergebnisse

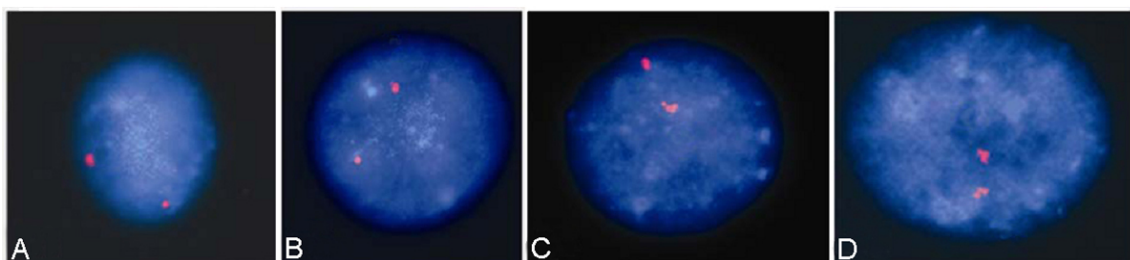
### 3.1 Ziel dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung translationaler und transkriptioneller Zusammenhänge von *COX2* und *MUC4* in neun verschiedenen Pankraskarzinom-Zelllinien. Im ersten Schritt wurde die Anzahl der Genkopien für beide Gene untersucht. Hierzu mussten zunächst die selbst synthetisierten Gensonden sowie die käuflich erworbenen Zentromersonden etabliert werden.

### 3.2 Etablierung der Zentromer- und Gensonden für die FISH

Die korrekte Bindung der käuflich erworbenen und bereits etablierten Zentromersonden 1 und 3 (CEP 1 und 3) wurde orientierend an Leukozytenzellkernpräparaten getestet (Abb. 3.1). Wie erwartet fanden sich pro Leukozytenkern fast immer zwei Signale pro Zentromersonde und es zeigte sich nach Auszählung von 100 Zellkernen in 97% eine diploide Konstellation (siehe Abb. 3.1).

Im Gegensatz zu den käuflich erworbenen und bereits häufig verwendeten Zentromersonden mussten die Kontrollen der beiden Gensonden nachhaltiger erfolgen. Hierzu wurden Metaphasepräparate von Lymphozyten angefertigt. Der Hybridisierungserfolg beider Sonden konnte dann nach Identifikation des Chromosoms nachvollzogen werden, wenn sich das Signal entsprechend am langen Arm von Chromosom 1 (*COX2*) bzw. 3 (*MUC4*) befand. Eine Kontrolle der korrekten Bindung der Gensonden erfolgte nach jeder neuen Synthese.



**Abb. 3.1:** Test der Zentromersonden auf Leukozyten-Interphasenuklei-Präparaten; Bild A und B zeigen exemplarisch diploide Leukozytenkerne für CEP 1, Bild C und D für CEP 3

### 3.3 FISH-Analysen

Nach Sicherstellung der spezifischen Bindung der Sonden wurden aus den neun Pankreaskarzinom-Zelllinien (siehe Material und Methoden) die Zellkerne isoliert und die Anzahl der Kopien des *COX2* Gens im Verhältnis zu denen von Chromosom 1 bzw. des *MUC4* Gens in Bezug auf das Chromosom 3 untersucht. Die Auswertung erfolgte dabei durch Zählen der Signale für das jeweilige Gen bzw. für das jeweilige Zentromer. Für die Auswertung mussten mindestens 100 Zellen ausgewertet werden. Die Zellkerne durften dabei weder überlappen noch das Signal abgeschwächt oder geteilt sein und es wurde die durchschnittliche Genkopienzahl pro Zelllinie gebildet (Gesamtgenkopienzahl durch ausgezählte Zellen). Rechnerisch wurden für Zellen mit einer Kopienzahl größer/ gleich 5 ein angenäherter Wert von 7 angewendet. Bei Werten über 3 wurde das Gen als amplifiziert angesehen. Zur weiteren Spezifizierung der Amplifikation wurde eine Ratio aus beiden Werten gebildet (Quotient aus Gen- durch Chromosomenkopienzahl). Hiermit konnte bei Werten über zwei die reine Genamplifikation von einer chromosomalen Amplifikation bzw. Polyploidie abgegrenzt werden.

#### 3.3.1 FISH-Auswertungen für *COX2*

Für *COX2* zeigte sich in den Zelllinien AsPc-1, Capan-2, CFPAC-1, Panc-1 und SU.86.86 eine deutlich erhöhte Kopienzahl. In den gleichen Zelllinien fand sich aber auch eine deutlich erhöhte Zahl an Zentromersignalen. Nach Ratiobildung zeigte sich demnach, dass die erhöhte Genkopienzahl nicht auf eine Genamplifikation zurückzuführen war sondern auf eine chromosomale Polyploidie (siehe Tab. 3.1 – 3.3).

COX2 Signale [%]							Durchschnittliche Genkopienzahl
Zelllinie	1	2	3	4	≥ 5	Gengesamtssignale	
VH7	0	100	0	0	0	200	2.00
AsPc-1	0	21	56	11	12	338	3.38
BxPc-3	3	73	22	1	1	226	2.26
Capan-1	2	96	2	0	0	200	2.00
Capan-2	0	2	13	74	11	416	4.16
CFPAC-1	0	1	13	61	25	460	4.60
Hs766T	1	13	86	0	0	285	2.85
MiaPaCa-2	2	18	71	7	2	293	2.93
Panc-1	0	4	77	3	16	363	3.63
SU.86.86	0	20	61	10	9	326	3.26

Tab. 3.1: COX2 Signale zu den jeweiligen Pankreaskarzinom-Zelllinien (Zur Berechnung wurden Zellen mit 5 und mehr Gensignalen mit einem Wert von 7 gewertet)

CEP 1 Signale [%]						CEP 1 Gesamtsignale
Zelllinie	1	2	3	4	≥ 5	
VH7	1	97	2	0	0	201
AsPc-1	0	25	59	5	11	324
BxPc-3	1	38	48	11	2	279
Capan-1	0	40	58	1	1	265
Capan-2	0	1	17	77	5	396
CFPAC-1	0	1	24	69	6	392
Hs766T	1	12	87	0	0	286
MiaPaCa-2	1	24	68	5	2	287
Panc-1	0	12	72	5	11	337
SU.86.86	0	17	69	6	8	321

Tab. 3.2: CEP 1 Signale in den Zelllinien

Zelllinie	COX2	CEP 1	Ratio COX2/ CEP 1
VH7	200	201	1.00
AsPc-1	338	324	1.04
BxPc-3	226	279	0.81
Capan-1	200	265	0.75
Capan-2	416	396	1.05
CFPAC-1	460	392	1.17
Hs766T	285	286	1.00
MiaPaCa-2	293	287	1.02
Panc-1	363	337	1.08
SU.86.86	326	321	1.02

Tab. 3.3: Ratio aus Gen- und Chromosomenkopienzahl

### 3.3.2 FISH-Auswertungen für *MUC4*

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich für *MUC4*. Hier fand sich ebenfalls in den Zelllinien, CFPAC-1, Panc-1 und SU.86.86 eine deutlich erhöhte Genkopienzahl. Darüber hinaus bot Capan-1 und Capan-2, nicht aber AsPc-1, BxPc3 oder Hs766T eine vermehrte Gensignanzahl. Entsprechend *COX2* war jedoch auch bei *MUC4* die vermehrte Kopienzahl durch eine chromosomale Amplifikation und nicht durch eine reine Genamplifikation verursacht (siehe Tab. 3.4 bis 3.6).

