

Subtraktiver Vergleich der Differenzierungsmuster menschlicher
invasiver Trophoblastzellen und maligner Choriokarzinomzellen mit Hilfe
von Choriokarzinom/Trophoblast-Hybriden

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-
Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Ulrike Schmitz geb. Backes

aus Würselen

Berichter: Privatdozent Dr. med. Hans-Georg Frank
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Klaus Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2002

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.

Meinen Eltern in Liebe und großer Dankbarkeit gewidmet

Prof. Dr. Peter Kaufmann (Institut für Anatomie II) danke ich für die wissenschaftliche Betreuung meiner Promotion und für die Hilfe und Unterstützung bei der Erstellung des Manuskripts. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die auch für einen Mikrobiologen verständliche Einführung in das Organ Plazenta bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Priv. Doz. Dr Hans-Georg Frank (Institut für Anatomie II) für die Betreuung meiner Arbeit, ohne dessen Hilfe und Anregungen diese Promotion nicht zustande gekommen wäre. Vor allem die Tatsache, daß ich jederzeit mit Problemen und Fehlschlägen, aber auch mit Erfolgen zu ihm gehen und diese mit ihm diskutieren konnte, hat mir sehr geholfen.

Prof. Dr. Klaus Wolf (Institut für Mikrobiologie) danke ich für die Übernahme des Korefferats und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Dr. Martin Zimmermann und Dr. Ralf Leuchter (Institut für Mikrobiologie) möchte ich für die Hilfe bei der Etablierung der 2-D PAGE danken.

Dr Mamed Kadyrov (Institut für Anatomie II) möchte ich für die Hilfe und Unterstützung bei der Immunhistochemie danken.

Bei Marianne von Bentheim, Barbara Ihnow, Rita Ketabchi, Evi Milz und Angela Rüben möchte ich mich für die Unterstützung bei der Arbeit mit den Zellkulturen und allen anderen im Labor anfallenden Arbeiten bedanken.

Dr. Martin Zimmermann (Institut für Mikrobiologie) danke ich für die Durchsicht des Manuskriptes und die Anregungen und Ratschläge, die er mir gab.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie II danke ich für das gute Arbeitsklima und die Anregungen für meine Arbeit, die sich aus zahlreichen Pausen- und Flurdiskussionen ergaben.

Außerdem möchte ich mich bei meinem Mann Bernhard für seine Unterstützung, sein Verständnis, wenn es mal wieder später wurde und sein geduldiges Zuhören bei allen Hochs und Tiefs während der Arbeit bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Beim Menschen sind Implantation und Plazentation invasive Vorgänge	1
1.1.1 Die menschliche Blastozyste implantiert unter Arrosion des uterinen Epithels im Stroma des Uterus	1
1.1.2 Die invasive Zellpopulation ist eine Subpopulation des Trophoblasten	2
1.1.3 Die Invasion maligner epithelialer Tumorzellen weist eine Reihe Parallelen zur Trophoblastinvasion auf	5
1.2 Was unterscheidet die physiologische Invasion des Trophoblasten von der Invasion maligner Tumorzellen?	8
1.3 Die Suche nach differentiell exprimierten Merkmalen hat wichtige Voraussetzungen	9
1.3.1 Suche nach differentiell exprimierten Merkmalen auf mRNA-Ebene	9
1.3.2 Suche nach differentiell exprimierten Merkmalen auf der Proteinebene	10
1.3.3 Wie kann Zugang zu immortalisiertem Trophoblasten gewonnen werden?	10
1.3.4 Ist der Phänotyp einer bestimmten Trophoblast-derivierten Zelllinie maligne? ..	11
1.4 Aufgabenstellung der Arbeit	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Zelllinien	13
2.2 Klonierung	13
2.3 Charakterisierung auf DNA-Ebene	13
2.3.1 Zytogenetik	13
2.3.2 DNA-Fingerabdruck	14
2.4 Charakterisierung des Phänotyps im Nacktmausexperiment	14
2.5 Charakterisierung auf mRNA-Ebene unter Einsatz von cDNA-Arrays	15
2.5.1 Anzucht der Zellen	15
2.5.2 RNA-Isolation	15
2.5.3 Herstellung der DNA-Sonden	16
2.5.4 Hybridisierung	16
2.5.5 Auswertung der Arrays	16
2.5.6 Überprüfung der Expression der identifizierten Gene	16
2.6 Charakterisierung auf Protein-Ebene mittels 2-D PAGE	17
2.6.1 Probenvorbereitung	17
2.6.2 Proteingehaltsbestimmung	17
2.6.3 Rehydratisierung der ImmobililineDryStrips	17
2.6.4 Isoelektrische Fokussierung	18
2.6.5 SDS-PAGE	19
2.6.6 Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick	20
2.6.7 Proteinidentifizierung	21
2.6.8 Überprüfung der identifizierten Proteine Annexin III und Saposin D	22
2.7 Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien und Medien	23
2.7.1 Medien für Zelllinien	23
2.7.2 Pufferlösungen	24
2.7.3 Sonstige Chemikalien	26
3. Ergebnisse	29
3.1 Klonierung	29
3.2 Charakterisierung auf DNA-Ebene	29
3.2.1 Zytogenetik	29
3.2.2 DNA-Fingerabdruck	34
3.3 Charakterisierung des Phänotyps im Nacktmausexperiment	35
3.4 Charakterisierung auf mRNA-Ebene unter Einsatz von cDNA-Arrays	38
3.4.1 Auswertung der Arrays	38
3.4.2 Überprüfung der Expression der identifizierten Gene	45
3.5 Charakterisierung auf Protein-Ebene	47

3.5.1	2-D Page.....	47
3.5.2	Proteinidentifizierung	64
3.6	Zusammenfassung der differentiell exprimierten Gene/Proteine	68
4.	Diskussion	71
4.1	Methoden zur Charakterisierung der Zelllinien - Aussagekraft und Limitationen	71
4.1.1	Herstellung und genetische Überprüfung der Klone	71
4.1.2	Analyse des Phänotypes einer Zelllinie	73
4.1.3	Suchsysteme zur Entdeckung differentiell exprimierter Merkmale	74
4.1.3.1	cDNA-Array	75
4.1.3.2	2-D PAGE.....	75
4.2	Ergebnisse der Charakterisierung.....	77
4.2.1	Tumorigenität in der Nacktmaus.....	77
4.2.2	Korrelation genotypischer Veränderungen mit dem Phänotyp der Zelllinien	77
4.2.3	Identifizierung differentiell exprimierter Gene im cDNA-Array	79
4.2.4	Identifizierung differentiell exprimierter Kandidatengene in der 2-D PAGE	81
4.2.5	Analyse der 16 differentiell exprimierten Gene.....	82
4.3	Schlußfolgerungen und Ausblick.....	92
5.	Zusammenfassung	95
6.	Literaturverzeichnis.....	97
7.	Abbildungsverzeichnis	111
8.	Tabellenverzeichnis	113
9.	Abkürzungen.....	115
10.	Anhang	117

1. Einleitung

1.1 *Beim Menschen sind Implantation und Plazentation invasive Vorgänge*

1.1.1 **Die menschliche Blastozyste implantiert unter Arrosion des uterinen Epithels im Stroma des Uterus**

Nach der Konzeption entwickelt sich bei Säugetieren über die frühen Stadien der Embryogenese die sogenannte Blastozyste. Diese bläschenförmige Struktur ist auf ihrer Außenseite durch ein einfaches epitheliales Gewebe - den Trophoblasten - begrenzt und enthält neben der inneren Blastozystenhöhle eine Ansammlung von Zellen, die als innere Zellmasse bezeichnet wird. Die innere Zellmasse wird im Laufe der späteren Entwicklung zum Embryo, bzw. Fötus und wird deshalb auch als Embryoblast bezeichnet. Der Trophoblast sind diejenigen Zellen, die den Kontakt zur Uterusschleimhaut der Mutter herstellen, die Implantation in dieses mütterliche Gewebe bewerkstelligen und auch im Laufe der späteren Plazentation das Grenzgewebe zwischen Mutter und Kind darstellen. Die Implantation selbst verläuft bei verschiedenen Säugetieren nicht einheitlich, obwohl es sich um einen ontogenetisch frühen Vorgang handelt, der eigentlich einen höheren Grad an Konservierung erwarten ließe (Übersicht bei Benirschke and Kaufmann, 2000; Leiser and Kaufmann, 1994). Zwei Grundtypen der Implantation lassen sich beobachten:

- a) Superfizielle oder appositionelle Implantation: Bei dieser Form der Implantation bleiben die Trophoblastzellen im geschlossenen Epithelverband und legen sich so auf das Uterusepithel auf, daß die apikalen Pole der Trophoblastzellen und der Uterusepithelzellen einander direkt berühren. Dieser direkte, appositionelle Epithelkontakt zeigt keinerlei echte invasive Eigenschaften des Trophoblasten. In solchen Spezies (Schaf, Rind, Schwein) gibt es zwar dann ggf. räumlich komplizierte Auffaltungen und Differenzierungen der Kontaktflächen, aber keines der beiden Epithelien verliert seine Integrität oder verändert seine Beschaffenheit wesentlich. Die aus einer solche Form der Implantation folgende Plazentationsform wird auch als epitheliochoriale Plazenta bezeichnet.
- b) Bei der interstitiellen Implantation, dem Typus der Implantation der u.a. auch beim Menschen zu finden ist, wird im Rahmen der Implantation das Uterusepithel arrodiert. Der Trophoblast verankert sich unter Zerstörung der Basalmembran des Uterusepithels im darunterliegenden Bindegewebe. Der Prozess der Arrosion und Invasion kann dabei so weit fortschreiten, daß selbst die Basalmembran lokaler Gefäße eröffnet wird und Trophoblast in direkten Kontakt zum strömenden maternalen Blut kommt. Eine solche Situation – wie sie auch beim Menschen gegeben ist – wird auch als „hämochoriale Plazentation“ bezeichnet. Je nach Grad der Aggressivität, mit dem der Trophoblast die

Blastozyste in der Uteruswand verankert hat, kann auch eine endotheliochoriale Plazentation ablaufen, bei der das Endothel mütterlicher Gefäße durch den Trophoblasten nicht eröffnet wird, der Trophoblast aber praktisch ohne zwischengeschaltetes Bindegewebe direkt basal des maternalen Gefäßendothels zu liegen kommt.

Die invasive Verankerung der Blastozyste im uterinen Stroma ist ein ungewöhnlicher Vorgang, der eine Reihe bisher ungeklärter Fragen aufwirft. So ist es ein unter physiologischen Bedingungen relativ seltener Vorgang, daß ein intaktes Epithel wie der Trophoblast seine Kontinuität aufgibt und einzelne Zellen in apikaler Richtung weg von der Basalmembran in fremde Gewebe einwandern. Obwohl gewisse Analogien bei der Wanderung z.B. der Neuralleistenderivate während der Embryogenese zu beobachten sind, kommt in der Schwangerschaft ein weiterer wichtiger Aspekt hinzu: Die invadierenden Trophoblastzellen dringen in einen fremden, allohaploiden Organismus vor. Dies wirft immunologische Fragen auf, deren Lösung bisher nicht gelungen ist (Übersicht bei Weetman, 1999).

1.1.2 Die invasive Zellpopulation ist eine Subpopulation des Trophoblasten

In Folge der interstitiellen Implantation beim Menschen differenzieren sich zwei zellbiologisch sehr unterschiedliche Strukturen an der Grenze zwischen Mutter und Kind. Auf der einen Seite entwickelt sich im direkten Blutkontakt eine epitheliale Trophoblastlage, die aus einem riesigen, einschichtigen Synzytium besteht, das durch proliferierende und fortlaufend in das Synzytium fusionierende Stammzellen unterhalten wird. Dieser Synzytiotrophoblast stellt die epitheliale Barriere zwischen Mutter und Kind dar und übernimmt mit dem Transport von Nähr- und Abfallstoffen zwischen Mutter und Kind die entscheidende Funktion der Plazenta (Huppertz *et al.*, 2001, Übersicht bei Benirschke and Kaufmann, 2000).

Auf der anderen Seite kommt es an den Stellen, an denen Trophoblastzellen in direktem Kontakt zu uterinem Bindegewebe stehen, nicht zur Bildung eines geschlossenen synzytialen Verbandes. An diesen Stellen proliferieren die trophoblastären Stammzellen ebenfalls, fusionieren aber nicht in ein Synzytium. Vielmehr formen sich dichte, mehrlagige Polster von Trophoblastzellen, die als trophoblastäre Zellsäulen bezeichnet werden. Aus den Zellsäulen heraus dringen invadierende Trophoblastzellen während der gesamten Schwangerschaft in das uterine Bindegewebe vor und können bis zum ersten Drittel des Myometriums, d.h. der muskulären Wand des Uterus eindringen.

Die Zellsäulen sind dabei nicht aus einheitlichen Trophoblastzellen zusammengesetzt. In Abhängigkeit von der Entfernung zur Basalmembran, auf der sich die proliferierenden Stammzellen befinden, läßt sich von proximal (basalmembrannah) nach distal (tief invadierte

Einzelzelle) ein typischer, inzwischen gut charakterisierter Differenzierungsgradient (s. Abbildung 1) beobachten:

Unmittelbar auf der Basalmembran, die das Zottenstroma von einer solchen Zellsäule trennt, befinden sich kräftig proliferierende Trophoblastzellen, die sich in keinem bisher bekannten Merkmal von den Trophoblastzellen des Zottenbaumes unterscheiden. Diese Zellen stellen die Stammpopulation für beide Differenzierungswege dar, den villösen zum synzytialen Zottentrophoblasten und den zum extravillösen Trophoblasten (Benirschke and Kaufmann, 2000; Frank *et al.*, 1994; Frank *et al.*, 1995; Kaufmann and Castellucc, 1997). Die Tochterzellen verlieren durch den Wachstumsdruck der basalen, proliferierenden Zellen rasch den Kontakt zur Zottenbasalmembran. Ihre Proliferationsneigung nimmt mit zunehmender Entfernung von der Basalmembran ab. Im Unterschied zum Cytotrophoblasten des Zottenbaumes fusionieren sie aber nicht synzytial (Frank *et al.*, 1994; Muhlhauser *et al.*, 1993). Ihr Phänotyp ändert sich währenddessen schrittweise vom typischen Phänotyp der undifferenzierten proliferierenden Stammzelle zu dem des invasiven Trophoblasten. Invasive extravillöse Trophoblastzellen proliferieren grundsätzlich nicht mehr (Frank *et al.*, 1994; Muhlhauser *et al.*, 1993).

Mit zunehmender Entfernung von der Basalmembran nimmt in Zellsäulen die Expression der epitheltypischen Integrine $\alpha 3\beta 1$ sowie $\alpha 6\beta 4$ ab. Diese Integrine dominieren in den proliferierenden Stammzellen. Dagegen nimmt in gleicher Richtung die Expression von bindegewebstypischen Integrinen $\alpha 5\beta 1$ sowie weiter distal auch $\alpha 1\beta 1$ zu (Aplin, 1993; Damsky *et al.*, 1992). Diese Integrine dominieren in den differenzierten Trophoblastzellen, die in größerer Entfernung von der Proliferationszone liegen.

Auch die Expression von c-erbB-1 Proteinprodukt (EGF-R), einem Marker für proliferierende Epithelzellen, nimmt vom proximalen Proliferationsort nach distal, d.h. in Invasionsrichtung, ab. Die Expression von c-erbB-2 Proteinprodukt als Differenzierungs- und Invasionsmarker nimmt in der gleichen Richtung mit zunehmender Invasionstiefe zu (Jokhi *et al.*, 1994; Muhlhauser *et al.*, 1993). Die für manche Tumorzellen als Malignitätsmarker genutzte gleichzeitige Expression der Genprodukte von c-erbB-1 und c-erbB-2 wird also bei der kontrollierten Trophoblastinvasion in normalen Schwangerschaften durch ein reziprokes Expressionsmuster abgelöst.

Für trophoblastspezifische MHC-Moleküle der Klasse I (HLA-G) ist in den proliferierenden Stammzellen nur die mRNA vorhanden, während das Protein nur in weiter distal gelegenen, invasiven extravillösen Trophoblastzellen exprimiert wird (Hunt *et al.*, 1990; Hunt and Hsi, 1990; King *et al.*, 1996). Die extravillösen Trophoblastzellen in Septen der Plazenta und in der Basalplatte sind nur als tiefer invadierte Unterpopulationen des Zellsäulen-Trophoblasten aufzufassen. Die hier beispielhaft an den Zellsäulen geschilderten Verhältnisse gelten analog

für den extravillösen Trophoblasten der Chorionplatte, der Zellinseln und des Chorion laeve (Frank *et al.*, 1994; Lang *et al.*, 1994).