Zelllinie	<i>MUC4</i> Signale [%]					Gengesamt-signale	Durchschnittliche Genkopienzahl
	1	2	3	4	≥ 5		
VH7	1	99	0	0	0	199	1.99
AsPc-1	1	74	11	14	0	238	2.38
BxPc-3	11	82	7	0	0	196	1.96
Capan-1	0	1	5	33	61	576	5.76
Capan-2	0	12	77	8	3	308	3.08
CFPAC-1	0	3	19	73	5	390	3.90
Hs766T	6	90	1	3	0	201	2.01
MiaPaCa-2	1	12	43	40	4	342	3.42
Panc-1	3	12	46	27	12	357	3.57
SU.86.86	1	13	33	36	17	389	3.89

Tab. 3.4: *MUC4* Signale zu den jeweiligen Pankreaskarzinom-Zelllinien (Zur Berechnung wurden Zellen mit 5 und mehr Gensignalen mit einem Wert von 7 gewertet)

Zelllinie	CEP 3 Signale [%]					CEP 3 Gesamtsignale
	1	2	3	4	≥ 5	
VH7	1	99	0	0	0	199
AsPc-1	0	80	8	12	0	232
BxPc-3	5	13	76	6	0	283
Capan-1	0	2	8	44	46	526
Capan-2	0	14	75	9	2	303
CFPAC-1	0	2	13	78	7	404
Hs766T	4	95	0	1	0	198
MiaPaCa-2	1	16	77	6	0	288
Panc-1	3	11	28	44	14	383
SU.86.86	2	25	59	5	9	312

Tab. 3.5: CEP 3 Signale zu den jeweiligen Pankreaskarzinom-Zelllinien



Zelllinie	<i>MUC4</i>	CEP 3	Ratio <i>MUC4</i> / CEP 3
VH7	199	199	1.00
AsPc-1	238	232	1.03
BxPc-3	196	283	0.69
Capan-1	576	526	1.10
Capan-2	308	303	1.02
CFPAC-1	390	404	0.97
Hs766T	201	198	1.02
MiaPaCa-2	342	288	1.19
Panc-1	357	383	0.93
SU.86.86	389	312	1.25

Tab. 3.6: Ratio aus Gen- und Chromosomenkopienzahl

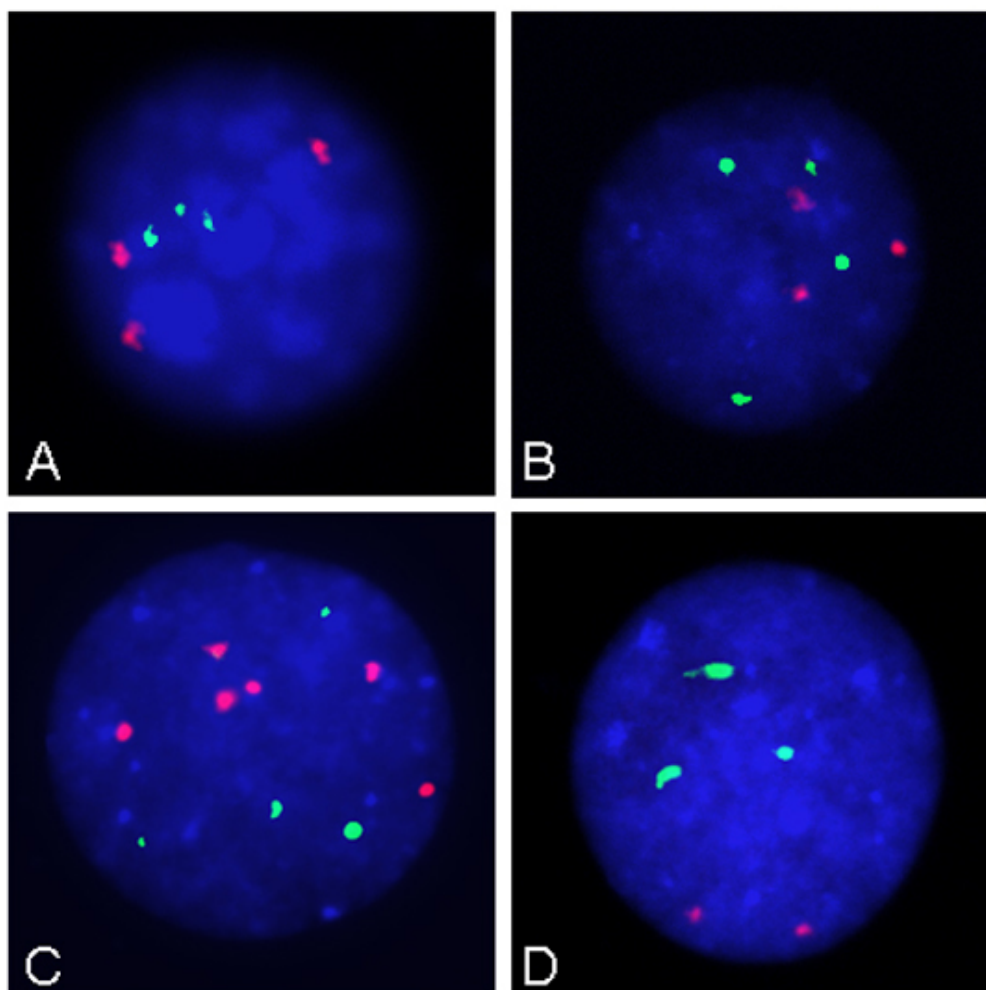
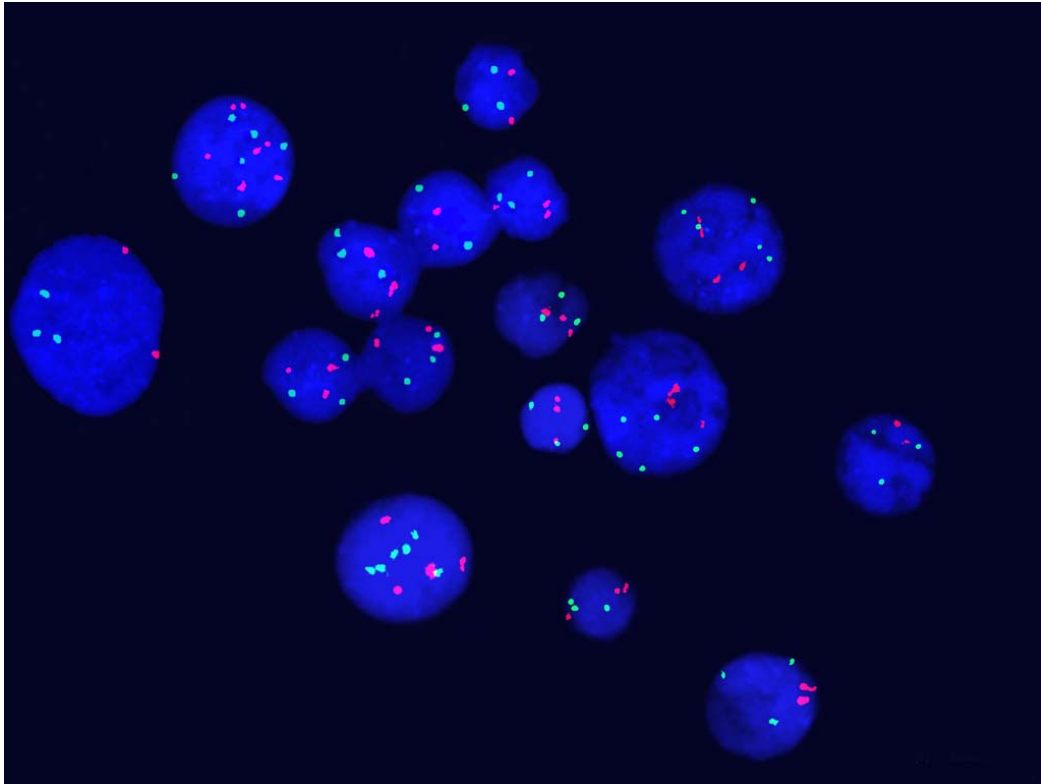


Abb. 3.2: Repräsentative Hybridisierungen der FISH-Sonden auf vier verschiedenen Kernen der Pankreaskarzinomzelllinie MiaPaCa-2: (A) Nukleus mit 3 Signalen jeweils für Chromosom 1 (rot) und *COX2* (grün), (B) 3 Signale für Chromosom 1 (rot) und 4 Signale für *COX2* (grün), (C) Nukleus mit 6 Signalen für CEP 3 (rot) und 4 Signale für *MUC4* (grün), (D) 2 Signale für Chromosom 3 (rot) und 3 Signale für *MUC4* (grün), Gegenfärbung mit DAPI



**Abb. 3.3:** Exemplarische Darstellung der Hybridisierung von *MUC4* (grün) und CEP 3 (rot) auf der Zelllinie Panc-1, Gegenfärbung mit DAPI

### 3.4 Immunzytochemie-Analysen

Die Bestimmung der Proteinexpression von *COX2* und *MUC4* in den verwendeten Zelllinien erfolgte mittels Immunzytochemie (ICC). Im Rahmen der semi-quantitativen Auswertung ist sowohl die Einschätzung der Intensität möglich, gleichzeitig kann auch die Zahl gefärbter Zellen beurteilt werden. Die Intensitäts-Einschätzung erfolgte in vier graduellen Stufen von „nicht vorhanden“ über „schwach“, „mäßig“ bis zu „stark“ (folglich als 0, 1+, 2+ und 3+ bezeichnet). Die Zahl der gefärbten Zellen wurde in prozentuaem Anteil angegeben, wobei diese in Zehnerschritten erfolgte.