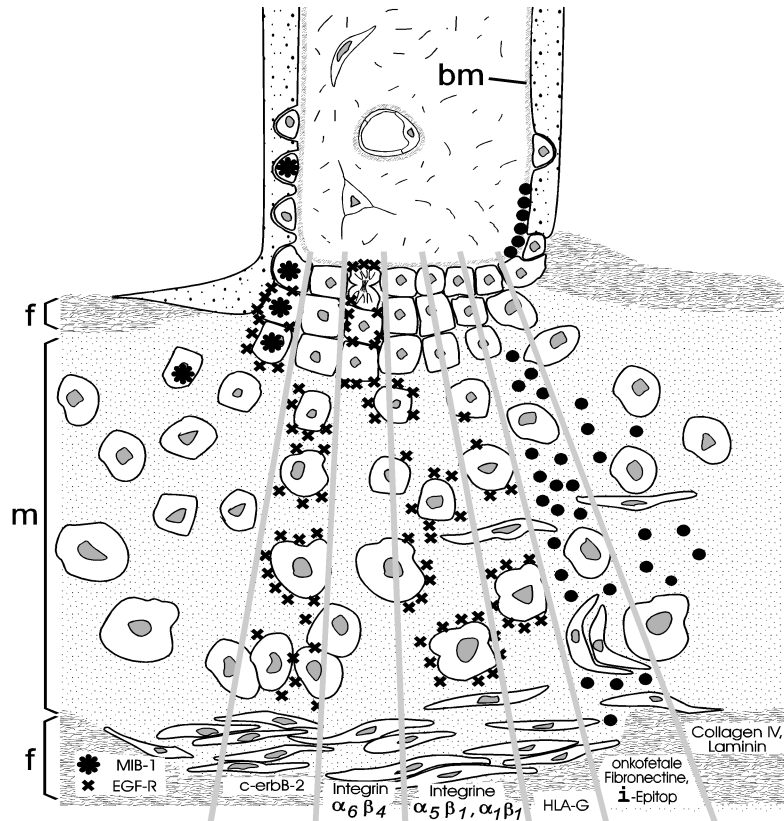


Abbildung 1: Synopsis zur Differenzierung extravillöser Trophoblastzellen. Die Abbildung zeigt eine in Segmente unterteilte trophoblastäre Zellsäule. In den Segmenten sind die wichtigsten bisher bekannten Differenzierungsmerkmale menschlicher extravillöser Trophoblastzellen dargestellt. Die Verteilung in der trophoblastären Zellsäule ist entweder durch Sterne oder durch x, bzw. • hervorgehoben. f: Fibrin-Typ Fibrinoid, m: Matrix-Typ Fibrinoid, bm: subtrophoblastäre Basalmembran.

Die invasive Potenz der Zellsäulen nimmt im Laufe der Schwangerschaft ab, geht jedoch nie ganz verloren. Es ist dabei bis heute nicht klar, ob diese Reduktion der Invasionsaktivität primär allein auf die zurückgehende Proliferation der trophoblastären Stammzellen zurückzuführen ist, oder ob die invasiven Eigenschaft der Tochterzellen auf zellulärer Basis abnehmen.

Insgesamt bleibt es bei dem biologisch interessanten Phänomen, daß die sogenannten extravillösen Trophoblastzellen des Menschen die einzige physiologisch invasive Epithelzellpopulation des Menschen ist. Außerdem können diese Zellen offensichtlich – zumindest im uterinen Milieu – der Immunüberwachung der Mutter entgehen. Jedenfalls kommt es nicht zu klinisch relevanten klassischen Abstoßungsreaktionen im Plazentabett.

Diese beiden Eigenschaften – Invasivität und immunologische Akzeptanz – haben die Trophoblastzellen mit einer großen Gruppe hochpathogener Epithelzellen – Karzinomzellen – gemeinsam.

1.1.3 Die Invasion maligner epithelialer Tumorzellen weist eine Reihe Parallelen zur Trophoblastinvasion auf

Im folgenden soll in einer kurzen Übersicht auf die wichtigsten Charakteristika der Invasion maligne entarteter Epithelzellen und auf die Gemeinsamkeiten zwischen maligner Invasion und der physiologischen Invasion der Trophoblastzellen eingegangen werden.

Der Übergang von einem Carcinoma in situ zu einem invasiven Karzinom ist dadurch gekennzeichnet, daß die Tumorzellen ihre epitheliale Basalmembran durchdringen und in das darunter liegende interstitielle Bindegewebe einwandern. Die Invasion ist ein aktiver, dynamischer Vorgang, der die Synthese und Degradation von Proteinen benötigt. So muß in einem kritischen ersten Schritt das Kollagen IV der Basalmembran degradiert werden, was die Synthese, Sekretion und Aktivierung der entsprechenden Enzyme voraussetzt. Die gerichtete Vorwärtsbewegung in das Bindegewebe wird durch Wiederholen der Sequenz – lokale Proteolyse der extrazellulären Matrix – koordiniertes und temporäres Ablösen von der umgebenden Matrix – temporäres Haften an der tiefer im Gewebe liegenden Matrix – erreicht. An dem Vorgang sind eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Komponenten der extrazellulären Matrix und vom Tumor sezernierte Faktoren beteiligt. Autokrin wirkende Wachstums – und mobilitätsstimulierende Faktoren sind dabei besonders wichtig (Liotta and Kohn, 2000).

Die erfolgreiche Invasion der Tumorzellen ist die Voraussetzung für die im zweiten Schritt erfolgenden Dissemination von Zellen in ihrem Wirtsorganismus. Die Dissemination fällt mit dem Beginn der Neovaskularisation des Tumorgewebes nicht nur zeitlich zusammen, sondern das angiogenetische Potential des Tumorgewebes bzw. das Einbrechen des Tumors in Wirtsgefäße ist eine Voraussetzung für die Metastasierung von Tumorzellen (Ahmad and Hart, 1997). Mit dem so hergestellten direkten Blutkontakt hat der Tumor erleichterten Zugang zu den wirtseigenen Transportsystemen gewonnen, die die Routen für die hämatogene Dissemination darstellen (Bohle and Kalthoff, 1999; Woodhouse *et al.*, 1997; Zetter, 1998).

Eine "erfolgreiche" Dissemination ist damit an zwei Voraussetzungen geknüpft:

- Die Fähigkeit der Tumorzellen zur Lösung aus dem Tumorverband und zum invasiven Verhalten;
- ihre Fähigkeit, Angiogenese in benachbarten Wirtsgeweben zu induzieren und/oder in benachbarte Gefäße einzubrechen.

Millionen von Tumorzellen können unter "günstigen" Voraussetzungen in die Zirkulation streuen, wobei aber nur ca. 0,01% dieser Zellen tatsächlich erfolgreich metastatische

Absiedlungen begründen; die Masse der streuenden Zellen erreicht zwar Kapillarbetten anderer Organe, geht dort aber zugrunde (Fidler and Hart, 1982; Dreau *et al.*, 1999; Liotta *et al.*, 1974).

Bei der Aktivierung eines Primärtumors zu einem metastatisch streuenden Herd spielen Zell-Matrix Interaktionen eine zentrale Rolle. Dies gilt für die Loslösung der Zellen aus dem Tumorverband, für sein invasives Verhalten sowie für die Angiogenese.

Matrixrezeptoren: Integrine $\alpha v\beta 3$, $\alpha 6$ und $\beta 1$ sind als Rezeptoren für die Glycoproteine der extrazellulären Matrix (ECM) in Zell-Matrix Interaktionen bei der metastatischen Aussaat involviert (Albelda *et al.*, 1990; Clarke *et al.*, 1997; Giancotti and Mainiero, 1994; Hall *et al.*, 1996; Haywood-Reid *et al.*, 1997; Jenq *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 1992; Potgens *et al.*, 2001). Die Integrin-Untereinheiten $\alpha 6$ und $\beta 1$ werden als Marker für metastasierende Zellen angesehen (Chan *et al.*, 1991; Friedrichs *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2001). Diese Einschätzung gilt jedoch nicht für das Integrin $\alpha 5\beta 1$, dessen Expression invers mit der metastatischen Potenz korreliert (Giancotti and Ruoslahti, 1990; Plantefaber and Hynes, 1989). Funktionell eng mit den Integrinen verknüpft ist der 67kd Lamininrezeptor (67LR) (Castronovo *et al.*, 1991; Rao *et al.*, 1989; Wewer *et al.*, 1986), der möglicherweise Interaktionen zwischen Laminin und Integrin $\alpha 6\beta 4$ stabilisiert (Ardini *et al.*, 1997). In Tumorzellen steigt die Expression dieses Rezeptors, seine Verteilung ist unorganisiert und er findet sein Zielmolekül Laminin nicht (Wewer *et al.*, 1986). In normalen Zellen wird 67LR basal in Kontakt zur Basalmembran exprimiert. Die Expression des Rezeptors wurde mit der Invasivität (Castronovo *et al.*, 1990), der klinisch schlechten Prognose (Martignone *et al.*, 1993) sowie - bei Mamma- und Colonkarzinom - dem metastatischen Potential der Tumorzellen korreliert (Castronovo *et al.*, 1992a; Cioce *et al.*, 1991; Kaipainen *et al.*, 1995; Mafune *et al.*, 1990; Ossowski and Reich, 1983; Yow *et al.*, 1988).

Glycoproteine der extrazellulären Matrix: Die ECM invasiver Epithelzellen unterscheidet sich bei physiologischen Invasionsprozessen (Trophoblastinvasion in der Schwangerschaft) wie auch bei der Tumordinvasion in zweierlei Hinsicht von der ECM der jeweiligen nicht-invasiven Ausgangszellen:

- Die räumliche Anordnung der ECM weist nicht länger eine polare Organisation auf. Statt dessen sind die betreffenden Moleküle apolar, mosaikartig um die Zellen akkumuliert (Frank *et al.*, 1994; Huppertz *et al.*, 1996; Huppertz *et al.*, 1998).
- Einige Matrix-Moleküle (z.B. Fibronektine) weisen in invasiven Geweben splice- und Glykosylierungsvarianten auf. Die funktionelle Rolle dieser Veränderungen ist unklar, wenngleich Befunde existieren, die auf eine besondere Rolle solcher Verschiebungen im Isoformen-Muster hinweisen. So wurden Galactosid-bindende Lektine beschrieben, die an poly-N-acetylgalactosamin - Ketten des Laminin (HLBP14 und HLBP31) binden (Castronovo *et al.*, 1992b; Castronovo *et al.*, 1992a; Moreau *et al.*, 1994). HLBP14 zeigt

dabei antigene - und möglicherweise strukturelle - Gemeinsamkeiten mit 67LR und die verminderte Expression von HLBP31 korrelierte mit dem metastatischen Potential von Colonkarzinomzellen.

Proteolyse und Anti-Proteolyse: Die extrazelluläre Matrix enthält matrix-spaltende Enzyme bzw. deren Proformen sowie Inhibitoren dieser Enzyme, die im normalen Gewebe homöostatisch ausbalanciert sind. In metastasierenden Tumoren überwiegen proteolytische Faktoren die Inhibitoren. Diese Dysbalance wird allerdings nicht allein durch die Tumorzellen verursacht; vielmehr sind daran auch Fibroblasten und eingewanderte Makrophagen beteiligt (Übersicht bei Price *et al.*, 1997).

Vielfach untersucht wurde der Urokinase Plasminogen-Aktivator (uPA) als Teil des Plasminogen-Aktivator Systems. Aktiver uPA und Plasmin tragen nicht nur selbst zur Degradation von Matrixmolekülen bei, sondern können zusätzlich weitere Matrixmetalloproteinasen (MMPs) aktivieren bzw. die Inhibitoren der MMPs, die Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP) deaktivieren. Hohe Konzentrationen von uPA wurden sowohl in Tumorzelllinien wie auch in Tumoren beobachtet (Billstrom *et al.*, 1995; Heiss *et al.*, 1995; Kuhn *et al.*, 1994; Castigli *et al.*, 1994; Kingdom and Kaufmann, 1997). Beim Mammakarzinom bedingt eine hohe Expression von uPA ein hohes Rezidivrisiko und eine schlechte Prognose (Duffy *et al.*, 1990). Die Produktion von uPA in ovariellen Karzinomzellen ist bis zu 38mal höher als in normalen Ovarialepithelzellen (Moser *et al.*, 1994). Im Chorioallantois-Assay wurde nachgewiesen, daß durch Injektion eines polyklonalen Anti-uPA während der Wachstumszeit des Tumors auf der Membran sowohl die Invasion des Primärtumors wie auch die metastatische Ausbreitung in den Embryo gehemmt werden können (Ossowski and Reich, 1983).

Das uPA-System ist mit dem System der MMPs und TIMPs funktionell verzahnt. MMPs sind eine Familie neutraler, Zn-abhängiger Metalloenzyme. Sie werden als Proenzyme sezerniert und liegen extrazellulär vor, wo sie proteolytisch aktivierbar sind. MMPs werden auch von gesunden Zellen sezerniert und spielen nicht nur beim pathologischen Gewebeumbau eine bedeutende Rolle (Coussens and Werb, 1996; Matrisian, 1992). Aus der großen Gruppe dieser Enzyme und Inhibitoren können hier nur wenige erwähnt werden. MMP-2 und MMP-9 sind Gelatinasen (Garbisa *et al.*, 1987; Coussens and Werb, 1996; Liotta and Stetler-Stevenson, 1990), die wegen ihrer Fähigkeit zum Abbau von Kollagen IV eine besondere Stellung bei der Metastasierung einnehmen können. Die Aktivierung dieser Enzyme kann über das Plasminogen Aktivator System oder aber durch membrangebundene Formen der Metalloproteinasen (MT-MMP) erfolgen. Der letztere Weg der Aktivierung konzentriert die katalytische Aktivität der MMPs auf die unmittelbare Nachbarschaft der Zelle. MMP-2 wird in vielen Tumortypen überexprimiert (Campo *et al.*, 1992; D'Errico *et al.*, 1991; Duffy *et al.*, 1990; Levy *et al.*, 1991; Urbanski *et al.*, 1992). MMP-9 wurde sowohl in Entzündungszellen in

Tumoren wie auch in Tumorzellen von Haut- und Bronchialtumoren beschrieben (Canete-Soler *et al.*, 1994; Pyke *et al.*, 1992).

Neben den klassischen MMPs wurden auch kombinierte Moleküle beschrieben, die sowohl eine Zellbindungsdomäne (Dysintegrindomäne) wie auch eine Metalloproteasendomäne aufweisen und i.d.R. membranständig sind. Auch Mitglieder dieser Gruppe (Akronym: ADAM; *a dysintegrin and a metalloproteinase domain*) von Molekülen werden in malignen Tumoren überexprimiert und spielen eine Rolle bei der Adhäsion von Tumorzellen (Iba *et al.*, 1999). Ein weiteres, bei Melanomen gut charakterisiertes Protein mit "Dysintegrin" Eigenschaften, ist das Protein MIA (Bosserhoff *et al.*, 1999; Dreau *et al.*, 1999).

Pathologische im Vergleich zu physiologischer Invasion: Keiner der oben erwähnten Vorgänge bzw. keine der molekularen Interaktion, zwischen Tumorzellen und ihrer Umgebung tritt nur im Rahmen der Tumorigenese auf. Invasion ist ein physiologischer Vorgang im Rahmen der Immunabwehr und der Entzündungsreaktion, bei der Embryogenese, bei der Wundheilung, beim Auswachsen von Neuriten, bei der Angiogenese sowie - in vivo nicht zuletzt, sondern eigentlich zuerst - im Rahmen von Implantation und Plazentation:

"Embryo implantation into the wall of the uterus uses the same repertoire of adhesion and proteolysis proteins used by invasive cancer cells. During placental development, trophoblasts have the ability to invade the endometrial stroma and maternal blood vessels" (Price *et al.*, 1997).

Bei so ausgeprägten molekularen Gemeinsamkeiten stellt die Fähigkeit zur Bildung eines Tumors in einem Wirtsgewebe und die Metastasierung offensichtlich wichtige Unterschiede zwischen normaler und maligner Invasion dar. Es stellt sich daher die grundsätzliche Frage, welche Kombination bekannter und möglicherweise noch unbekannter molekularer Faktoren einen Invasionsvorgang zu einem pathologischen Geschehen transformieren.