Durch Multiplikation der Parameter „Anzahl positiver Zellen“ und „Färbeintensität“ wird der Remmele Score errechnet (siehe Tab. 3.9 und 3.10).

#### 3.4.1 *COX2*

Außer in MiaPaCa-2 fand sich in allen Zelllinien eine Proteinexpression von *COX2*. AsPc-1, Capan-1, CFPAC-1 und Panc-1 boten hierbei nur eine schwache Färbung, die auch nur in maximal 40% der Zellen zu finden war. Die Fibroblasten-Zelllinie VH7 sowie BxPc-3, Capan-2, Hs766T und SU.86.86 zeigten dagegen eine deutlich stärkere Expression, die auch im Großteil der Zellen zu finden war.

Zelllinie	Färbeintensität	Zahl gefärbter Zellen [%]	Remmele Score
VH7	2+	60-70%	6
AsPc-1	1+	10-20 %	1
BxPc-3	3+	75-85 %	12
Capan-1	1+	30-40 %	2
Capan-2	2+	80-90 %	8
CFPAC-1	1+	25-30 %	2
Hs766T	2+	60-70 %	6
Mia PaCa-2	0	0%	0
Panc-1	1+	5-10 %	1
SU.86.86	2+	75-85 %	8

Tab. 3.7: Auswertung der immunzytochemischen Färbungen für *COX2*

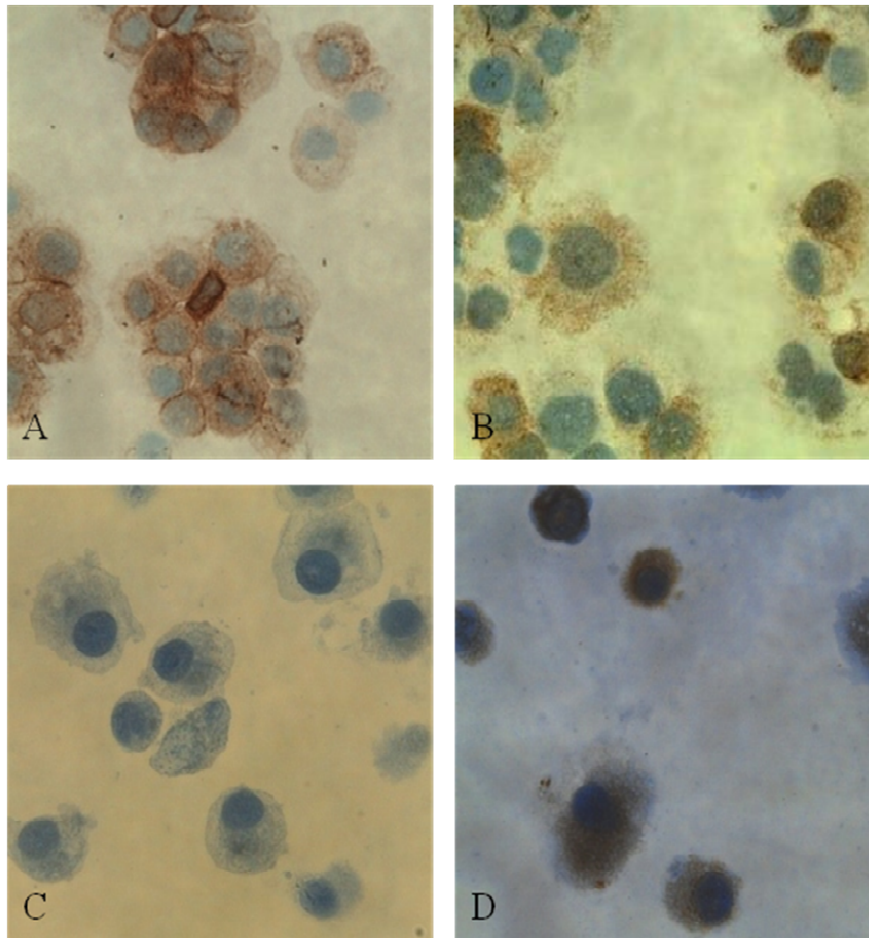


Abb. 3.4: Exemplarische immunzytochemische Färbungen für COX2 an A) Capan-1, B) CFPAC-1, C) MiaPaCa-2, D) Fibroblasten (VH7)

### 3.4.2 *MUC4*

Die immunzytochemische Untersuchung für *MUC4* in VH7, AsPc-1, Capan-2, HS766T, MiaPaCa-2 und Panc-1 fiel negativ aus, zeigte folglich keine Proteinexpression. Eine schwache Färbung ließ sich in SU.86.86 zeigen, wohingegen CFPAC-1 und BxPc-3 schon eine deutlichere Färbung aufwies, wenngleich sich diese für CFPAC-1 nur in knapp der Hälfte der Zellen nachweisen ließ. Eine extrem starke Färbung in nahezu allen Zellen zeigte sich für Capan-1 (siehe Tab. 3.8).

Zelllinie	Färbeintensität	Zahl gefärbter Zellen [%]	Remmele Score
VH7	0	0 %	0
AsPc-1	0	0 %	0
BxPc-3	2+	80-90 %	8
Capan-1	3+	90-100 %	12
Capan-2	0	0 %	0
CFPAC-1	2+	30-40 %	4
Hs766T	0	0 %	0
MiaPaCa-2	0	0 %	0
Panc-1	0	0 %	0
SU.86.86	1+	10 %	1

Tab. 3.8: Auswertung der immunzytochemischen Färbungen für *MUC4*

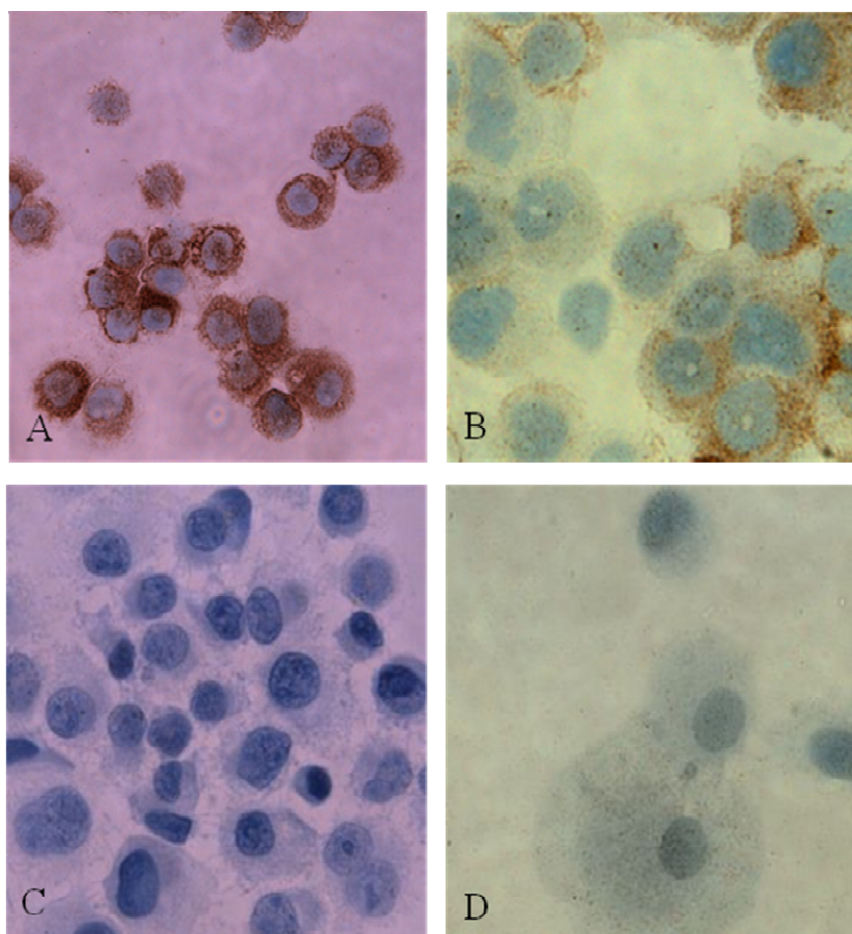


Abb. 3.5: Exemplarische immunzytochemische Färbungen für *MUC4*

A) Capan-1, B) CFPAC-1, C) Panc-1, D) Fibroblasten (VH7)