1.2 Was unterscheidet die physiologische Invasion des Trophoblasten von der Invasion maligner Tumorzellen?

Die obigen Ausführungen begründen, warum das Studium der Trophoblastinvasion ein interessantes System zur Identifikation malignitätsspezifischer Faktoren ist. Durch Subtraktion der bereits im Rahmen der physiologischen Invasion exprimierten Faktoren von solchen Faktoren, die in malignen Systemen auftreten, sollten diejenigen Moleküle zu identifizieren sein, die die Malignität eines Invasionsprozesses definieren.

Damit ist die zentrale Frage der vorliegenden Arbeit umrissen. Ziel dieser Arbeit ist es, ein System zu entwickeln, in dem solche differentiellen Fragestellungen in eng verwandten Zelllinien in vitro bearbeitet werden können. Dabei sollen auch erste Kandidatengene, welche die maligne von der physiologischen Invasion unterscheiden, identifiziert werden.

1.3 Die Suche nach differentiell exprimierten Merkmalen hat wichtige Voraussetzungen

Um eine effektive und zielgerichtete Subtraktionsstrategie umzusetzen, müssen die Zellen, deren Eigenschaften subtraktiv analysiert werden, möglichst nahe verwandt sein und sich nur in der untersuchten Eigenschaft voneinander unterscheiden. So wäre es zum Beispiel wenig sinnvoll, die Expressionsmuster invadierender Colonkarzinomzellen mit dem Expressionsmuster invadierender Trophoblastzellen zu vergleichen. Voraussichtlich würden dabei entweder trophoblastspezifische oder aber Colon-spezifische Differenzierungsmerkmale gefunden, und die möglicherweise recht wenigen malignitätsspezifischen Gene leicht übersehen.

Daher ist es erklärtes Ziel dieser Arbeit, eine Kohorte von Zelllinien zu etablieren, die sich möglichst nur in den potentiell relevanten Faktoren unterscheiden (s. unter 2.2).

Die unvorhersehbare Anzahl möglicher Kandidatengene legt es darüber hinaus nahe, die differentielle Analyse in einem solchen System sowohl auf hypothesengenerierte differentielle Ansätze als auch auf hypothesenfreie Ansätze auszurichten.

Unter hypothesengenerierten Ansätzen sind solche zu verstehen, die einen vordefinierten Satz von Faktoren oder Genen überprüfen. Dabei handelt es sich um einen Satz von Genen, der möglichst viele Faktoren aufweist, für die eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, daß sie in das maligne Geschehen (oder aber in die Kontrolle der physiologischen Invasion) verwickelt sind.

Hypothesenfreie Ansätze sind solche, die alle differentiell exprimierten Gene in einem subtraktiven Ansatz entdecken können. Ihre Grenzen sind natürlicherweise durch die Detektionsempfindlichkeit der entsprechenden Methoden gesetzt. Allein mit einem solchen System ist es jedoch möglich, völlig neue und ggf. überraschende Zusammenhänge zu entdecken.

1.3.1 Suche nach differentiell exprimierten Merkmalen auf mRNA-Ebene

Auf der mRNA-Ebene können sowohl hypothesengenerierte als auch hypothesenfreie Systeme eingesetzt werden. cDNA-Arrays können dabei so aus einer Gruppe von Genen zusammengestellt werden, daß eine Auswahl tumorrelevanter oder tumorassoziierter Gene analysiert werden kann. Alle anderen Gene bleiben zunächst unberücksichtigt.

Durch Differential Display oder subtraktive cDNA-Bibliotheken können alle differentiell transkribierten Gene identifiziert werden.

Da auf der Proteinebene (s.u.) jedoch funktionstüchtige hypothesengenerierte Verfahren nicht zur Verfügung stehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Technik des cDNA-Arrays genutzt, um auf der mRNA-Ebene nach bekannten Faktoren zu suchen, die Malignität definieren. Dabei war es von Vorteil, daß es bereits kommerziell verfügbare cDNA-Arrays gibt, die sich auf tumorrelevante Subsets von Genen konzentrieren. Mit einem solchen

Suchsystem wurden die Zelllinien untersucht und die erhaltenen differentiellen Expressionsmuster mit dem malignen oder nicht malignen Phänotyp der Zelllinien verglichen.

1.3.2 Suche nach differentiell exprimierten Merkmalen auf der Proteinebene

Neben den 6 bekannten Isoformen von HLA-G (Lata *et al.*, 1992; Moreau *et al.*, 1994; Moreau *et al.*, 1995) werden auch die Gene für Fibronektinisoformen und Laminine (Persönliche Mitteilung, Prof. John Aplin, Manchester) in verschiedenen, auch villösen Trophoblastdifferenzierungsstadien transkribiert, während die Translation der mRNA nur in wenigen extravillösen Subpopulationen abläuft. Im Trophoblasten spiegelt demnach die mRNA nicht zwangsläufig den tatsächlichen Differenzierungszustand der Zellen auf der Proteinebene wider. Dies impliziert, daß ein Zugang zur Trophoblastdifferenzierung am sichersten direkt über die Proteinebene erfolgt.

Auf der Proteinebene gab es zu Beginn der Arbeit keine hypothesengenerierten Suchsysteme. Das einzig verfügbare Verfahren für die differentielle Analyse war die 2-dimensionale Gelelektrophorese (2-D PAGE). Sie ist ein klassisches hypothesenfreies System.

Durch die Trennung der Proteine nach zwei Parametern (IEP in der ersten Dimension und MG in der zweiten Dimension) können in einem 2-D-Gel mehrere tausend Proteine aufgetrennt werden. Die erhaltenen Proteinmuster sind für z.B. eine Gewebe, eine Zelllinie oder bestimmte Wachstumsbedingungen charakteristisch. Sie können mit speziellen Auswertprogrammen erfaßt und voneinander subtrahiert werden. Differentiell exprimierte Proteine können dann aus den Gelen ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie und Datenbankrecherchen identifiziert werden. Die Methode ist limitiert durch das Auflösungsvermögen der Gele und das Sensitivität der gewählten Visualisierung, kann aber auch solche Proteine identifizieren, die bisher gar nicht im Verdacht standen, mit dem untersuchten biologischen Phänomen in Verbindung zu stehen.

1.3.3 Wie kann Zugang zu immortalisiertem Trophoblasten gewonnen werden?

Trophoblastzellen haben nach ihrer Lösung von der Basalmembran in vivo eine begrenzte Lebensspanne und werden nach relativ kurzer Zeit apoptotisch. In vitro ist es bisher nicht gelungen, Trophoblastzellkulturen ohne virale Transformation länger als 72h am Leben zu halten. Durch diese Begrenzung der Lebensdauer in vitro ist normaler Trophoblast nur sehr schwer einer eingehenden Untersuchung zugänglich.

Es ist daher eine der Aufgaben der vorliegenden Arbeit, ein Zellkultursystem zu etablieren, in dem Zellen, die die wesentlichen Eigenschaften des Trophoblast in vitro aufweisen, der Analyse zugänglich gemacht werden können. Im Gegensatz zum normalen Trophoblasten

sind seine malignen Analoga, die Choriokarzinomzellen, in vitro gut zu züchten und als immortale Zelllinien verfügbar. Sie weisen immer noch viele trophoblastäre Eigenschaften auf.

Daher lag es nahe, Kreuzungen zwischen diesen beiden Zelltypen herzustellen und die resultierenden monoklonalen Zelllinien bezüglich ihres malignen Phänotypes genau zu analysieren. Dabei wurde in unserer Arbeitsgruppe (Frank *et al.*, 2000; Funayama *et al.*, 1997; Gaus *et al.*, 1997) im Prinzip dieselbe Technik eingesetzt, die schon von Köhler und Milstein zur Herstellung monoklonaler Antikörper eingesetzt wurde (Kohler and Milstein, 1975).

Normale, aber nicht mehr proliferierende Trophoblastzellen wurden mit Choriokarzinomzellen im Rahmen einer physikochemisch durch Polyethylenglycol induzierten Fusion verschmolzen. Aus einer solchen Fusion geht zunächst ein heterogenes Gemisch von Fusionsprodukten hervor, aus dem dann durch Klonierung lebensfähige monoklonale Zelllinien isoliert werden können.

Diese Zelllinien tragen Merkmale der beiden parentalen Zelltypen in unterschiedlichem Mischungsverhältnis, weil es nach der Fusion zu einer stochastischen Reduktion des genetischen Materials in den Hybriden kommt. Auf diese Weise wird der trophoblastäre Phäno- und Genotyp einer differentiellen Analyse in einer Kohorte nahe verwandter, monoklonaler Zelllinien zugänglich.

Neben diesem Zugang zu in-vitro Modellen des menschlichen Trophoblasten ist auch verschiedentlich versucht worden, Trophoblast durch Transfektion und Transformation zu immortalisieren (Chou, 1978; Graham *et al.*, 1993; Khoo *et al.*, 1998; Shih *et al.*, 1998). Mit Ausnahme der Zelllinie HTR8, mit der nur unter S2-Bedingungen gearbeitet werden darf und die nicht allen Forschern zur Verfügung steht, ist es bisher nicht gelungen eine solche transfizierte Zelllinie über längere Zeiträume stabil zu etablieren. Keine dieser Zelllinien wurde bisher durch genetische Analyse genau charakterisiert.

1.3.4 Ist der Phänotyp einer bestimmten Trophoblast-derivierten Zelllinie maligne?

Neben den oben skizzierten differentiellen Analysetechniken muß der maligne oder nicht maligne Phänotyp einer Zelllinie in einem geeigneten Modell charakterisiert werden. Dazu wurde das klassische Nacktmausmodell eingesetzt, das als etabliertes Modell zum Nachweis der Tumorigenität akzeptiert ist (Übersicht bei Giovanella and Fogh, 1985). Der Begriff der Tumorigenität ist dabei das tierexperimentelle Analogon zur klinischen Malignität beim Menschen. Nacktmäuse sind hier Mäuse des Genotyps (HAN:NMRI nu-/nu-). Dieser ektodermale Gendefekt führt neben Veränderungen in der Haut (Fehlen der Haarfollikel) zu der Abwesenheit funktionstüchtiger T-Lymphozyten. Der schwere immunologische Defekt zwingt zur Tierhaltung in speziellen, keimarmen Tierställen. Allerdings sind die Tiere auch

nicht zur Abstoßung fremden Gewebes imstande. Diese speziellen Umstände erlauben den Test von Zellpräparationen und Zelllinien *in vivo*. In der Regel werden die Zellen durch Injektion subkutan oder intraperitoneal appliziert und dann abgewartet, ob sie imstande sind, in dem Wirtsgewebe einen Tumor zu bilden. Neben der Wartezeit, die verstreicht, bis ein Tumor makroskopisch nachweisbar ist, sind die Anzahl der nachweisbaren Tumore und auch die Größe der Tumoren ein wichtiges Kriterium bei der Auswertung solcher Experimente. Auf der Basis der Ergebnisse dieser Tierversuche kann dann eine differentielle Analyse der erhobenen mRNA-spezifischen bzw. Protein-spezifischen Musteranalysen erfolgen.

1.4 Aufgabenstellung der Arbeit

Im Rahmen des hier vorgelegten Projektes sollten aus der bereits vorliegenden polyklonalen Hybridpopulation ACH1P Einzelzellklone isoliert werden. Mit diesen monoklonalen Zelllinien sollte dann untersucht werden, welche Faktoren die maligne Invasion von Tumorzellen von der physiologischen Invasion der extravillösen Trophoblastzellen unterscheidet. Am Ende der Arbeit sollten in diesem Zusammenhang differentiell exprimierte Gene identifiziert worden sein, die positiv oder negativ mit Tumorigenität korrelieren und als Kandidaten für weitere Untersuchungen verwendet werden können.

Zu diesem Zweck sollten einige der monoklonalen Zelllinien zuerst genotypisch charakterisiert werden um ihre klonale Identität zu verifizieren.

Die Tumorigenität dieser Zelllinien sollte dann im Nacktmausexperiment bestimmt werden.

Anschließend sollten unterschiedlich tumorigene Zelllinien in cDNA-Array und 2-D-Gelen miteinander verglichen werden, um durch diese beiden Methoden differentiell exprimierte Gene zu identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1 Zelllinien

Die Zelllinie JEG-3 ist eine humane, adhären wachsende Choriokarzinomzelllinie, die von Kohler und Bridson (Kohler and Bridson, 1971) isoliert wurde. Sie verursacht in Nacktmäusen Tumoren, die histologisch einem Choriokarzinom vergleichbar sind (Grümmer *et al.*, 1999). Zur Erzeugung von HGPRT-negativen Mutanten wurde diese Zelllinie mit einem chemischen Mutagen behandelt, HGPRT negative Klone isoliert und einer der Klone mit der Bezeichnung AC1-1 im Rahmen dieser Studie verwendet (Funayama *et al.*, 1997). Die Zelllinie AC1-1 wurde mit extravillösen Trophoblastzellen aus dem Chorion laeve (Gaus *et al.*, 1997) fusioniert (für Details s. Frank *et al.*, 2000) unter Adaptation des Protokolls von (Kohler and Milstein, 1975).

2.2 Klonierung

Für die Klonierung der polyklonalen Zelllinie ACH1P werden die Zellen dünn (ca. 2×10^4 Zellen/Schale) in zellkulturgeeigneten Petrischalen (Greiner) mit einem Durchmesser von 6cm in Selektionsmedium ausgesät. Am nächsten Tag werden die Zellen in den Schalen mit HBSS (s. Tabelle 7) gewaschen, eine Minute mit Trypsin10x/HBSS 1:1 bei RT inkubiert, der Überstand dekantiert und dann noch weitere fünf Minuten in dem verbliebenen Flüssigkeitsfilm bei 37°C inkubiert. Danach werden 100µl Kulturmedium in die Schale gegeben. Die Zellen sind nun vom Boden der Schale abgelöst, schwimmen aber nicht frei umher. Nun wird eine Zelle unter mikroskopischer Kontrolle mit einer von Hand am Bunsenbrenner dünn ausgezogenen, mit HBSS gefüllten Kapillare aufgenommen und in einen mit 100µl Selektionsmedium gefüllten Napf einer 96 well Mikrotiterplatte überführt. Die erste mikroskopische Kontrolle der Platten erfolgt eine Woche nach Aussaat der Zellen.

2.3 Charakterisierung auf DNA-Ebene

2.3.1 Zytogenetik

Diese Experimente werden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Füzesi (Institut für Pathologie der RWTH; seit 1999 am Zentrum Pathologie der Georg August Universität Göttingen) durchgeführt.

Die Karyogramme der monoklonalen Zelllinien AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59, AC-1M81 und AC-1M88 wurden mittels Giemsa-Färbung bestimmt. Dazu werden die Zellen durch Behandlung mit 25ng/ml Colchizin im Kulturmedium für zwei bis drei Stunden in der Metaphase arretiert. Danach werden die Zellen mit HBSS gewaschen und durch Inkubation

mit 0,5% Trypsin/EDTA-Lösung für 5' bei 37°C vom Flaschenboden gelöst. Nach Aufnahme der Zellen in Kulturmedium und sorgfältiger Suspension werden sie bei 200xg, 5', RT pelletiert. Der Überstand wird danach dekantiert, die Zellen in hypotoner KCl-Lösung (0,075M) resuspendiert und 30' bei RT gequollen. Anschließend werden die Zellen 10' bei 200xg und RT zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in Methanol/Eisessig (3:1) fixiert. Am nächsten Tag werden die fixierten Zellen auf mit Wasser befeuchtete Objektträger getropft und luftgetrocknet. Die Giemsa-Färbung wird nach dem Protokoll von (Traut, 1991) durchgeführt.

Von jeder Zelllinie werden mehr als 20 Metaphasen nach den Standards des International Standing Committee on Cytogenetic Nomenclature (Mitelman, 1995) ausgewertet. In den Karyogrammen werden die Abweichungen in der Zahl der Gonosomen angegeben im Bezug auf die Addition eines normalen männlichen Karyotyps (xy) zu AC1-1 durch die Fusion und dem gonosomalen Karyotyp von AC1-1 add(X)(q26),-Y.

2.3.2 DNA-Fingerabdruck

Die genomische DNA wird mit dem Blood and Cell Culture DNA Mini Kit von Qiagen aus den Zellen isoliert. Je Säule werden ca. 2×10^6 Zellen eingesetzt.

Nach der Isolation wird die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt und 20µg DNA mit 2u/µg *HinfI* über Nacht bei 37°C geschnitten. Die DNA wird mit 0,8M LiCl und dem 2,5fachen Volumen Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 20µl 10mM Tris/HCl pH 8,0 eine Stunde bei 56°C resuspendiert (Sambrook *et al.*, 1989).

Die DNA-Fragmente werden auf einem 20x20cm großen 0,6% Agarosegel 18h bei 50V in TAE (s. Tabelle 8) getrennt. Die DNA wird im Gel 2x30' bei RT mit Denaturierungspuffer (s. Tabelle 8) denaturiert. Dann wird das Gel 2x30' bei RT mit Neutralisierungspuffer (s. Tabelle 8) neutralisiert und 20' in 10xSSC (s. Tabelle 8) äquilibriert. Die DNA wird dann 20 Stunden bei 4°C in 10xSSC auf eine Nylonmembran geblottet. Die Membran wird getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (120mJ) auf der Membran fixiert.

Der Blot wird mit der Sonde 33.15 (Jeffreys *et al.*, 1985) nach den Angaben des Herstellers (Cellmark Diagnostics, Abingdon, UK) inkubiert. Für die Detektion wird Lumiphos® als Substrat verwendet. Der Blot wird dann vier bzw. 16 Stunden auf einen Röntgenfilm bei 30°C exponiert.

2.4 Charakterisierung des Phänotyps im Nacktmausexperiment

Diese Experimente werden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Winterhager (Institut für Anatomie der Universität Essen) durchgeführt. Alle Tierexperimente mit Mäusen werden in den Versuchstiereinrichtungen der Essener Universität durchgeführt. Die Mäuse werden in Gruppen zu je fünf Tieren zusammen gehalten. Einstreu und Futter werden zur

Verringerung der Infektionsgefahr sterilisiert. Am ersten Versuchstag erhält jedes Tier zwei subcutane Injektionen in die Flanken. Jede Injektion enthält 10^6 Zellen in einem Volumen von 200 μ l. Jedem Tier wird in die linke Flanke die Zelllinie AC1-1 injiziert. In die rechte Flanke erhalten jeweils fünf Tiere eine Injektion mit den Zelllinien JEG-3, AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59, AC-1M81 und AC-1M88.

Die zur Injektion vorgesehenen Zellen werden am Tag des Tierversuches trypsinisiert (s. auch 2.3.1). Nach der Behandlung mit Trypsin werden die Zellen mit Kulturmedium aus der Flasche gespült und bei 200xg, 5' pelletiert. Die Zellen werden auf 1×10^6 Zellen/200 μ l in HBSS resuspendiert.

Alle drei bis vier Tage wird dann überprüft, ob sich ein Tumor gebildet hat. Dabei wird auch die Größe der Tumoren protokolliert. Hat der Tumor einen Durchmesser von mehreren Zentimetern erreicht, werden die Tiere nach Etherbetäubung durch Genickbruch getötet, der Tumor entnommen, in 4% neutral gepuffertem Formaldehyd fixiert, in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Paraffin eingebettet. Alle Tiere werden spätestens drei Monate nach Versuchsbeginn getötet.

2.5 Charakterisierung auf mRNA-Ebene unter Einsatz von cDNA-Arrays

2.5.1 Anzucht der Zellen

1×10^6 Zellen werden in eine große (75 cm²) Zellkulturflasche ausgesät, nach 24 Stunden gewaschen, mit frischem Medium versorgt und dann 48 Stunden im geschlossenen Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 5% O₂ inkubiert.

Danach werden die Zellen in der Flasche zweimal mit 10ml eiskaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber vom Boden der Flasche abgelöst und zentrifugiert bei 450xg, 5', 4°C. Die Zellen werden in 2ml eiskaltem PBS resuspendiert, in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und bei 3000 rpm, 3' pelletiert. Der Überstand wird vollständig entfernt und entweder sofort die RNA aus den Zellen isoliert oder die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –70°C gelagert.

2.5.2 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA erfolgt nach dem Protokoll von (Chomczynski and Sacchi, 1987). Je Zelllinie werden 1×10^7 Zellen eingesetzt.

Die Konzentration der RNA wird photometrisch bestimmt und die Qualität der RNA auf einem 1% denaturierendem Agarosegel überprüft (Sambrook *et al.*, 1989).

Die RNA wird dann mit RNase freier DNase behandelt, das Protein durch Phenol/Chloroform Extraktion entfernt, die RNA gefällt und in dest. Wasser auf ca. 1 μ g/ μ l resuspendiert (s. Clontech User Manual PT3231-1). Danach wird noch einmal die RNA-Konzentration bestimmt und die Qualität der RNA überprüft.

Anschließend wird die mRNA mit dem Oligotex mRNA Mini Kit von Qiagen aus der Gesamt-RNA extrahiert.

2.5.3 Herstellung der DNA-Sonden

Die RNA wird mit sequenzspezifischen Primern in der Gegenwart von [α - 32 P]dATP revers transkribiert. Zur Entfernung der überschüssigen radioaktiven Nukleotide werden die Proben durch Gelfiltration gereinigt. Die Aktivität der gesammelten Fraktionen wird anschließend im Scintillationszähler nach der Methode von Cerenkov im Tritiumkanal gemessen (s. Clontech User Manual PT3140-1).

2.5.4 Hybridisierung

Die Hybridisierung der Membranen mit den radioaktiv markierten Proben wird nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt (s. Clontech User Manual PT3140-1).

Die Exposition der Membranen auf Röntgenfilme erfolgt bei -70°C für 4h, 16h, 24h, 48h, und 72h.

2.5.5 Auswertung der Arrays

Die entwickelten Filme werden mit einem Durchlichtscanner gescannt und die Spottedetektion erfolgt mit Melanie3 2-D-Auswertesoftware (Genebio, Genf, Schweiz). Die so erhaltenen densitometrischen Rohdaten werden in ein Excel-Datenblatt importiert, wo die Auswertung und Filterung durchgeführt wird.

2.5.6 Überprüfung der Expression der identifizierten Gene

Im Zusammenhang mit der Expression von CD40R wird die Expression des CD40L in den Tumoren aus den Nacktmäusen untersucht. Dazu werden $5\mu\text{m}$ dicke Paraffinschnitte $2 \times 10'$ in Xylol und $2 \times 5'$ in Ethanol entparaffiniert. Die endogenen Phosphatasen werden dann durch die Behandlung des Schnittes mit 3% H_2O_2 in Methanol für 15' inhibiert. Der Schnitt wird anschließend $2 \times 5'$ in Trispuffer gewaschen und für 15' mit Kaninchenserum 1:20 in Tris-BSA blockiert. Dann erfolgt für 60' die Inkubation mit dem anti-CD40L-Antikörper 1:250 in Tris-BSA. Danach wird der Schnitt $2 \times 5'$ in Trispuffer gewaschen und dann mit dem sekundären, biotinylierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper 1:400 in Tris-BSA 30' inkubiert. Nach dieser Inkubation wird der Schnitt wieder $2 \times 5'$ gewaschen, dann 10' mit HRP-konjugiertem Streptavidin 1:400 in Trispuffer inkubiert, erneut $2 \times 5'$ mit Trispuffer gewaschen und bis zur Farbentwicklung (5'-10') mit AEC inkubiert. Um die Farbreaktion zu stoppen wird der Schnitt gewässert und mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt.

2.6 Charakterisierung auf Protein-Ebene mittels 2-D PAGE

2.6.1 Probenvorbereitung

Die Zelllysate der Choriokarzinomzelllinien JEG-3 und AC1-1 sowie die Hybride AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59, AC-1M81, AC-1M88 werden verwendet.

Die Zellen je einer konfluenten großen Flasche (75cm²) werden mit einem Zellschaber abgelöst und bei 450xg, 5', 4°C pelletiert. Danach werden die Zellen zweimal mit je 10ml PBS (s. Tabelle 8) gewaschen. Die Zellen werden in 1,5ml PBS aufgenommen, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und bei 3000 rpm, 5', RT pelletiert. Nach der Zugabe von 200µl Lyse-Puffer (s. Tabelle 8) werden die Zellen mit einem Pellet-Mischer für 1' bei voller Geschwindigkeit homogenisiert. Anschließend werden Zelltrümmer bei 17500xg, 45', 4°C pelletiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dieses auf Eis gestellt.

2.6.2 Proteingehaltsbestimmung

In Vorversuchen hatte sich ergeben, daß die Standardassays der Proteinkonzentration (Lowry, Bradford) in Lyse-Puffer nicht durchgeführt werden können, da der im Lysepuffer enthaltene Harnstoff und das Detergenz die jeweiligen Färbereaktionen stören. Daher erfolgt die Proteinbestimmung nephelometrisch. Die Eichgerade wird mit BSA aufgestellt, d.h. die gemessenen Werte entsprechen Protein in BSA-Äquivalenten.

Die Proben werden für die Proteinbestimmung 1:5 mit Lyse-Puffer verdünnt und dann je 2µl in eine dreifache Bestimmung eingesetzt.

Ansatz für Proteinbestimmung : 190µl dest. Wasser
 8µl Lyse-Puffer
 2µl Probe 1:5 verdünnt
 vortexen, kurz zentrifugieren, 200µl
 Trichloressigsäure 20% hinzufügen, vortexen.

Die Proben werden eine Stunde auf Eis inkubiert, in Halbmikroküvetten überführt und in einem Behring Laser-Nephelometer gemessen.

Nach der Proteinbestimmung werden die Proben in Portionen zu 150µg Protein bei -70°C eingefroren.

2.6.3 Rehydratisierung der Immobilized Dry Strips

Jeder Gelstreifen wird in insgesamt 360µl Lösung im *Reswelling Tray* (Amersham Biosciences) rehydratisiert.

Die Lösung setzt sich aus der Probe in Lyse-Puffer, dem Marker und der Rehydratisierungslösung (s. Tabelle 8) zusammen. Als Marker für die erste Dimension werden 15µl der Carbanhydrase aus dem Carbamylyte Calibration Kit (Amersham Biosciences) verwendet. Die Rehydratisierung erfolgt in der Regel über Nacht, mindestens aber zehn Stunden bei 4°C.

2.6.4 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung wird in dem IPG *Strip Kit* der Multiphor II-Elektrophorese-Kammer (Amersham Biosciences) durchgeführt.

Für die Zellysate haben sich die *ImmobilineDryStrips*® der Länge 18cm und dem linearen pH-Bereich von 3-10 bzw. 4-7 (für Proteine mit saurem IEP) als geeignet erwiesen.

Während des Laufes werden die Gelstreifen mit *DryStripCoverFluid*® bedeckt.

Die Fokussierung im basischen Bereich wird durch fehlendes Reduktionsmittel beeinträchtigt. Da DTT während der Elektrophorese zur Anode wandert, wird vor der Kathode ein DTT-Depot angelegt. Dazu wird ein IEF-Filterpapierstreifen auf 11cm gekürzt und mit 500µl DTT-Lösung (Tabelle 8) getränkt. Überschüssige Flüssigkeit wird entfernt.

Die Fokussierungsbedingungen werden durch das Netzgerät EPS 3500 XL von Amersham Biosciences kontrolliert. Das Netzgerät wird auf automatische Durchführung der folgenden Fokussierungsphasen im Gradientenmodus eingestellt:

Tabelle 1: Programm des Netzgerätes für die Focussierung von analytischen Gelen im pH-Gradient 3-10

	Spannung	max. Stromstärke	max. Leistung	Dauer
Phase1:	150V	1mA	5W	1Vh
Phase2:	150V	1mA	5W	150Vh
Phase3:	300V	1mA	5W	1Vh
Phase4:	300V	1mA	5W	300Vh
Phase5:	3500V	1mA	5W	10000Vh
Phase6:	3500V	1mA	5W	10000Vh

Tabelle 2: Programm des Netzgerätes für die Focussierung von analytischen Gelen im pH-Gradient 4-7

	Spannung	max. Stromstärke	max. Leistung	Dauer
Phase1:	150V	1mA	5W	1Vh
Phase2:	150V	1mA	5W	150h
Phase3:	300V	1mA	5W	1Vh
Phase4:	300V	1mA	5W	600Vh

	Spannung	max. Stromstärke	max. Leistung	Dauer
Phase5:	600V	1mA	5W	1Vh
Phase6:	600V	1mA	5W	600Vh
Phase7:	3500V	1mA	5W	3000Vh
Phase8:	3500V	1mA	5W	30000Vh

Nach der Fokussierung können die Gelstreifen bei -70°C mehrere Wochen gelagert werden.

2.6.5 SDS-PAGE

Die zweite Dimension ist eine horizontale SDS-PAGE. Die Gele haben eine Größe von 22x24,5cm und werden auf einem Kunststoffilm gegossen. Das hat den Vorteil, daß sie beim Trocknen nicht schrumpfen. Gegossen werden Gradientengele mit einem Gradienten von 12% bis 14% Acrylamid. Vor dem Gießen der Gele werden die Kunststoffilme sechsmal zehn Minuten mit dest. Wasser gewaschen.

Die Gele für die zweite Dimension setzen sich wie folgt zusammen:

	Sammelgel T=6%, C=3%	Trenngel Lsg. 1 T=12%, C=2%	Trenngel Lsg. 2 T=14%, C=0,5%
Acrylamid 40%	1,82ml	4,365ml	5,1ml
N,N'-Methylenbisacrylamid 2%	1,125ml	2,7ml	0,525ml
Glycerin 87%	6,5ml	4,3ml	-
Gelpuffer 10x (s. Tabelle 8)	1,5ml	1,5ml	1,5ml
dest. Wasser	4,05ml	2,125ml	7,875ml
TEMED	10 μl	10 μl	10 μl
APS 40%	18 μl	10,6 μl	7,7 μl
Endvolumen	15ml	15ml	15ml

Die vor dem Gellauf erforderliche Äquilibrierung erfolgt in zwei Schritten im Äquilibrierungspuffer (s. Tabelle 8). Im ersten Schritt werden die Proteine mit Hilfe von 1%(w/v) DTT im Puffer reduziert. Danach wird das überschüssige Reduktionsmittel durch 4%(w/v) 2-Iodacetamid im Puffer inaktiviert. In beiden Schritten enthält der Puffer zusätzlich BPB zur Markierung der Lauffront. Jeder Schritt dauert 15' und wird auf einem Schüttler durchgeführt. Vor dem Gebrauch müssen beide Lösungen filtriert werden.

Nach dem zweiten Schritt werden die Gelstreifen eine Sekunde mit dest. Wasser abgespült und dann der überschüssigen Puffer ca. drei Minuten von den Gelstreifen herunter laufen gelassen.

Zum Starten des Gellaufs werden die Gelstreifen mit der Seite pH 3 bzw. pH 4 nach links auf die Gele für die zweite Dimension aufgelegt. Für den Laufpuffer werden die *ExcelGel SDS Buffer Strips*® verwendet. Die Pufferstreifen enthalten Tricin als Folge-Ion.

Als Marker für die zweite Dimension wird der *Mark12™ Wide Range Protein Standard* von Novex, San Diego, USA verwendet. Neben den Gelstreifen werden jeweils 4µl unverdünnt aufgetragen (s. Abbildung 2).

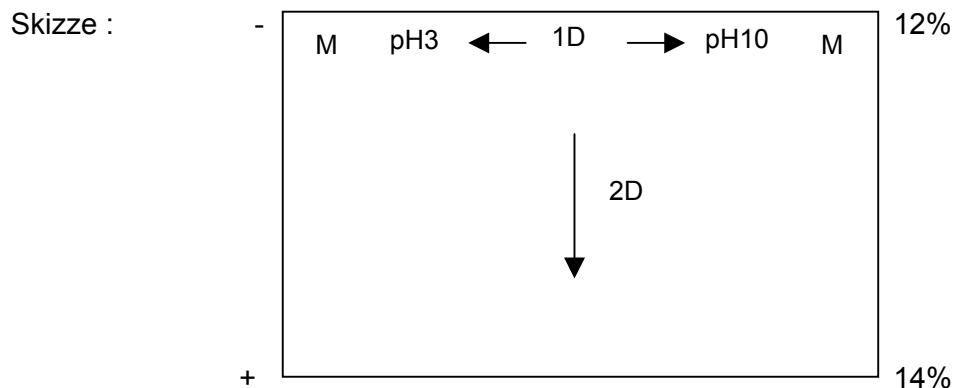


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer 2-D PAGE. Die Pfeile geben die Laufrichtung in der ersten (1D) bzw. zweiten (2D) Dimension an. Die pH-Wertangaben zeigen die Orientierung der Gelstreifen der IEF auf dem Gel für die zweite Dimension und die Prozentangaben am Rand die niedrigste bzw. höchste Acrylamidkonzentration des Gradienten.