### 3.5 Semi-quantitative real-time PCR-Analysen

Die Bestimmung der transkriptionellen Aktivität der Zelllinien wurde mittels semi-quantitativer real-time PCR durchgeführt. Für die Normalisierung wurden die etablierten Housekeeping-Gene *18S* und *B2M* (Haller et al. 2004) verwendet.

Zelllinie	Threshold Cycle (Ct)			
	Mittelwert			
	18S	B2M	COX2	MUC4
Fibroblasten VH7	6.29	18.43	20.31	35.5
AsPc-1	6.22	20.2	35.75	24.13
BxPc-3	6.09	18.8	21.28	21.51
Capan-1	6.4	19.08	21.47	19.04
Capan-2	5.92	18.95	22.6	23.75
CFPAC-1	6.14	21.17	23.76	21.04
Hs766T	6.35	18.71	27.85	28.52
MiaPaCa-2	6.65	21.47	36.84	34.84
Panc-1	6.1	19.71	35.23	33.86
SU.86.86	6.27	18.63	22.66	21.57

Tab. 3.9: Threshold Cycle (Ct) Mittelwerte für 18S, B2M, COX2 und MUC4

Aus den Threshold Cycle (Ct) Mittelwerten (Tab. 3.11) wurde mittels der Formel: Expression =  $((2^{\text{CT Gen} - \text{CT } 18\text{S}} + 2^{\text{CT Gen} - \text{CT } \text{B2M}}) / 2)^{-1}$  die relative *COX2*- bzw. *MUC4*-Expression berechnet (Haller et al. 2004; Pfaffl 2001).

Zelllinie	COX2 (relative Expression)	MUC4 (relative Expression)
Fibroblasten VH7	0.0100	0.0017
AsPc-1	0.0018	0.0059
BxPc-3	0.0084	0.0082
Capan-1	0.0086	0.0125
Capan-2	0.0069	0.0059
CFPAC-1	0.0063	0.0090
Hs766T	0.0037	0.0034
MiaPaCa-2	0.0017	0.0021
Panc-1	0.0018	0.0021
SU.86.86	0.0070	0.0082

Tab. 3.10: Relative mRNA Genexpression von *COX2* und *MUC4*

Für die Pankreaskarzinom-Zelllinien BxPc-3, Capan-1, Capan-2 sowie CFPAC-1 fanden sich für die *COX2*-Expression im Vergleich zu den anderen Pankreaskarzinom-Zelllinien ein deutlich erhöhtes mRNA-Level. Mit Abstand am höchsten war die mRNA-Expression jedoch in der Fibroblastenzelllinie VH7. Umgekehrt war es für die Messung von *MUC4*, hier zeigte sich in VH7 das niedrigste Genexpressionslevel. Deutlich hohe mRNA-Konzentrationen zeigten sich hier in BxPc-3, Capan-1, CFPAC-1 und SU.86.86.

### 3.6 Vergleich der FISH-, der ICC- und der qPCR-Ergebnisse

Ziel der Arbeit war der Vergleich zwischen chromosomaler bzw. genspezifischer Kopienzahl, mRNA-Expression und immunzytochemischer Proteinexpression (siehe Tab. 3.11). Bei fehlender Amplifikation zeigte sich entsprechend keine Korrelation zu Protein- und mRNA-Expressionslevel. Auch fand sich kein Zusammenhang zwischen Genkopienzahl und Protein- bzw. mRNA-Expression. Für *COX2* zeigte sich für die neun Pankreaskarzinom-Zelllinien eine jeweils unterschiedliche mRNA-Expression, welche mit Ausnahme von CFPAC-1 und Capan-1 gut mit der Proteinexpression korrelierte.

Auch bei *MUC4* zeigte sich keine Korrelation zwischen Protein- bzw. mRNA-Expression. Interessanterweise fand sich trotz nachweisbarer mRNA-Transkription in nur drei Zelllinien eine nachweisbare Translation, welche sich bei den Zelllinien mit der höchsten mRNA-Expression nachweisen ließ. Zwar zeigte sich eine Tendenz zwischen mRNA-Expressionslevel und der Proteinexpressionsstärke, für CFPAC-1 fand sich jedoch trotz relativ hoher mRNA-Konzentration nur in einem Teil der Zellen eine Proteinexpression, die jedoch ausgesprochen stark ausfiel und somit eine mögliche Erklärung darstellt, warum nur ein verhältnismäßig geringer Anteil gefärbt worden ist.

Zelllinie	FISH		qPCR	ICC		Remmele Score
	Gen-signale	Ratio <i>COX2</i> / CEP 1	<i>COX2</i> (relative Genexpression)	Färbe- intensität	Zahl gefärbter Zellen [%]	
VH7	200	1	0.01	2+	60-70%	6
MiaPaCa-2	293	1.02	0.0017	0	0%	0
Panc-1	363	1.08	0.0018	1+	5-10%	1
AsPc-1	338	1.04	0.0018	1+	10-20%	1
Hs766T	285	1.00	0.0037	2+	60-70%	6
CFPAC-1	460	1.17	0.0063	1+	25-30%	2
Capan-2	416	1.05	0.0069	2+	80-90%	8
SU.86.86	326	1.02	0.007	2+	75-85%	8
BxPc-3	226	0.81	0.0084	3+	75-85%	12
Capan-1	200	0.75	0.0086	1+	30-40%	2

Tab. 3.11: Vergleich der FISH-, der ICC- und der qPCR-Ergebnisse für *COX2*, gelistet nach ansteigender mRNA-Expression (qPCR); VH7 ist hier als Kontrollzelllinie an erster Stelle aufgeführt

Zelllinie	FISH		qPCR	ICC		Remmele- Score
	Gen-signale	Ratio <i>MUC4</i> / CEP 3	<i>MUC4</i> (relative Genexpression)	Färbe- Intensität	Zahl gefärbter Zellen [%]	
VH7	199	1.00	0.0017	0	0 %	0
MiaPaCa-2	342	1.19	0.0021	0	0 %	0
Panc-1	357	0.93	0.0021	0	0 %	0
Hs766T	201	1.02	0.0034	0	0 %	0
Capan-2	308	1.02	0.0059	0	0 %	0
AsPc-1	238	1.03	0.0059	0	0 %	0
SU.86.86	389	1.25	0.0082	1+	10 %	1
BxPc-3	196	0.69	0.0082	2+	80-90 %	8
CFPAC-1	390	0.97	0.0090	2+	30-40 %	4
Capan-1	576	1.10	0.0125	3+	90-100 %	12

Tab. 3.12: Vergleich der FISH-, der ICC- und der qPCR-Ergebnisse für *MUC4*, gelistet nach ansteigender mRNA-Expression (qPCR); VH7 ist hier als Kontrollzelllinie an erster Stelle aufgeführt