Die Bedingungen des Gellaufs werden durch das Netzgerät EPS 3500 XL von Amersham Biosciences kontrolliert. Das Netzgerät wird auf automatische Durchführung der folgenden Phasen eingestellt:

Tabelle 3: Programm des Netzgerätes für die SDS-PAGE.

	Spannung	max. Stromstärke	max. Leistung	Dauer
Phase1:	100V	20mA	50W	1h20'
Phase2:	600V	30mA	50W	5h

Nach der ersten Phase wird der Lauf kurz unterbrochen und der Gelstreifen wird vom Gel entfernt, um den Kathoden-Pufferstreifen auf die Stelle zu verschieben, wo vorher der Gelstreifen lag.

2.6.6 Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick

Die Entwicklung der Gele erfolgt nach einer Modifikation (Görg, 1998) der Silberfärbemethode von Heukeshoven und Dernick (Heukeshoven and Dernick, 1988). Die

Proteine im Gel werden eine halbe Stunde fixiert (s. Tabelle 8). Nach einem Waschschrift mit dest. Wasser für 5' erfolgt die Sensibilisierung für eine Stunde (s. Tabelle 8). Das Gel wird danach sechsmal zehn Minuten mit dest. Wasser gewaschen und anschließend für 30' versilbert (s. Tabelle 8). Das überschüssige Silber wird dann dreimal 20s mit dest. Wasser entfernt und das Gel danach in drei bis fünf Minuten entwickelt (s. Tabelle 8). Die Entwicklung wird 20s mit dest. Wasser und fünf Minuten mit Glycin (s. Tabelle 8) gestoppt und das Gel noch dreimal mit dest. Wasser gewaschen. Das Gel wird dann für mindestens eine halbe Stunde konserviert (s. Tabelle 8), mit Cellophane überzogen und getrocknet.

2.6.7 Proteinidentifizierung

Differentiell exprimierte Proteine werden mittels Massenspektrum (MALDI-TOF) oder über Peptidfragmentsequenzierung (LC-ESI-MS/MS) identifiziert.

Für das Massenspektrum werden die Zellen einer großen Flasche in 80µl Lysepuffer homogenisiert (s. 2.6.1) und auf einen ImmobilineDryStrip pH4-7, 18cm aufgetragen (s. 2.6.3). Die Fokussierung und die zweite Dimension erfolgen wie bei den analytischen Gelen. Das SDS-Gel wird mit der negativen Zinkfärbung von BioRad nach Angaben des Herstellers gefärbt und die Proteinspots von drei Streifen ausgeschnitten, in 10% Ethanol überführt und zur Analyse weggeschickt.

Für die Peptidsequenzierung werden die Zellen von zwei großen Flasche in 100µl Lysepuffer homogenisiert (s. 2.6.1) und auf einen ImmobilineDryStrip pH4-7, 18cm aufgetragen (s. 2.6.3). Die Fokussierung erfolgt unter folgenden Bedingungen:

Tabelle 4: Programm des Netzgerätes für die Focussierung von präparativen Gelen im pH-Gradient 4-7.

	Spannung	max. Stromstärke	max. Leistung	Dauer
Phase1:	50V	1mA	5W	1Vh
Phase2:	50V	1mA	5W	700h
Phase3:	300V	1mA	5W	1Vh
Phase4:	300V	1mA	5W	300Vh
Phase5:	3500V	1mA	5W	3000Vh
Phase6:	3500V	1mA	5W	45000Vh

Die zweite Dimension erfolgt wie bei den analytischen Gelen. Das SDS-Gel wird mit der negativen Zinkfärbung von BioRad nach Angaben des Herstellers gefärbt und die

Proteinspots von drei Streifen ausgeschnitten, in 10% Ethanol überführt und zur Analyse weggeschickt.

Die Analyse der Proteine wird von der Firma SWISS-2D Service, Genf, Schweiz durchgeführt.

2.6.8 Überprüfung der identifizierten Proteine Annexin III und Saposin D

Nach der Proteinidentifizierung wird überprüft, ob in den untersuchten Zelllinien die mRNA für das Protein vorhanden ist oder nicht. Dazu wird die Gesamt-RNA mit dem SV Total RNA Isolation Kit (Promega, Madison, USA) aus den Zellen nach den Angaben des Herstellers isoliert. Pro Säule werden $1-2 \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Die RNA wird mit dem *First Strand cDNA Synthesis Kit* (AMV) nach den Angaben des Herstellers revers transkribiert. Danach erfolgt die Amplifikation des untersuchten Gens mit spezifischen Primern (Tait *et al.*, 1991). Zur Kontrolle der PCR wird parallel eine spezifische Sequenz des ADAM19-Gen amplifiziert, welches in allen Zelllinien exprimiert wird (eigene Versuche).

Tabelle 5: Sequenz der Primer zum Nachweis von Annexin III und ADAM19.

Primername	Sequenz
Anx3-F	5'-TTGAATTCGAAAGTCTGAAAGTGGATGAGC-3'
Anx3-B	5'-GGAAGCTTGCTGTCCACAATGTCCTTTTG-3'
SapD-F	5'-ACGGTGGCTTCTGCGAAGTGTGCAAGAAGC-3'
SapD-R	5'-CAAGCACACGAAGGAAGGATCCATCACCTCC-3'
AD19-V	5'-GTCAACATGGACCACTCCGA-3'
AD19-R	5'-CATCCTGGTGTCTGGCATGT-3'

Tabelle 6: Ansatz und Zyklus für die PCR zum Nachweis von Annexin III, Saposin D und ADAM19.

PCR-Ansatz:	Reaktionspuffer 10x (mit 15mM MgCl ₂)	4,5µl
	MgCl ₂ 25 Mm	2,0µl
	Primer 1 (10µM)	5,0µl
	Primer 2 (10µM)	5,0µl
	Desoxynukleotid-Mix 10 mM	0,5µl
	Taq-Polymerase 5 u/µl	0,5µl

	cDNA	5,0µl
	dest. Wasser	27,5µl
		Σ 50,0µl
PCR-Zyklus:	Denaturierung	94°C, 1'
	Annealing	55°C, 1's
	Kettenverlängerung	72°C, 2'
		Σ 30 Zyklen

2.7 Zusammenstellung der verwendeten Chemikalien und Medien

2.7.1 Medien für Zelllinien

Tabelle 7: Rezepturen der Zellkulturmedien

HBSS:	HBSS	9,55g
	NaHCO ₃	0,35g
	auf 1l auffüllen, mit 1N HCl auf pH 7,25 einstellen, sterilfiltrieren.	
Kulturmedium:	Nutrient mixture F12 (Ham)	Pulver für 1l
	NaHCO ₃	1,176g
	PSF (s.u.)	10ml
	FCS	100ml
	auf 1l auffüllen, mit 1N HCl auf pH 7,25 einstellen, sterilfiltrieren.	
PSF:	Penicillin	10000u/ml
	Streptomycin	10000µg/ml
	Amphotericin B	25µg/ml
	in 0,85% NaCl.	
Selektionsmedium:	Nutrient mixture F12 (Ham)	Pulver für 1l
	NaHCO ₃	1,176g
	Glucose	0,5g

Hepes	2,3g
PSF	10ml
FCS	100ml
Azaserin	5,7 μ M
Hypoxanthin	100 μ M
auf 1l auffüllen, mit 1N HCl auf pH 7,25 einstellen, sterilfiltrieren.	

2.7.2 Pufferlösungen

Tabelle 8: Rezepturen der Pufferlösungen, in alphabetischer Reihenfolge.

Äquibrierungspuffer:	Urea	6M
	Tris-HCl	50mM pH 8,5
	SDS	2%(w/v)
	Glycerin	30%(w/v)
	in dest. Wasser lösen.	
Denaturierungspuffer:	NaCl	1,5M
	NaOH	0,5M
	in dest. Wasser lösen, autoklavieren.	
DTT-Lösung:	DTT	20mM
	in dest. Wasser lösen, portionieren und bei -20°C lagern.	
Entwickler:	Natriumcarbonat	3%(w/v)
	in dest. Wasser lösen,	
	Formaldehyd 37%	25 μ l/100ml
vor Gebrauch zugeben.		
Fixierer:	Ethanol	40%(v/v)
	Acetat	10%(v/v)
	in dest. Wasser.	
Gelpuffer 10x :	Tris	1,2M

	Essigsäure	1,2M
	SDS	1%(w/v)
	in dest Wasser lösen, vor Gebrauch filtrieren.	
Konservierung:	Glycerin 87%	10%(v/v)
	in dest. Wasser lösen.	
Lyse-Puffer :	Urea	7M
	Thiourea	2M
	CHAPS	4%(w/v)
	Tris	40mM
	DTT	65mM
	BPB	Krümel
	in dest. Wasser lösen, vor Gebrauch sterilfiltrieren.	
Neutralisierungspuffer:	Tris	1M
	NaCl	1,5M
	in dest Wasser lösen, mit rauchender HCl auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren.	
PBS:	NaCl	8,0g
	KCl	0,2g
	Na ₂ HPO ₄	1,44g
	KH ₂ PO ₄	0,24g
	mit HCl pH 7,4 einstellen, auf 1l auffüllen, autoklavieren.	
Rehydratisierungslösung :	Urea	8,0 M
	CHAPS	2,0%(w/v)
	Pharmalyte 3-10	0,5%(v/v)
	DTT	0,2%(w/v)
	Orange G	Krümel
	Lösung ansetzen in cØmplete™ Protease Inhibitor Cocktail; vor Gebrauch sterilfiltrieren.	
Sensibilisierung:	Na-Acetat	17g

	in 175ml dest. Wasser lösen, dann 75ml Ethanol zugeben
	Natriumthiosulfat 0,75g
	Glutaraldehyd 50% 2,5ml
	vor Gebrauch frisch dazugeben.
SSC 20x:	Na-Citrat 88,2g
	NaCl 175,3g
	mit 10N NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren.
Stop-Lösung:	Glycin 1%(w/v)
	in dest. Wasser lösen.
TAE 50x:	Tris 2M
	Eisessig 57,1ml
	EDTA 0,5M, pH8,0 100ml
	mit dest Wasser auf 1l auffüllen, autoklavieren.
Tris-BSA:	BSA 1,5%
	in Trispuffer lösen.
Trispuffer:	Tris 0,1M
	in dest. Wasser lösen und mit HCl auf pH 7,6 einstellen.
Versilberung:	Silbernitrat 0,1%(w/v)
	in dest. Wasser lösen,
	Formaldehyd 37% 50µl/100ml
	vor Gebrauch zugeben.

2.7.3 Sonstige Chemikalien

Zur Herstellung von Puffern und Medien wurden Chemikalien in den Reinheitsstufen p.A. oder höher von folgenden Firmen benutzt:

Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden

Biomol, Hamburg, Deutschland

Fluka, Deisenhofen, Deutschland

Merck, Darmstadt, Deutschland

Sigma Chemical Company, Deisenhofen, Deutschland

Trypsin und der Antibiotika-Cocktail für die Zellkultur stammen von der Firma Gibco BRL, Paisley, Schottland. Das Pulver für HBSS und das Kulturmedium wurden von Sigma Chemical Company, Deisenhofen, Deutschland bezogen.

Für die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen oder Gewebe wurde entweder der SV Total RNA Isolation Kit von Promega, Madison, USA genutzt oder der Rneasy Midi Kit von Qiagen, Hilden, Deutschland.

Der First Strand cDNA Synthesis Kit (AMV) wurde von der Firma Roche, Mannheim, Deutschland bezogen. Die in der Polymerasekettenreaktion eingesetzte *Taq*-Polymerase stammte von der Firma Promega, Madison, USA oder der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland.

Die Primer wurden bei MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland synthetisiert.

Der anti-CD40L-Antikörper (Bestellnr. RDI-CD40L-2431) stammte von der Firma Research Diagnostics Inc., Flanders, New Jersey, USA. Der sekundäre, biotinylierte Kaninchen-anti-Mausimmunglobulin-Antikörper (Bestellnr. E0354) und das HRP-konjugierte Streptavidin (Bestellnr. P0397) wurden von der Firma DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland bezogen. Der AEC (red) Substrate Kit war von der Firma Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, USA. Das Kaninchenserum wurde aus Kaninchenblut von nicht immunisierten Tieren in den Tierversuchsställen gewonnen. Die Kaisers Glyceringelatine stammte von der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland.

Die Nylonmembranen für die DNA Fingerabdrücke waren von Qiagen, Hilden, Deutschland.

Die Sonde 33.15 und das Substrat Lumiphos für die DNA-Fingerabdrücke wurden von der Firma Cellmark Diagnostics, Abingdon, UK bezogen.

Die ImmobilineDryStrips, die ExcelGelSDS Pufferstreifen, das Siliconöl und der Carbamyllyte Calibration Kit für die 2-D PAGE stammten von der Firma Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung

Insgesamt wurden 1096 Zellen in 96 *well*-Mikrotiterplatten einzeln ausgesät. Von diesen Zellen sind 124 d.h. 11,3% in den Näpfen angewachsen.

117 Klone konnten aus den 96 *well*-Mikrotiterplatten in 24 *well*-Mikrotiterplatten überführt werden. Die übrigen sieben Klone stellten die Zellteilung nach Erreichen einer Zellzahl von ca. 20 ein. Bei der Passage aus den 96 *well*-Mikrotiterplatten starben 25 Klone.

Die 92 Klone, die in den 24 *well*-Mikrotiterplatten wuchsen, konnten alle in kleine Flaschen überführt werden. Sie erhielten die Namen AC-1M1 bis AC-1M92. Dies entspricht einem Anteil von 8,4% der ausgesäten Zellen.

3.2 Charakterisierung auf DNA-Ebene

3.2.1 Zytogenetik

Die Chromosomenzahl der fünf Zelllinien schwankt zwischen 92 und 95. Alle Zelllinien besitzen ein normales X-Chromosom, da nach der Fusion auf die Anwesenheit einer intakten Kopie des *HGPRT*-Gens, welches auf dem X-Chromosom im Bereich Xq26-q27.1 liegt (Nabholz *et al.*, 1969), selektiert worden ist. Die Zelllinien AC-1M32, AC-1M46 und AC-1M59 besitzen zusätzlich das veränderte X-Chromosom add(X)(q26), welches von AC1-1 in die Fusion eingebracht worden ist (Frank *et al.*, 2000). In den Karyogrammen werden die Abweichungen in der Zahl der Gonosomen im Bezug auf die fusionsbedingte Addition eines normalen männlichen Karyotyps zu AC1-1 und dem gonosomalen Karyotyp von AC1-1 add(X)(q26),-Y angegeben.

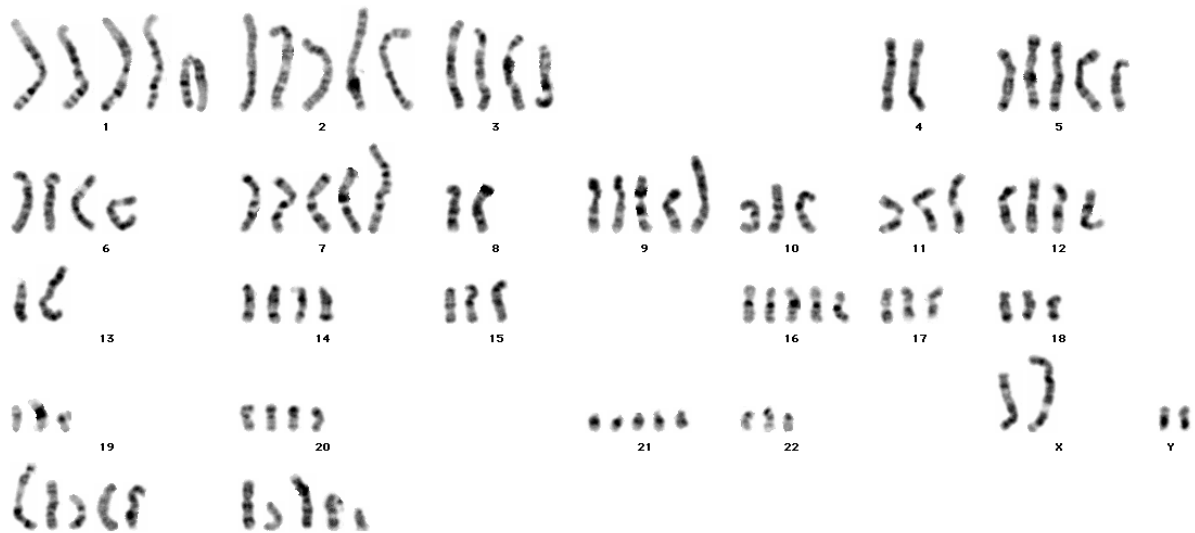


Abbildung 3: Karyogramm der Zelllinie AC-1M32. Karyotyp: 92,XY,-Y,add(X)(q26),+2,-4,-4,+5,add(7)(q36),+add(7)(p22),-8,+add(9)(p13),-10,-11, add(11)(p14),-13,-13,i(13)(q10),-15,+16,-18,-19,+21,+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5. Die Metaphasechromosomen wurden mit Giemsa gefärbt. Die Markerchromosomen mar1 bis mar5 sind in der letzten Reihe abgebildet.