## 4 Diskussion

Das Pankreaskarzinom zählt zu den aggressivsten soliden Tumoren des Menschen. Häufig ist bei Diagnosestellung ein operatives Vorgehen nicht mehr möglich. Somit kommt der grundlegenden Erforschung molekularer Veränderungen im Rahmen der Karzinogenese eine entscheidende Rolle zu. Zum einen trägt das bessere Verständnis der Tumorerkrankungen zu einer möglichen Identifizierung neuer Therapieansätze und -stratifizierungen bei, eröffnet aber auch mögliche Wege einer verbesserten Diagnostik oder Früherkennung. Die Bedeutung von *COX2* und *MUC4* im Rahmen der Karzinogenese oder Therapie des Pankreaskarzinoms wird bereits seit längerer Zeit diskutiert. Darüber hinaus sind *COX2* und *MUC4* als möglicher Marker für eine Früherkennung von Interesse, da sie bereits in den Vorstufen von duktalem Adenokarzinomen, den sogenannten PanINs (pancreatic intraepithelial neoplasia) überexprimiert werden (Albazaz et al. 2005; Hermanova et al. 2008; Maitra et al. 2002; Ringel und Lohr 2003; Swartz et al. 2002). Insbesondere aufgrund der für das Pankreaskarzinom bekannten Polyploidie war das Ziel der vorliegenden Arbeit die transkriptionellen und translationalen Zusammenhänge von *COX2* und *MUC4* anhand etablierter Zelllinien zu identifizieren. Zwar liegen für die Einzelkomponenten bereits Daten vor, eine zusammenhängende Analyse dieser Daten steht jedoch noch aus.

### 4.1 *COX2*-Überexpression im Pankreaskarzinom

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt neun bekannte und etablierte Pankreaskarzinom-Zelllinien verwendet. Immunzytochemisch ließen sich für *COX2* unterschiedliche Proteinexpressionswerte nachweisen, wobei HS766T, SU.86.86, BxPc-3 und Capan-2 die höchsten und MiaPaCa-2, Panc-1 und AsPc-1 die niedrigsten Werte zeigten. Diese Ergebnisse entsprechen Westernblot-Analysen von Molina et al. (Molina et al. 1999), welche ebenfalls für BxPc-3 und Capan-1 deutliche erhöhte Werte nachweisen konnten. Einen Nachweis von *COX2* in Panc-1 gelang nur in einem sehr geringen Prozentsatz der Zellen bei sehr schwacher Färbintensität. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Yip-Schneider et al., die ebenfalls mittels Westernblot-Analysen *COX2* in BxPc-3 und Capan-2 stark und AsPc-1 sowie Panc-1 nicht exprimiert sahen. Daten zu den übrigen von uns untersuchten Zelllinien liegen bisher im Vergleich nicht vor. Auch liegen bisher keine

immunzytochemischen Untersuchungen an Pankreaskarzinom-Zelllinien vor. Ein wesentlicher Vorteil der Immunzytochemie jedoch ist die relativ einfache und stabile Durchführung im Gegensatz zu beispielsweise Westernblot-Analysen. So könnten Zellen, die durch einen Bürstenabstrich aus dem Gallen- bzw. Pankreasgang gewonnen werden, untersucht werden. Hierbei weisen die Zellen häufig ausgeprägte Quetschartefakte auf, sodass ein Biomarker zur Identifizierung einer Tumorzelle von großem Vorteil wäre. Ähnliches gilt für die Einschätzung neoplastischer Zellen versus reaktiven Veränderungen. Für *COX2* zeigte sich jedoch, dass zum einen nicht alle Pankreaskarzinom-Zelllinien eine *COX2*-Überexpression aufweisen und zum anderen die als Kontrollzelllinie mitgeführte Fibroblastenzelllinie VH7 unter Zugabe von Serum ebenfalls eine deutliche Expression von *COX2* zeigt. Somit ist die immunzytochemische Färbung von *COX2* für die Früherkennung bzw. als diagnostisches Mittel nicht zuverlässig einzusetzen.

Wenngleich für die Fibroblastenzelllinie VH7 die Überexpression von *COX2* bei Serumbehandlung bekannt war (Gilroy et al. 2001), so wurde sie überwiegend als diploide Kontrollzelllinie mitgeführt, welches sich auch für das Chromosom 1 und das *COX2*-Gen zeigte. Für fünf der weiterhin untersuchten Zelllinien (Capan-2, CFPAC-1, SU.86.86, Panc-1 und AsPc-1) fand sich eine deutlich erhöhte Genkopienzahl, welche jedoch interessanterweise nicht auf einen singulären Anstieg der Genkopienzahl, sondern auf eine Polyploidie des Chromosoms zurückzuführen war. Auch bei zwei weiteren Zelllinien (Hs766T und MiaPaCa-2) fand sich eine leichte Erhöhung der Genkopienzahl, welche jedoch ebenfalls nicht als Amplifikation angesehen werden konnte. Somit ist der Grund für die vermehrte Expression primär auf translationaler Ebene zu suchen.

Mittels semi-quantitativer real-time PCR wurden die Expressionslevel für *COX2* in den neun Karzinomzelllinien erhoben. Hier zeigten sich sehr unterschiedliche Genexpressionslevel zwischen den einzelnen Zelllinien. Ähnlich wie bei den ermittelten immunzytochemischen Färbungen wurden die höchsten mRNA-Level für *COX2* in ansteigender Reihenfolge für Capan-2, SU.86.86, BxPc-3 und Capan-1, die niedrigsten für AsPc-1, MiaPaCa-2 und Panc-1 gemessen. Dies geht einher mit bereits publizierten Daten (Hasan et al. 2008; Molina et al. 1999; Okami et al. 1999; Yip-Schneider et al. 2000). So zeigte die Arbeitsgruppe um Hasan et al. erhöhte mRNA-Expressionslevel für BxPc-3 und Capan-2, wohingegen AsPc-1, MiaPaCa-2 und Panc-1 deutlich niedrigere Werte aufwiesen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Okami et al., die ebenfalls bereits die mRNA-Expressionslevel und immunhistochemische Ergebnisse verglichen.

Interessanterweise fand sich jedoch auch keine rein lineare Beziehung zwischen mRNA-Expression und Proteinexpression. So fand sich zwar in CFPAC-1 eine deutlich erhöhte mRNA Expression gegenüber HS766T, immunzytochemisch war jedoch eine deutlich verminderte Expression zu detektieren. Eine mögliche Ursache könnten hier funktionell aktive microRNAs (miRNAs) wie beispielsweise miR-101 (Strillacci et al. 2009) sein, von denen gezeigt werden konnte, dass die *COX2*-Translation direkt gehemmt wird.

Ein möglicher Kritikpunkt von *in vitro*-Untersuchungen ist stets die Vergleichbarkeit mit der *in vivo*-Situation. Hinsichtlich der Auswahl der Zelllinien ist in acht der von uns ausgewählten neun Pankreaskarzinom-Zelllinien *COX2* exprimiert. Dabei zeigten sich recht unterschiedliche Proteinexpressionslevel. Während fünf Zelllinien eine sehr deutliche Färbung in der Immunzytochemie zeigten, fiel bei drei Zelllinien eine nur sehr schwache Färbung auf. Somit entsprechen die Zelllinien der Verteilung, wie sie von Kokowa et al. beschrieben wurde, welche die differentielle Expression von *COX2* zwischen Tumor und normalem Gewebe in 56 bis 90 % der duktaalen Adenokarzinomen aufzeigten (Kokawa et al. 2001).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die hier erfassten unterschiedlichen Proteinexpressionslevel in den einzelnen Zelllinien überwiegend mit den jeweiligen mRNA-Level korrelieren. Trotz der beim Pankreaskarzinom bekannten Polyploidie sind Genamplifikationen oder Zugewinne ganzer Chromosomen nicht für die jeweilige Überexpression verantwortlich. Eine weitere Validierung von *COX2* als Pankreaskarzinommarker *in vivo* erscheint darüber hinaus auf Grund der vorliegenden Daten als nicht sinnvoll.

## 4.2 *MUC4*-Überexpression im Pankreaskarzinom

Analog zu *COX2* wurde die *MUC4*-Proteinexpression in den neun Pankreaskarzinom-Zelllinien immunzytochemisch nachgewiesen. In absteigender Intensität zeigten nur Capan-1, BxPc-3, CFPAC-1 und SU86.86 eine Färbung, wohingegen sich in AsPc-1, Capan-2, HS766T, MiaPaCa-2 und Panc-1 keine Proteinexpression nachweisen ließ.