Abbildung 4: Karyogramm der Zelllinie AC-1M46. Karyotyp: 95,XY,-Y,add(X)(q26),+2,-4,+5,add(7)(q36),+add(7)(p22),-8,+9,add(9)(p13),-10, add(11)(p11),-13,-13, i(13)(q10),-15,-18,-19,+21,+22,+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5. Die Metaphasechromosomen wurden mit Giemsa gefärbt. Die Markerchromosomen mar1 bis mar5 sind in der letzten Reihe abgebildet.



Abbildung 5: Karyogramm der Zelllinie AC-1M59. Karyotyp: 92,XY,add(X)(q26),+2,-4,add(7)(q36),+add(7)(q36),+add(7)(p22),-8,+add(9)(p13),-10,-11, -13,-13,i(13)(q10),-15,-18,-20,+22,+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5. Die Metaphasechromosomen wurden mit Giemsa gefärbt. Die Markerchromosomen mar1 bis mar5 sind in der letzten Reihe abgebildet.

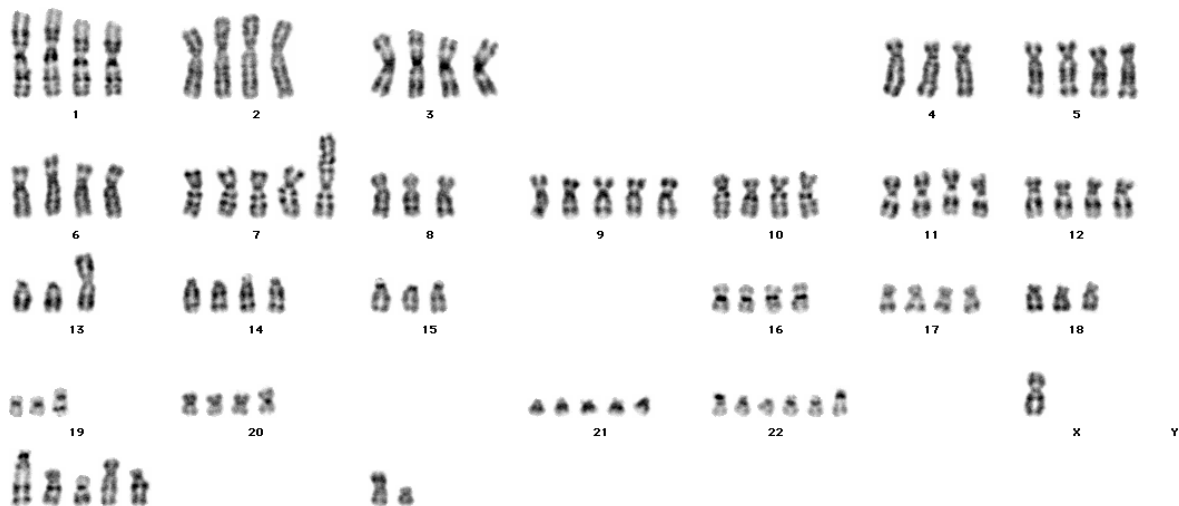


Abbildung 6: Karyogramm der Zelllinie AC-1M81. Karyotyp: 92,X,-X,-Y,-Y,-4,add(7)(q36),+add(7)(p22),-8,+9,-10,-13,i(13)(q10),-15,-18,-19,add(19)(q13), +21, +22, add(22)(q13),+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5. Die Metaphasechromosomen wurden mit Giemsa gefärbt. Die Markerchromosomen mar1 bis mar5 sind in der letzten Reihe abgebildet.

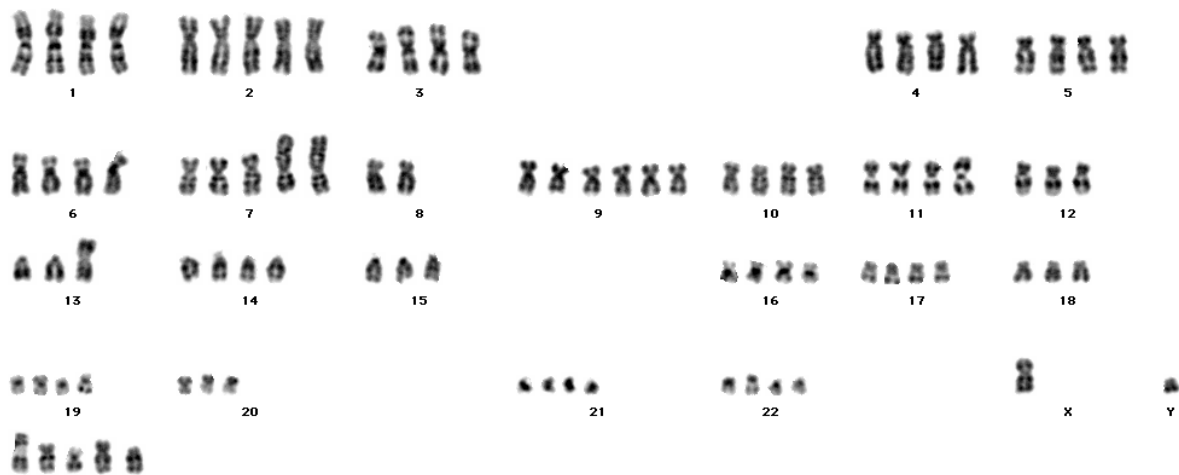


Abbildung 7: Karyogramm der Zelllinie AC-1M88. Karyotyp: 92<math>4n>,X,-X,-Y,-Y,+2,+add(7)(q36),+add(7)(p22),+add(7)(p22),-8,+9,-10,+12,-13,i(13)(q10),-15,-18,-19,+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5. Die Metaphasechromosomen wurden mit Giemsa gefärbt. Die Markerchromosomen mar1 bis mar5 sind in der letzten Reihe abgebildet.

Tabelle 9: Zusammenfassung der zytogenetischen Analyse von AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59, AC-1M81, AC-1M88, AC-1-1 und JEG-3. Die mit * markierten Marker stammen von normalen Trophoblastzellen. Die Hybride enthalten alle ein intaktes X-Chromosom aus dem Trophoblast, da auf dessen Anwesenheit selektiert worden ist. Zur Vollständigkeit und besseren Übersicht sind die Zelllinien AC-1-1 und JEG-3 mit aufgeführt ((Frank et al., 2000)).

Zytogenetische Marker	Zelllinien							
	AC-1M32	AC-1M46	AC-1M59	AC-1M81	AC-1M88	AC-1-1	JEG-3	
add(7)(p22),add(7)(q36),i(13)(q10),mar1,mar2,mar3,mar4,mar5	+	+	+	+	+	+	+	
t(4;11)(p16;q13)								
der(X)t(X;4)(q26;p1?)t(4;1)(p16;q13)	+	+	+			+		
X	+*	+*	+*	+*	+*		+	
Y	+*	+*	+*				+	
+add(7)(p22)					+			
+add(7)(q36)			+					
add(9)(p13)	+	+	+					
add(11)(p14)	+	+						
add(19)(q13)				+				
add(22)(q13)				+				
mar6	+	+	+	+	+	+	+	

3.2.2 DNA-Fingerabdruck

Die Auswertung der DNA-Fingerabdrücke zeigt, daß die analysierten Klone genetisch individuell und unterscheidbar sind. Das durch die Fusion eingebrachte genetische Material zeigt typische Banden, die nur in den Hybridklonen (Nummern 1-5) nachzuweisen sind.

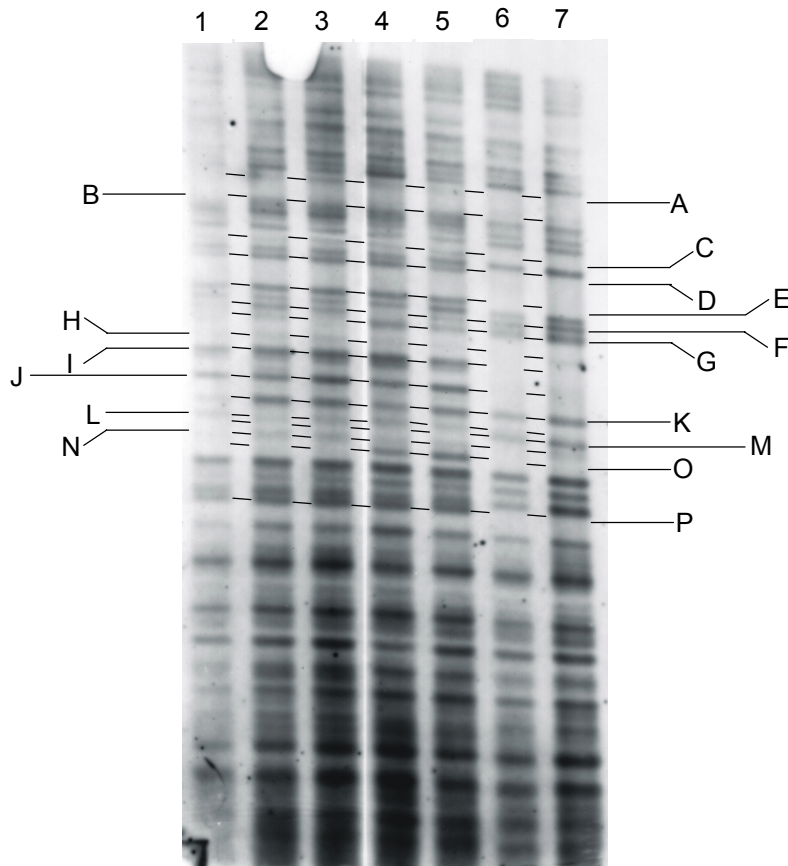


Abbildung 8 : Genetischer Fingerabdruck der Zelllinien AC-1M32 (1), AC-1M46 (2), AC-1M59 (3), AC-1M81 (4), AC-1M88 (5), AC1-1 (6) und JEG-3 (7). A bis O: Darstellung unterschiedlicher Banden. Die aus den Zellen isolierte genomische DNA wurde mit *HinfI* restringiert, auf einem 0,6% Agarosegel aufgetrennt und mit der Sonde 33.15 (Jeffreys *et al.*, 1985) hybridisiert.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Bandenverteilung des genetischen Fingerabdrucks.

Bande	Zelllinien						
	AC-1M32	AC-1M46	AC-1M59	AC-1M81	AC-1M88	AC1-1	JEG-3
	1	2	3	4	5	6	7
A	+	+	+	+	+		
B	+	+	+	+	+		
C	+	+	+	+	+		
D	+	+	+	+	+		
E	+	+	+	+	+		
F	+	+	+		+	+	+
G	+	+		+	+	+	+
H	+	+	+	+	+		
I	+	+	+	+	+		
J	+	+	+	+	+		
K		+	+	+	+	+	+
L						+	+
M	+	+	+	+	+		+
N				+	+		
O	+	+	+	+	+		

Die Fingerabdrücke der Hybride zeigen wesentlich mehr Banden als die der Choriokarzinomzelllinien AC1-1 und JEG-3. Dadurch kann man diese beiden Gruppen klar voneinander unterscheiden.

Innerhalb der Hybride kann man die beiden Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88 dadurch von den drei anderen abgrenzen, daß sie eine Bande (N) aufweisen, die in den anderen Zelllinien nicht vorkommt. Untereinander unterscheiden sich AC-1M81 und AC-1M88 darin, daß AC-1M81 die Bande F fehlt. Die Hybride AC-1M32, AC-1M46 und AC-1M59 lassen sich auch voneinander abgrenzen. AC-1M32 fehlt die Bande K und AC-1M59 die Bande G, die jeweils in allen anderen Hybriden vorkommen.

Die Choriokarzinomzelllinien AC1-1 und JEG-3 lassen sich ebenfalls mit Hilfe des Fingerabdrucks unterscheiden, da die Bande M in JEG-3 vorhanden ist und in AC1-1 fehlt. Die anderen Banden stimmen bei den beiden Zelllinien überein.

3.3 Charakterisierung des Phänotyps im Nacktmausexperiment

Nach der Injektion der Zellen wurden die Tiere alle drei bis vier Tage untersucht. Dabei wurde der Zeitpunkt des Auftretens und die Größe der Tumoren protokolliert.

Tabelle 11: Zeitpunkt der Messung in Tagen (d) nach Versuchsbeginn und Größe (in cm) der gemessenen Tumoren. Die Tumoren auf der linken Seite der Tiere stammen von AC1-1, die auf der rechten Seite von den Hybridklonen bzw. JEG-3. T bedeutet, daß die Tiere an diesem Tag getötet wurden.

Zelllinie	Maus	7d	11d	14d	18d	21d	25d	32d	38d	45d
AC-1M32	1				1,0re		2,5re	T		
	2						0,3li	0,5li	T	
	3									
	4									
	5									
AC-1M46	6		0,1re	0,5re	1,5re	-	2,8re 1,5li	T		
	7					-	1,0re	2,0re	3,5re	T
	8								0,5li	T
	9									
	10									
AC-1M59	11									
	12									
	13		keine Tumoren							
	14									
	15									
AC-1M81	16			2x0,2re	2x0,3re	0,7re	1,4re	2,5re 0,3li	T	
	17				0,2re	0,3re	0,5x1re	1,2x2re	T	
	18					0,1re	0,3re	0,5re	0,8re	T
	19									
	20									
AC-1M88	21		1x1,5re	1,5x1,9re	2,2re	T				
	22		1,2x1,6re	2x1,8re	2,2x2,4re	T				
	23			0,2re	0,6re	0,7re 0,7li	1,3re 1,5li	2,4re 2,5li	T	
	24			0,2re	1x0,8re	1,3re	1,8re	T		
	25					0,2re	0,7re	1,3re	T	
Jeg-3	26	0,2re	0,3re	0,6re	0,9x1,3re	-	2,0re	T		
	27			0,5re	0,9re	-	1,5re	T		
	28				0,3re	-	0,8re	1,5re	T	
	29					-	0,3re	0,8re	T	
	30									
AC1-1	2						0,3	0,5	T	
	6						1,5	T		
	8								0,5	T
	16							0,3	T	
	23					0,7	1,5	2,5	T	

Tabelle 12: Zusammenfassung der Nacktmausexperimente. Die Tumorigenität ist angegeben als Prozentsatz der Tiere, bei denen 45 Tage nach Injektion der Zellen ein Tumor festgestellt werden konnte.

	AC-1M32	AC-1M46	AC-1M59	AC-1M81	AC-1M88	AC1-1	JEG-3- 3
Zahl der Tiere	5	5	5	5	5	30	5
Tumoren von der Zelllinie	1	2	0	3	5	5	4
Tumorigenität	20%	40%	0%	60%	100%	17%	80%

Die Choriokarzinomzelllinien AC1-1 und JEG-3 sind sehr unterschiedlich tumorigen. Während JEG-3 eine stark tumorigene Zelllinie ist, läßt sich bei AC1-1 nur in wenigen Tieren und sehr spät eine Tumorbildung nachweisen.

Die herabgesetzte Tumorigenität von Zellen der Linie AC1-1 bleibt nach der Fusion mit normalen, primären Trophoblastzellen nicht immer als solche erhalten. Bei dem Hybridklon AC-1M59 ist kein tumorigenes Verhalten nachweisbar. Die übrigen Hybridklone sind unterschiedlich tumorigen, wobei solche mit einer intermediären Ausprägung dieses Phänotyps (AC-1M32 und AC-1M46) von denjenigen Klonen unterschieden werden können (AC-1M81 und AC-1M88), deren Tumorigenität wieder mit der Tumorigenität der Zelllinie JEG-3 vergleichbar ist.

Histologisch verhalten sich die Tumore wie Choriokarzinome. Sie sind durch epitheloide, teilweise von synzytialen Fragmenten durchsetzte Tumormassen gekennzeichnet, in denen praktisch keine Stromabildung nachweisbar ist. Im Inneren der Tumoren können sich – vor allen Dingen bei großen Tumoren – ausgedehnte nekrotische Areale befinden. In den Außenbezirken der Tumorknoten finden sich Einbrüche in benachbarte Wirtsgefäße, häufig verknüpft mit im Tumor gelegenen, blutgefüllten Lakunen. Die Wand der blutgefüllten Lakunen wird ausschließlich von typischen Zellen des Tumors gebildet, der hier in direkte Nachbarschaft zu Blut des Wirtsgewebes kommt. Endothel ist nur dort nachzuweisen, wo Einbrüche in Wirtsgefäße stattgefunden haben.

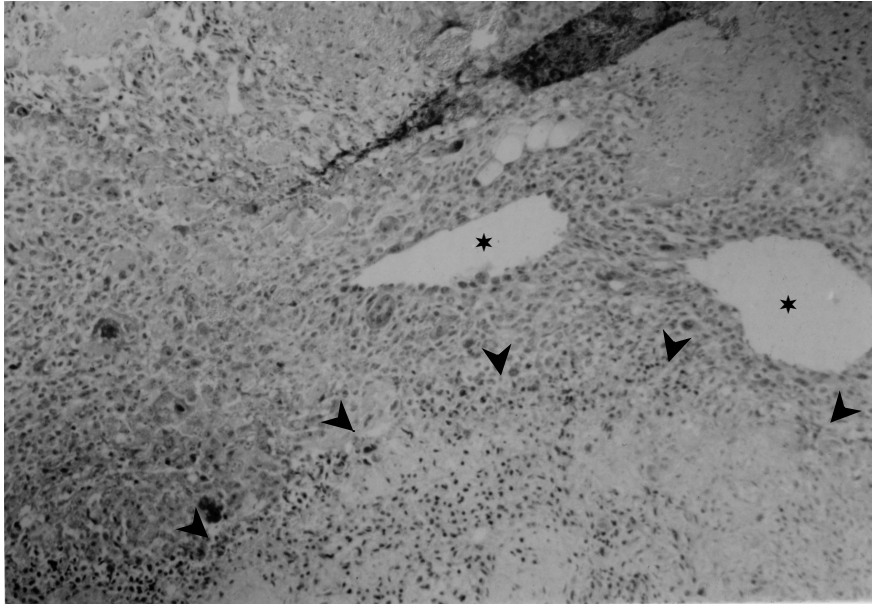


Abbildung 9: Histologisches Bild eines Tumors von JEG-3 in Nacktmäusen. ★Lakunen gesäumt von JEG-3 Zellen. Im unteren Teil des Bildes ist die nekrotische innere Region des Tumors angeschnitten (s. ➤).

Die makroskopisch auffallende, typisch düster blutrote Farbe der Tumoren ist auf die großen Einblutungen in diese lakunären Räume zurückzuführen. Sicherlich ist auch ein Teil der raschen Größenzunahme der Tumoren durch Einlagerung von Blut des Wirtes in die Tumormassen verursacht. Ob in diesen Lakunen vorübergehend oder ständig eine Form von Zirkulation stattfindet, ist weder durch makroskopische Beobachtung der subkutanen Tumoren noch durch histologische Untersuchung zu entscheiden. Die Tumoren der einzelnen Zelllinien und Klone sind histologisch nicht voneinander unterscheidbar.

3.4 Charakterisierung auf mRNA-Ebene unter Einsatz von cDNA-Arrays

3.4.1 Auswertung der Arrays

Bei der Auswertung der cDNA-Arrays muß eine große Anzahl densitometrischer Meßwerte analysiert werden. Dies ist nur in halbautomatisierter, rechnergestützter Weise möglich. Daher wurden die in Tabellen zusammen gefaßten Meßwerte mit Hilfe von Filteroperationen zunächst grob sortiert.

Im ersten Ansatz der Filterung wurden diejenigen Gene identifiziert, die keine differentielle Expression zeigten. Dabei konnten 79 Gene identifiziert werden, die in allen Zelllinien exprimiert waren und keine signifikanten Unterschiede im Meßsignal aufwiesen, d.h. der größte in einer Zelllinie gemessene Wert nicht mehr als das 2,5fache des kleinsten in einer Zelllinie gemessenen Wertes betrug (s. Tabelle 27 im Anhang). Außerdem wurden 316 Gene identifiziert, für die sich kein Meßsignal nachweisen ließ (s. Tabelle 26 im Anhang). Zusätzlich wurden noch 7 Gene eliminiert, bei denen sich die Werte der Doppelspots zu

stark unterschieden oder aus anderen Gründen eine Auswertung nicht möglich war (s. Tabelle 29 im Anhang). Aus der Subtraktion dieser drei Tabellen von der Gesamtmenge der Daten ergibt sich, daß 186 potentiell differentiell exprimierte Gene in die nähere Betrachtung kommen (s. Tabelle 28 im Anhang). Dieser reduzierte Datensatz wurde der weiteren Auswertung zugrunde gelegt.

Kandidatengene, deren Expression möglicherweise aus dem trophoblastären Fusionspartner übernommen worden war, sollten dadurch gekennzeichnet sein, daß sie in keiner der Choriokarzinomzelllinien, aber in mindestens einem der Hybridklone exprimiert sind. Insgesamt wurden 96 Gene identifiziert, für die diese Aussage gemacht werden kann (s. Tabelle 30 im Anhang). Da diese Tabelle im Ganzen immer noch zu umfangreich war, um eine sinnvolle Interpretation der Ergebnisse zu erlauben, wurde in einem Suchgang nach solchen Genen gesucht, die in allen Hybridklonen, aber nicht in den Choriokarzinomzelllinien exprimiert werden. Nur die beiden Gene RAF Oncogen und IFN- γ Antagonist Cytokin entsprachen diesem Filterkriterium (s. auch Tabelle 31 im Anhang).

Um die Effekte der Fusion selbst nachzuvollziehen, wurden diejenigen Gene selektiert, die von der Zelllinie AC1-1 nicht exprimiert wurden, aber in mindestens einem der Hybridklone (s. Tabelle 32 im Anhang, 116 Gene) oder aber in allen Hybridklonen exprimiert wurden (s. Tabelle 33 im Anhang, 7 Gene).

Um die Unterschiede im Grad der Tumorigenität mit dem Genexpressionsmuster zu verknüpfen, wurden die hoch tumorigenen Zelllinien AC-1M81, AC-1M88 und Jeg-3 gegen die sehr schwach tumorigene Zelllinie AC1-1 getestet. Dabei wurden neun Gene gefunden, die in AC1-1 exprimiert waren, aber nicht in den drei anderen Zelllinien nachweisbar waren (s. Tabelle 13). Die umgekehrte Filteroperation (d.h. die Suche nach Genen, die in den drei tumorigenen Zelllinien exprimiert waren, nicht aber in AC1-1) erbrachte keine Treffer.

Um zu analysieren, ob das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein des modifizierten X-Chromosoms addXq26 mit definierbaren Genexpressionsmustern korreliert, wurden die Zelllinien, die dieses Chromosom enthielten (AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59 und AC1-1) gegen diejenigen Zelllinien getestet, die nur ein normales X-Chromosom enthielten (AC-1M81, AC-1M88 und Jeg-3). Dabei konnten 9 Gene identifiziert werden, die in AC1-1 und teilweise in anderen Klonen exprimiert wurden, nicht aber in AC-1M81, AC-1M88 oder Jeg-3 nachweisbar waren (s. Tabelle 14). Diese 9 Gene stimmen mit den in Tabelle 13 gefundenen Genen überein. Die umgekehrte Suche erbrachte keine Treffer.

Alle Filteroperationen wurden auf Plausibilität überprüft, in dem die entsprechenden Spots direkt auf dem Röntgenfilmdokument des cDNA-Array visuell mit den gelisteten densitometrischen Meßwerten korreliert wurden (s. Abbildung 10 bis Abbildung 16).

Tabelle 13: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die in AC1-1, aber nicht in AC-1M81, AC-1M88 oder JEG-3 exprimiert werden.

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
HT2291	proto-oncogene tyrosine-protein kinase SRC (EC 2.7.1.112) (P60-SRC) (C-SRC)	B6c	0	0	0	0	0	0,741	0
U47686	signal transducer and transcription activator 5B (STAT5B)	B7n	0,816	0	0	0	0	0,539	0
U84401	smoothened	C4n	0,975	0,505	0	0	0	0,656	0
X52773	retinoic acid receptor alpha [retinoic acid receptor RXR.apha (RXRA)]	C7j	1,177	0	0,964	0	0	0,66	0
M85289	heparan sulfate proteoglycan (HSPG2)	D3h	0,76	0	1,011	0	0	0,756	0
X68203	vascular endothelial growth factor receptor 3 precursor (EC 2.7.1.112) (VEGFR-3) (tyrosine-protein kinase receptor FLT4, class III)	D6n	0	0,663	0	0	0	0,727	0
J03210	MMP-2 (gelatinase A)	E1b	0,882	0,88	0,684	0	0	0,627	0
Y07604	nm23-H4; nucleoside-diphosphate kinase (EC 2.7.4.6) (nucleoside 5'-diphosphate phosphotransferase) (NDK)	E3g	0,911	0	1,069	0	0	0,835	0
U11690	putative RHO/RAC guanine nucleotide exchange factor (RHO/RAC GEF) (faciogenital dysplasia protein)	E4m	0,941	0	0,998	0	0	0,682	0

Tabelle 14: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die in Zelllinien mit addXq26 (AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59 und AC1-1), nicht aber in Zelllinien ohne das veränderte X-Chromosom (AC-1M81, AC-1M88 und JEG-3) exprimiert werden.

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
HT2291	proto-oncogene tyrosine-protein kinase SRC (EC 2.7.1.112) (P60-SRC) (C-SRC)	B6c	0	0	0	0	0	0,741	0
U47686	signal transducer and transcription activator 5B (STAT5B)	B7n	0,816	0	0	0	0	0,539	0
U84401	smoothened	C4n	0,975	0,505	0	0	0	0,656	0
X52773	retinoic acid receptor alpha [retinoic acid receptor RXR.apha (RXRA)]	C7j	1,177	0	0,964	0	0	0,66	0
M85289	heparan sulfate proteoglycan (HSPG2)	D3h	0,76	0	1,011	0	0	0,756	0
X68203	vascular endothelial growth factor receptor 3 precursor (EC 2.7.1.112) (VEGFR-3) (tyrosine-protein kinase receptor FLT4, class III)	D6n	0	0,663	0	0	0	0,727	0
J03210	MMP-2 (gelatinase A)	E1b	0,882	0,88	0,684	0	0	0,627	0
Y07604	nm23-H4; nucleoside-diphosphate kinase (EC 2.7.4.6) (nucleoside 5'-diphosphate phosphotransferase) (NDK)	E3g	0,911	0	1,069	0	0	0,835	0
U11690	putative RHO/RAC guanine nucleotide exchange factor (RHO/RAC GEF) (faciogenital dysplasia protein)	E4m	0,941	0	0,998	0	0	0,682	0

In einer weiteren Filterung wurden die beiden stark tumorigenen Hybride AC-1M81 und AC-1M88 den beiden schwach oder nicht tumorigenen Zelllinien AC-1M59 und AC1-1 gegenübergestellt. Dabei wurden vier Gene identifiziert, die in AC-1M81 und AC-1M88, aber nicht in AC-1M59 oder AC1-1 exprimiert wurden (s. Tabelle 15). Bei der umgekehrten Abfrage erhielt man sechs Gene (s. Tabelle 16).

Tabelle 15: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die in AC-1M81 und AC-1M88, aber nicht in AC-1M59 und AC1-1 exprimiert sind.

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
M21389	keratin, type II cytoskeletal 5 keratin, type II cytoskeletal 5 (cytokeratin 5) (K5) (CK5) (58 KD cytokeratin)	A7h	0	0	0	1,333	1,145	0	0
X85133	RBQ1 retinoblastoma binding protein	B7d	0,657	0	0	0,56	0,754	0	0
U32659	interleukin IL-17	F5h	0	0	0	0,759	0,784	0	0
L07414	CD40	F7e	0,48	0	0	0,959	0,706	0	0

Tabelle 16: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die in AC-1M59 und AC1-1, aber nicht in AC-1M81 und AC-1M88 exprimiert sind.

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
X52773	retinoic acid receptor alpha [retinoic acid receptor RXR.alpha (RXRA)]	C7j	1,177	0	0,964	0	0	0,66	0
U86759	netrin-2	D2k	1,175	0,543	2,543	0	0	1,013	0,947
M85289	heparan sulfate proteoglycan (HSPG2)	D3h	0,76	0	1,011	0	0	0,756	0
J03210	MMP-2 (gelatinase A)	E1b	0,882	0,88	0,684	0	0	0,627	0
Y07604	nm23-H4; nucleoside-diphosphate kinase (EC 2.7.4.6) (nucleoside 5'-diphosphate phosphotransferase) (NDK)	E3g	0,911	0	1,069	0	0	0,835	0
U11690	putative RHO/RAC guanine nucleotide exchange factor (RHO/RAC GEF) (faciogenital dysplasia protein)	E4m	0,941	0	0,998	0	0	0,682	0

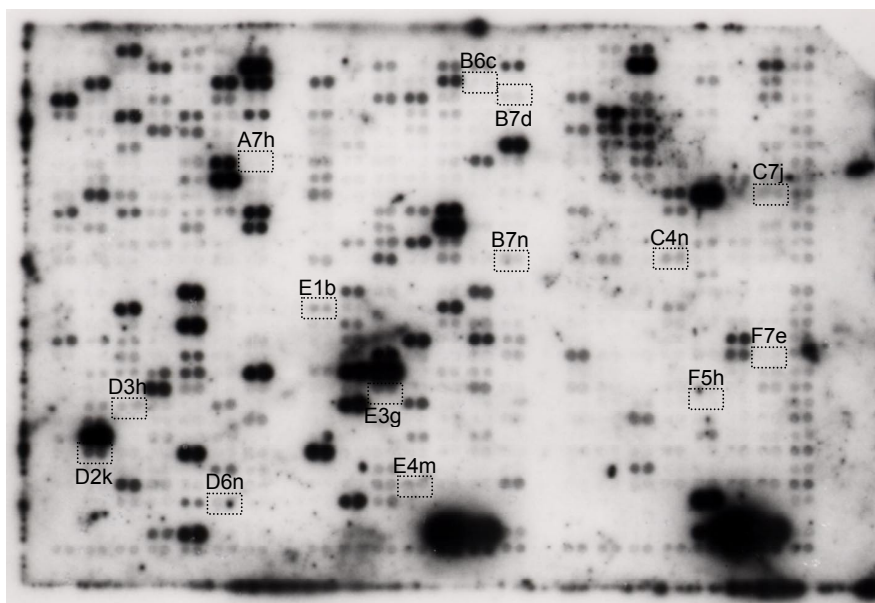


Abbildung 10: cDNA-Array der Zelllinie AC-1M32. Die markierten Position gehören zu den selektierten Genen aus Tabelle 13 bis Tabelle 16.

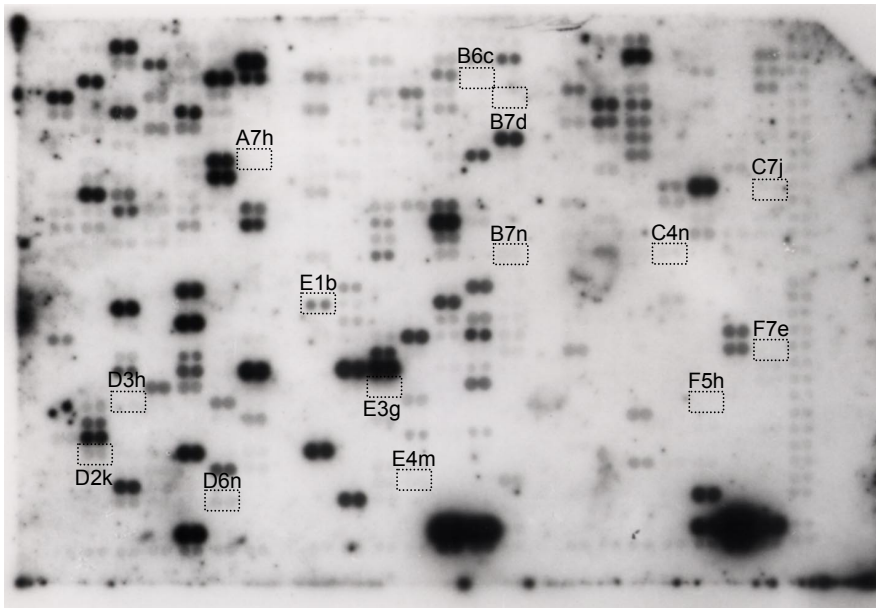


Abbildung 11: cDNA-Array der Zelllinie AC-1M46. Die markierten Position gehören zu den selektierten Genen aus Tabelle 13 bis Tabelle 16.

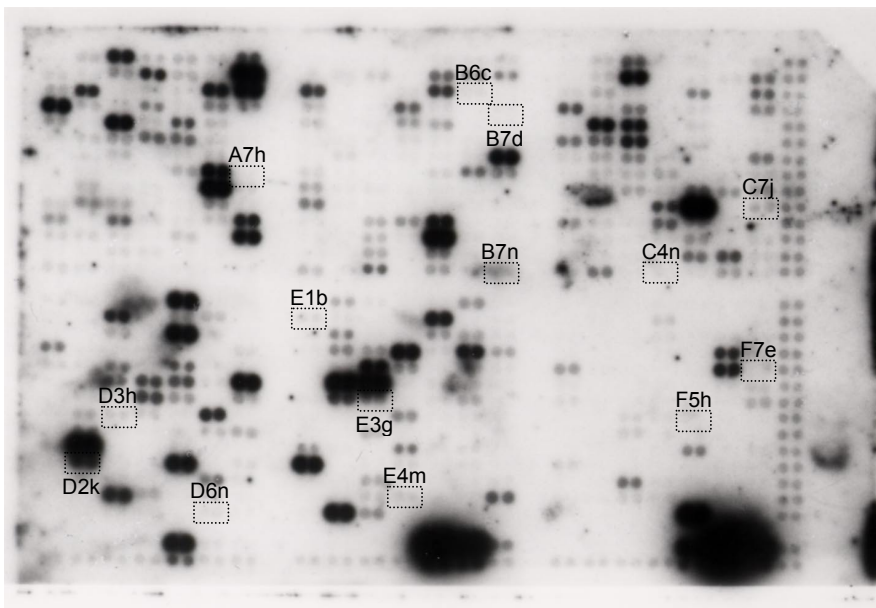


Abbildung 12: cDNA-Array der Zelllinie AC-1M59. Die markierten Position gehören zu den selektierten Genen aus den Tabellen: Tabelle 13 bis Tabelle 16.

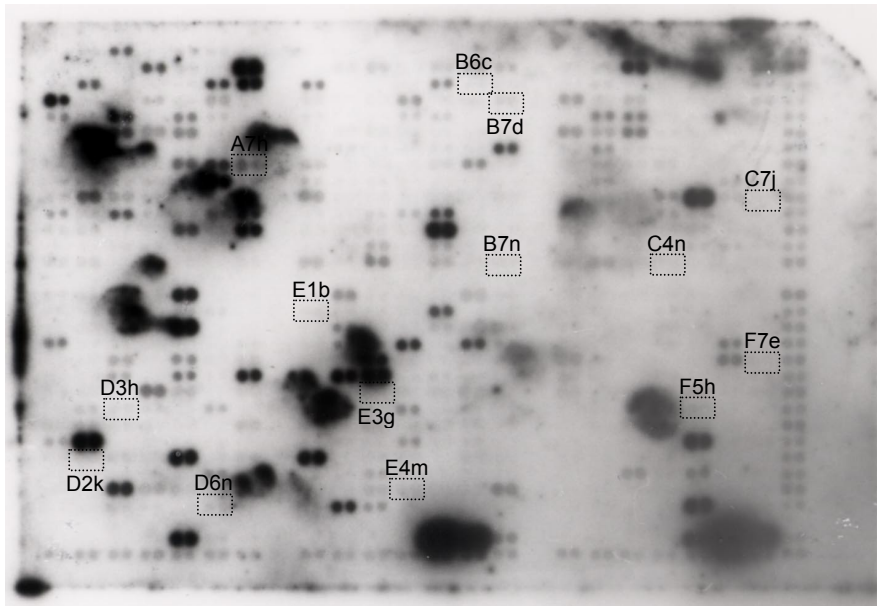


Abbildung 13: cDNA-Array der Zelllinie AC-1M81. Die markierten Position gehören zu den selektierten Genen aus Tabelle 13 bis Tabelle 16.

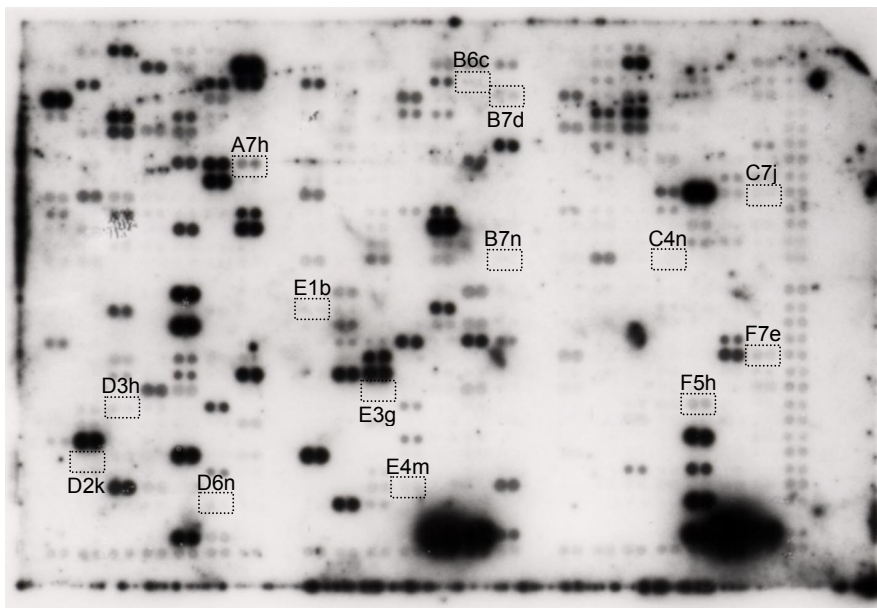


Abbildung 14: cDNA-Array der Zelllinie AC-1M88. Die markierten Position gehören zu den selektierten Genen aus Tabelle 13 bis Tabelle 16.

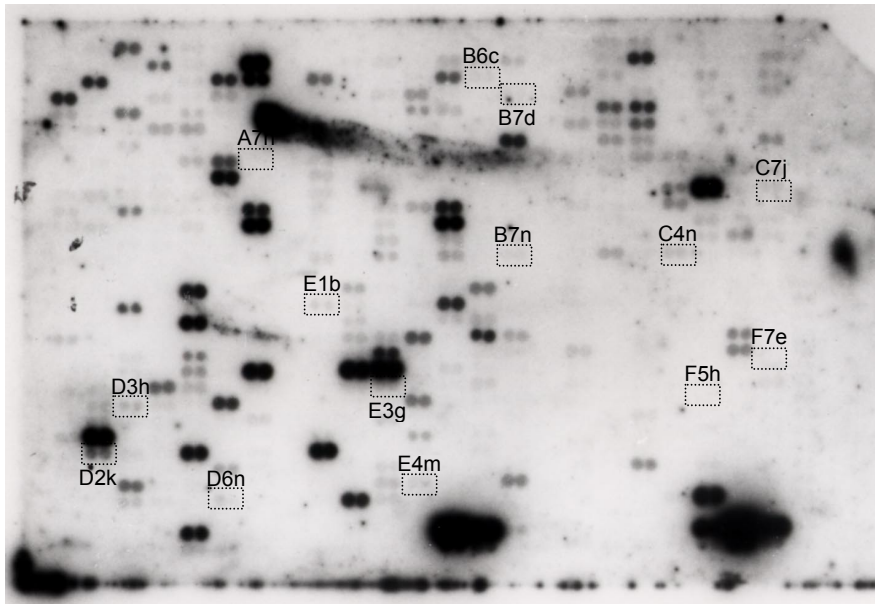


Abbildung 15: cDNA-Array der Zelllinie AC1-1. Die markierten Position gehören zu den selektierten Genen aus Tabelle 13 bis Tabelle 16.

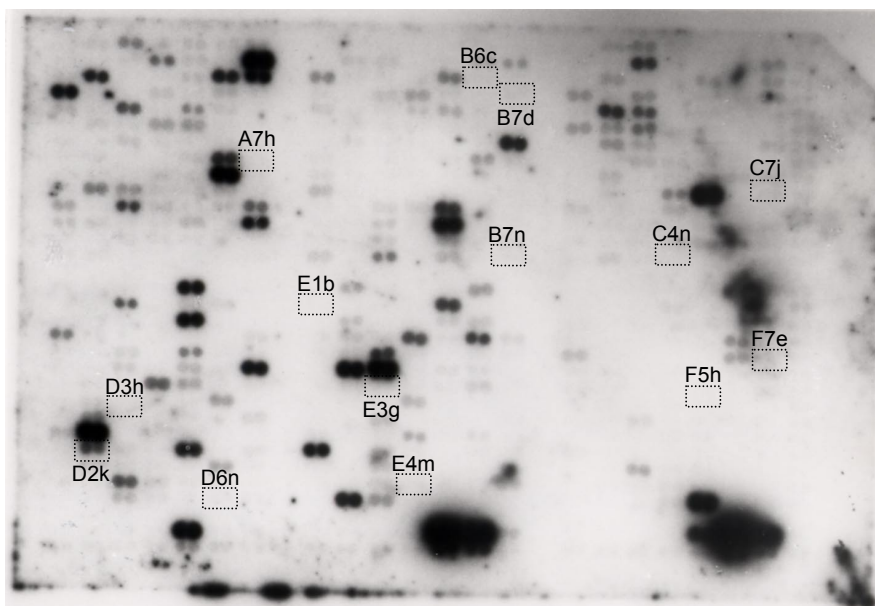


Abbildung 16: cDNA-Array der Zelllinie JEG-3. Die markierten Position gehören zu den selektierten Genen aus Tabelle 13 bis Tabelle 16.

Die in den cDNA-Arrays differentiell exprimierten Gene sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle 17: Durch die cDNA-Arrays identifizierte differentiell exprimierte Gene, deren chromosomale Lokalisation und die theoretisch generierten Molekulargewichte und isoelektrische Punkte der korrespondierenden Proteine.

Genname	theoretische		chromosomale Lokalisation
	MW in Da	pI	
CD40R	30619	5,49	20q12-q13.2
C-SRC	59703	7,22	20q11.2-q13
Zytokeratin 5	62461	8,14	12q12-13
faciogenitales Dysplasie Protein	106668	6,33	Xp11.21
HSPG2	469382	6,10	1p36.1-p35
Interleukin-17	17504	8,82	2q31
MMP-2	73882	5,26	16q13-q21
Netrin-2	61465	9,20	16p13.3
nm23-H4	20658	10,30	16p13.3
RBQ1	107156	9,95	16p12-p11.2
RXRA	50811	7,92	9q34.3
Smoothened	86396	8,71	7q32.3
STAT5B	89880	5,77	17q11.2
VEGFR-3	145598	5,89	5q35

3.4.2 Überprüfung der Expression der identifizierten Gene

Die Expression des CD40-Rezeptors erschien auf Grund der Tatsache, daß das Gen des Liganden CD40L auf Xq26 liegt, distal der Bruchstelle des in einem Teil der Hybriden und AC1-1 vorhandenen veränderten X-Chromosoms addXq26, besonders interessant. Aus diesem Grund wurde die Expression seines Liganden CD40L in den Nacktmaustumoren untersucht. Die Inkubation der Schnitte der Nacktmaustumoren mit dem anti-CD40L-Antikörper zeigte eine Expression des CD40L in den Tumoren der Hybride. Dabei findet man in den Zellen der Hybride eine schwache, diffuse Färbung im Zytoplasma und eine starke Färbung der Zellmembranen.

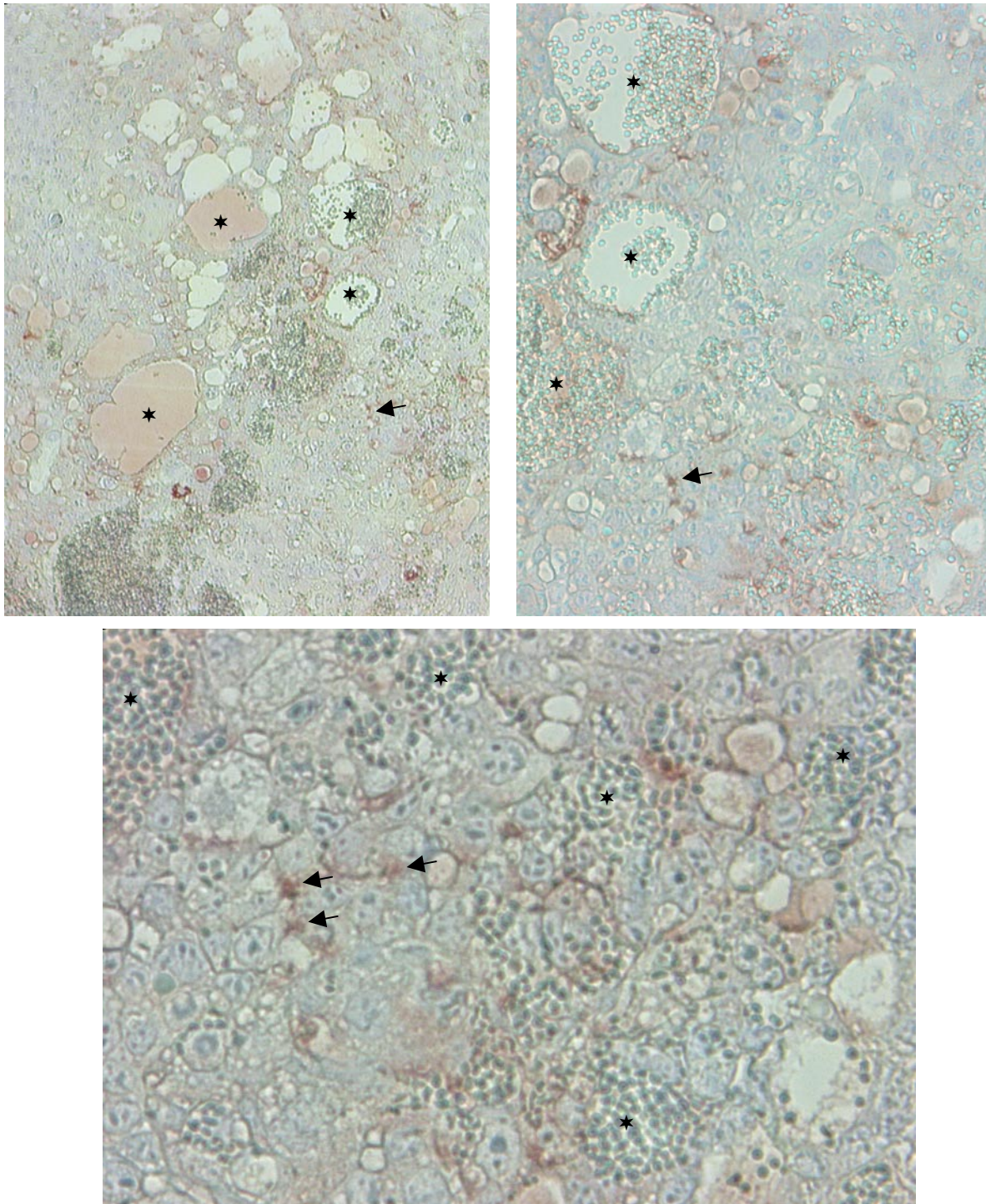


Abbildung 17: Histologisches Bild eines Nacktmaustumors der Zelllinie AC-1M88 inkubiert mit dem anti-CD40L-Antikörper. Der Ausschnitt ist in von links oben nach unten 120x, 300x und 480x Vergrößerung dargestellt. In den