Interessanterweise liegen bisher keine ICC-Daten zur Bestimmung der *MUC4*-Proteinexpression zu diesen neun Pankreaskarzinomzellen vor. In immunhistochemischen Untersuchungen an Gewebeschnitten von Pankreaskarzinomen zeigte sich bisher eine eher

heterogene Färbung, wenngleich *MUC4* nur in invasiven Tumoren bzw. deren Vorstufen zu finden war (Andrianifahanana et al. 2001). Somit wäre *MUC4* prinzipiell als diagnostischer Marker für Bürstensaumabstriche zu verwenden, wenngleich nur positive Färbungen ausgewertet werden dürfen, negative Ergebnisse jedoch nicht den Ausschluss eines Tumors erbringen. Eine weitere Einschränkung der Anwendbarkeit einer positiven Färbung gilt für das Vorliegen von Karzinomvorstufen, insbesondere der IPMN (Intraduktal papillär mucinöse Neoplasie) (Yonezawa et al.). Diese zeigten in den bisherigen Untersuchungen ebenfalls z. T. eine positive Anfärbung und stellen den behandelten Kliniker vor große Schwierigkeiten, da bisher kein allgemeingültiges Behandlungskonzept hinsichtlich einer Resektion oder „wait-and-see“-Strategie basierend auf der Differenzierung des Tumors vorliegt. Auf chromosomaler Ebene zeigte sich eine stark erhöhte Kopienzahl für *MUC4* in Capan-1, CFPAC-1, MiaPaca-2, Panc-1 und SU.86.86, während bei Capan-2 nur eine leichte Erhöhung zu detektieren war. Vergleichbar zu den oben aufgeführten *COX2*-Daten ist auch hier die erhöhte Genkopienzahl nicht auf eine reine Genamplifikation zurückzuführen. Die erhöhte Kopienzahl für *MUC4* lässt sich rein durch eine chromosomale Amplifikation von Chromosom 3 erklären, sodass letztlich die nachgewiesene erhöhte Proteinexpression nicht auf eine Genamplifikation zurückzuführen ist. Auch fand sich keine Korrelation zwischen Proteinexpression und Polyploidie von Chromosom 3. Ein möglicher Ansatz, die tumorspezifische *MUC4* Expression auf der Grundlage chromosomaler Veränderungen zu detektieren, ist somit nicht gegeben. Vorteilhaft wäre dies gewesen, da somit auch Zellen, die durch die Bürstenzytologie artifiziell verändert wurden und damit in der Immunzytochemie leicht falsch positive Ergebnisse zeigen, zuverlässiger hätten ausgewertet werden können.

Die mittels semi-quantitativer real-time PCR erhobenen mRNA-Expressionslevel zeigten in den neun Pankreaskarzinom-Zelllinien ein sehr heterogenes Bild. Allerdings zeigte sich auch hier die deutliche Korrelation von mRNA und Proteinexpression. Diese Beobachtungen bestätigen bereits publizierte Daten (Andrianifahanana et al. 2001; Hollingsworth et al. 1994; Ohuchida et al. 2006). So wies beispielsweise Hollingsworth et. al. eine hohe *MUC4* mRNA-Expression mittels semi-quantitativer real-time PCR in den Zelllinien BxPc-3 und Capan-1, eine mittlere Expression in Capan-2 und CFPAC-1 und eine niedrige Expression in AsPc-1 und MiaPaca-2 nach. In seinen Analysen zeigten sowohl HS766T als auch Panc-1 ebenso wie in dieser Arbeit keine *MUC4* mRNA- Expression auf.

Auffällig in diesem Zusammenhang zeigte sich erneut die Zelllinie CFPAC-1, die wie bei *COX2* einen hohen *MUC4* mRNA-Level aufwies, jedoch immunzytochemisch im Verhältnis wenig Protein exprimierte. Inwieweit auch hier die Expression durch miRNA oder andere

---

Mechanismen reguliert wird, ist unklar und kann im Rahmen dieser Arbeit letztlich nicht geklärt werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit auch für *MUC4* gezeigt werden, dass die Proteinexpression nahezu ausnahmslos mit dem jeweiligen mRNA-Level korrelierte. Wenngleich auch für *MUC4* sowie für das gesamte Chromosom 3 ein hohes Maß an Polyploidie gefunden wurde, beruht die jeweilige Expression nicht auf einer entsprechenden Amplifikation, sondern ist viel mehr auf Translationsebene zu suchen. Hinsichtlich einer klinischen Applikation wäre *MUC4* durchaus als diagnostisches Hilfsmittel geeignet, bedarf aber weiterer Untersuchungen.

## 5 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom ist durch relativ aggressive Verläufe mit frühzeitiger Metastasierung, insgesamt limitierten Behandlungsmöglichkeiten und einer schlechten Prognose gekennzeichnet, was sich auch in der niedrigen 5-Jahres-Überlebensrate niederschlägt. In den letzten Jahren ist daher eine Vielzahl verschiedener Moleküle, welche in der Zellproliferation und Tumorigenese eine Rolle spielen, auf ihren Stellenwert als Tumor- und Prognosemarker des Pankreaskarzinoms untersucht worden, jedoch ohne entscheidenden Durchbruch (Goggins et al. 2000).

Daher sind weitere Untersuchungen zum besseren Verständnis der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms von essentieller Bedeutung, um zukünftig die (Früh-)Diagnostik und Therapie bei dieser Erkrankung zu verbessern.

Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit die im Pankreas zwischen Normal- und Tumorgewebe differentiell hochregulierten Gene *COX2* und *MUC4* eingehender untersucht, die eine wichtige Rolle in der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms zu spielen scheinen (Andrianifahanana et al. 2001; Hasan et al. 2008; Saitou et al. 2005; Yip-Schneider et al. 2000).

Die tumorbiologischen Auswirkungen einer *COX2* Überexpression im Pankreaskarzinom beinhaltet die Förderung der Angiogenese, vermehrtes Zellwachstum und Zellproliferation, Inhibierung der Apoptose sowie ein erhöhtes metastatisches Potential (Chu et al. 2003; Ding et al. 2000; Eibl et al. 2003b; Kong et al. 2002).

Eine aberrante *MUC4*-Expression wurde bereits in verschiedenen Karzinomen und inflammatorischen Erkrankungen festgestellt. So konnte in vielen Studien eine Überexpression von *MUC4* im Pankreaskarzinom, jedoch nicht im Pankreasnormalgewebe nachgewiesen werden, wo es eine Rolle in der Regulierung der Differenzierung, der Proliferation, Metastasierung und Chemoresistenz in Pankreaskarzinom-Zelllinien spielt (Chaturvedi et al. 2007; Moniaux et al. 2007; Singh et al. 2007; Singh et al. 2004; Torres et al.).

Ziel dieser Arbeit war es, anhand der durchgeführten *in-vitro*-Untersuchungen an neun verschiedenen Pankreaskarzinom-Zelllinien erstmalig zu klären, ob die Überexpression von *COX2* und *MUC4* auf dem Boden einer Genamplifikation der Gene selbst begründet oder ob vielmehr die Ursache einer Überexpression auf translationaler oder transkriptionellen Ebene zu finden ist.

---

Hierzu wurden in dieser Arbeit Untersuchungen auf genomischer, transkriptioneller und translationaler Ebene durchgeführt. Die Amplifikationen wurden mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) untersucht. Die entsprechende mRNA-Expression wurde durch eine semi-quantitative real-time PCR (qPCR) bestimmt. Für die semi-quantitative Analyse der Proteinexpression wurde die Immunzytochemie (ICC) eingesetzt.

Es zeigten sich sowohl für *COX2* als auch für *MUC4*, dass es in den neun verschiedenen Pankreaskarzinom-Zelllinien zu einer unterschiedlichen Expression von *MUC4* und *COX2* kommt. Interessanterweise zeigten sich neben schwach oder gar nicht exprimierenden Zelllinien auch Fälle mit ausgeprägt starker Expression.

Die unterschiedliche Proteinexpression korrelierte mit den jeweiligen mRNA-Level. Die Hypothese, dass einer Überexpression eine Aneuploidie bzw. chromosomaler Gewinn zu Grunde liegt, konnte sowohl für *COX2* als auch für *MUC4* nicht bestätigt werden, so dass die Regulationsmechanismen der Expression für *COX2* und *MUC4* zukünftig primär auf translationaler Ebene in weiteren Studien eingehender zu erforschen ist.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahrendt SA Pitt HA (2002): "Surgical management of pancreatic cancer." *Oncology (Williston Park)* 16(6): 725-734; discussion 734, 736-728, 740, 743.
- Albazaz R, Verbeke CS, Rahman SH McMahon MJ (2005): "Cyclooxygenase-2 expression associated with severity of PanIN lesions: a possible link between chronic pancreatitis and pancreatic cancer." *Pancreatology* 5(4-5): 361-369.
- Andrianifahanana M, Moniaux N, Schmied BM, Ringel J, Friess H, Hollingsworth MA, Buchler MW, Aubert JP Batra SK (2001): "Mucin (MUC) gene expression in human pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a potential role of MUC4 as a tumor marker of diagnostic significance." *Clin Cancer Res* 7(12): 4033-4040.
- Audie JP, Janin A, Porchet N, Copin MC, Gosselin B Aubert JP (1993): "Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by in situ hybridization." *J Histochem Cytochem* 41(10): 1479-1485.
- Audie JP, Tetaert D, Pigny P, Buisine MP, Janin A, Aubert JP, Porchet N Boersma A (1995): "Mucin gene expression in the human endocervix." *Hum Reprod* 10(1): 98-102.
- Chaturvedi P, Singh AP, Moniaux N, Senapati S, Chakraborty S, Meza JL Batra SK (2007): "MUC4 mucin potentiates pancreatic tumor cell proliferation, survival, and invasive properties and interferes with its interaction to extracellular matrix proteins." *Mol Cancer Res* 5(4): 309-320.
- Chu J, Lloyd FL, Trifan OC, Knapp B Rizzo MT (2003): "Potential involvement of the cyclooxygenase-2 pathway in the regulation of tumor-associated angiogenesis and growth in pancreatic cancer." *Mol Cancer Ther* 2(1): 1-7.
- Ding XZ, Tong WG Adrian TE (2000): "Blockade of cyclooxygenase-2 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells." *Anticancer Res* 20(4): 2625-2631.
- DuBois RN (2006): "Cyclooxygenase-2 selective inhibitors and prostate cancer: what is the clinical benefit?" *J Clin Oncol* 24(18): 2691-2693.
- Eibl G, Bruemmer D, Okada Y, Duffy JP, Law RE, Reber HA Hines OJ (2003): "PGE(2) is generated by specific COX-2 activity and increases VEGF production in COX-2-expressing human pancreatic cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* 306(4): 887-897.
- Eibl G, Takata Y, Boros LG, Liu J, Okada Y, Reber HA Hines OJ (2005): "Growth stimulation of COX-2-negative pancreatic cancer by a selective COX-2 inhibitor." *Cancer Res* 65(3): 982-990.
- Gilroy DW, Saunders MA Wu KK (2001): "COX-2 expression and cell cycle progression in human fibroblasts." *Am J Physiol Cell Physiol* 281(1): C188-194.
- Goggins M, Canto M Hruban R (2000): "Can we screen high-risk individuals to detect early pancreatic carcinoma?" *J Surg Oncol* 74(4): 243-248.
- Haller F, Kulle B, Schwager S, Gunawan B, von Heydebreck A, Sultmann H Fuzesi L (2004): "Equivalence test in quantitative reverse transcription polymerase chain reaction: confirmation of reference genes suitable for normalization." *Anal Biochem* 335(1): 1-9.
- Hanisch FG, Muller S, Hassan H, Clausen H, Zachara N, Gooley AA, Paulsen H, Alving K Peter-Katalinic J (1999): "Dynamic epigenetic regulation of initial O-glycosylation by UDP-N-Acetylgalactosamine:Peptide N-acetylgalactosaminyltransferases. site-specific glycosylation of MUC1 repeat peptide influences the substrate qualities at adjacent or distant Ser/Thr positions." *J Biol Chem* 274(15): 9946-9954.



- Hasan S, Satake M, Dawson DW, Funahashi H, Angst E, Go VL, Reber HA, Hines OJ Eibl G (2008): "Expression analysis of the prostaglandin E2 production pathway in human pancreatic cancers." *Pancreas* 37(2): 121-127.
- Hermanova M, Trna J, Nenutil R, Dite P Kala Z (2008): "Expression of COX-2 is associated with accumulation of p53 in pancreatic cancer: analysis of COX-2 and p53 expression in premalignant and malignant ductal pancreatic lesions." *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20(8): 732-739.
- Hla T, Zimrin AB, Evans M, Ballas K Maciag T (1997): "The immediate-early gene product MAD-3/EDG-3/IkappaB alpha is an endogenous modulator of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) dependent human endothelial cell growth." *FEBS Lett* 414(2): 419-424.
- Hollingsworth MA, Strawhecker JM, Caffrey TC Mack DR (1994): "Expression of MUC1, MUC2, MUC3 and MUC4 mucin mRNAs in human pancreatic and intestinal tumor cell lines." *Int J Cancer* 57(2): 198-203.
- Javle M Hsueh CT (2009): "Updates in Gastrointestinal Oncology - insights from the 2008 44th annual meeting of the American Society of Clinical Oncology." *J Hematol Oncol* 2: 9.
- Jhala N, Jhala D, Vickers SM, Eltoum I, Batra SK, Manne U, Eloubeidi M, Jones JJ Grizzle WE (2006): "Biomarkers in Diagnosis of pancreatic carcinoma in fine-needle aspirates." *Am J Clin Pathol* 126(4): 572-579.
- Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA Prescott SM (1993): "Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines." *J Biol Chem* 268(12): 9049-9054.
- Kawai N, Tsujii M Tsuji S (2002): "Cyclooxygenases and colon cancer." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 187-196.
- Kloppel G (2000): "Mixed exocrine-endocrine tumors of the pancreas." *Semin Diagn Pathol* 17(2): 104-108.
- Kokawa A, Kondo H, Gotoda T, Ono H, Saito D, Nakadaira S, Kosuge T Yoshida S (2001): "Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors." *Cancer* 91(2): 333-338.
- Kong G, Kim EK, Kim WS, Lee KT, Lee YW, Lee JK, Paik SW Rhee JC (2002): "Role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in pancreatic cancer." *J Gastroenterol Hepatol* 17(8): 914-921.
- Maitra A, Ashfaq R, Gunn CR, Rahman A, Yeo CJ, Sohn TA, Cameron JL, Hruban RH Wilentz RE (2002): "Cyclooxygenase 2 expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasia: an immunohistochemical analysis with automated cellular imaging." *Am J Clin Pathol* 118(2): 194-201.
- Mall AS (2008): "Analysis of mucins: role in laboratory diagnosis." *J Clin Pathol* 61(9): 1018-1024.
- Matsubayashi H, Infante JR, Winter J, Klein AP, Schulick R, Hruban R, Visvanathan K Goggins M (2007): "Tumor COX-2 expression and prognosis of patients with resectable pancreatic cancer." *Cancer Biol Ther* 6(10): 1569-1575.
- Merati K, said Siadaty M, Andea A, Sarkar F, Ben-Josef E, Mohammad R, Philip P, Shields AF, Vaitkevicius V, Grignon DJ, et al. (2001): "Expression of inflammatory modulator COX-2 in pancreatic ductal adenocarcinoma and its relationship to pathologic and clinical parameters." *Am J Clin Oncol* 24(5): 447-452.
- Molina MA, Sitja-Arnau M, Lemoine MG, Frazier ML Sinicrope FA (1999): "Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs." *Cancer Res* 59(17): 4356-4362.

- Moniaux N, Chaturvedi P, Varshney GC, Meza JL, Rodriguez-Sierra JF, Aubert JP, Batra SK (2007): "Human MUC4 mucin induces ultra-structural changes and tumorigenicity in pancreatic cancer cells." *Br J Cancer* 97(3): 345-357.
- Murakami Y, Hirata A, Ito S, Shoji M, Tanaka S, Yasui T, Machino M, Fujisawa S (2007): "Re-evaluation of cyclooxygenase-2-inhibiting activity of vanillin and guaiacol in macrophages stimulated with lipopolysaccharide." *Anticancer Res* 27(2): 801-807.
- Ohuchida K, Mizumoto K, Yamada D, Fujii K, Ishikawa N, Konomi H, Nagai E, Yamaguchi K, Tsuneyoshi M, Tanaka M (2006): "Quantitative analysis of MUC1 and MUC5AC mRNA in pancreatic juice for preoperative diagnosis of pancreatic cancer." *Int J Cancer* 118(2): 405-411.
- Okami J, Yamamoto H, Fujiwara Y, Tsujie M, Kondo M, Noura S, Oshima S, Nagano H, Dono K, Umeshita K, et al. (1999): "Overexpression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the pancreas." *Clin Cancer Res* 5(8): 2018-2024.
- Perez-Vilar J, Hill RL (1999): "The structure and assembly of secreted mucins." *J Biol Chem* 274(45): 31751-31754.
- Pfaffl MW (2001): "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.
- Porchet N, Nguyen VC, Dufosse J, Audie JP, Guyonnet-Duperat V, Gross MS, Denis C, Degand P, Bernheim A, Aubert JP (1991): "Molecular cloning and chromosomal localization of a novel human tracheo-bronchial mucin cDNA containing tandemly repeated sequences of 48 base pairs." *Biochem Biophys Res Commun* 175(2): 414-422.
- Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z (1988): "Wound macrophages express TGF- $\alpha$  and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping." *Science* 241(4866): 708-712.
- Ringel J, Lohr M (2003): "The MUC gene family: their role in diagnosis and early detection of pancreatic cancer." *Mol Cancer* 2: 9.
- Robert-Koch-Institut, Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends, in: Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 6. überarbeitete Auflage, Robert-Koch-Institut, Berlin 2008, 38-41.
- Safi F, Schlosser W, Kolb G, Beger HG (1997): "Diagnostic value of CA 19-9 in patients with pancreatic cancer and nonspecific gastrointestinal symptoms." *J Gastrointest Surg* 1(2): 106-112.
- Saitou M, Goto M, Horinouchi M, Tamada S, Nagata K, Hamada T, Osako M, Takao S, Batra SK, Aikou T, et al. (2005): "MUC4 expression is a novel prognostic factor in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas." *J Clin Pathol* 58(8): 845-852.
- Samuelsson B (1987): "An elucidation of the arachidonic acid cascade. Discovery of prostaglandins, thromboxane and leukotrienes." *Drugs* 33 Suppl 1: 2-9.
- Shibahara H, Tamada S, Higashi M, Goto M, Batra SK, Hollingsworth MA, Imai K, Yonezawa S (2004): "MUC4 is a novel prognostic factor of intrahepatic cholangiocarcinoma-mass forming type." *Hepatology* 39(1): 220-229.
- Singh AP, Moniaux N, Chauhan SC, Meza JL, Batra SK (2004): "Inhibition of MUC4 expression suppresses pancreatic tumor cell growth and metastasis." *Cancer Res* 64(2): 622-630.
- Singh AP, Chaturvedi P, Batra SK (2007): "Emerging roles of MUC4 in cancer: a novel target for diagnosis and therapy." *Cancer Res* 67(2): 433-436.
- Smith CJ, Sun D, Hoegler C, Roth BS, Zhang X, Zhao G, Xu XB, Kobari Y, Pritchard K, Jr., Sessa WC, et al. (1996): "Reduced gene expression of vascular endothelial NO synthase and cyclooxygenase-1 in heart failure." *Circ Res* 78(1): 58-64.

- Strillacci A, Griffoni C, Sansone P, Paterini P, Piazzini G, Lazzarini G, Spisni E, Pantaleo MA, Biasco G Tomasi V (2009): "MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells." *Exp Cell Res* 315(8): 1439-1447.
- Swartz MJ, Batra SK, Varshney GC, Hollingsworth MA, Yeo CJ, Cameron JL, Wilentz RE, Hruban RH Argani P (2002): "MUC4 expression increases progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia." *Am J Clin Pathol* 117(5): 791-796.
- Tamada S, Shibahara H, Higashi M, Goto M, Batra SK, Imai K Yonezawa S (2006): "MUC4 is a novel prognostic factor of extrahepatic bile duct carcinoma." *Clin Cancer Res* 12(14 Pt 1): 4257-4264.
- Torres MP, Ponnusamy MP, Chakraborty S, Smith LM, Das S, Arafat HA Batra SK "Effects of thymoquinone in the expression of mucin 4 in pancreatic cancer cells: implications for the development of novel cancer therapies." *Mol Cancer Ther* 9(5): 1419-1431.
- Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J Willoughby DA (1994): "Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(6): 2046-2050.
- Weis JH, Tan SS, Martin BK Wittwer CT (1992): "Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR." *Trends Genet* 8(8): 263-264.
- Yip-Schneider MT, Barnard DS, Billings SD, Cheng L, Heilman DK, Lin A, Marshall SJ, Crowell PL, Marshall MS Sweeney CJ (2000): "Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas." *Carcinogenesis* 21(2): 139-146.
- Yonezawa S, Higashi M, Yamada N, Yokoyama S Goto M "Significance of mucin expression in pancreatobiliary neoplasms." *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 17(2): 108-124.

---

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. B. Michael Ghadimi für seine Unterstützung und Motivation danken. Ich habe ihn als Mentor kennen und als Freund schätzen gelernt.

Zudem möchte ich Herrn Prof. H. Becker für die Überlassung des Themas, sowie die freundliche Aufnahme in seiner Klinik danken.

Insbesondere gilt mein Dank meinem Betreuer und Freund Dr. J. Gaedcke für die vielen Diskussionen und Ratschläge. Seine Geduld und Hilfestellungen verdienen höchste Anerkennung.

Dr. M. Grade gebührt ebenso mein Dank für die große Hilfsbereitschaft und konstruktiven Diskussionen für diese Arbeit.

Bei Frau Jessica Eggert bedanke ich mich für die Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden und die gute Zusammenarbeit im Labor der Allgemein- und Viszeralchirurgie.

---

## **Lebenslauf**

Mein Name ist Yong-Jun Peter Jo und ich wurde am 31.12.1980 in Ahlen als letztes von drei Kindern der südkoreanischen Eheleute Baek-Kyu Jo und Helena Kwang-Ja Woo geboren.

Von 1987 bis 1991 besuchte ich die Kardinal-von-Galen-Grundschule in Sendenhorst und anschließend von 1991 bis 2000 das Bischöfliche Gymnasium St. Michael in Ahlen, an dem ich das Abitur ablegte.

Nach der Allgemeinen Hochschulreife absolvierte ich von 2000-2001 am Institute of Language Research and Education, Yonsei University, Seoul, Südkorea ein Koreanisch-Intensiv-Sprachprogramm.

Mein Studium der Humanmedizin begann ich zum Wintersemester 2002/ 03 an der Georg-August-Universität in Göttingen und beendete die Vorklinik im September 2004 mit dem Erwerb des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung und setzte den klinischen Teil meines Studiums in Göttingen fort.

Im Herbst 2005 begann ich mit den experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Doktorarbeit in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universität Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. M. Ghadimi.

Das Praktische Jahr begann ich mit dem ersten Tertial von August bis Dezember 2007 in der Inneren Medizin am Klinikum Bremen Mitte. Das zweite Tertial absolvierte ich von Dezember 2007 bis März 2008 in der Abteilung Allgemein- und Viszeralchirurgie, Universitätsmedizin Göttingen. Das letzte Tertial, von April bis Juli 2008, verbrachte ich in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde, Inselspital Bern, Schweiz.

Ich konnte das Studium der Humanmedizin erfolgreich im Dezember 2008 mit der Approbation zum Arzt abschließen.

---

Seit dem 01.02.2009 arbeite ich als Assistenzarzt in der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen.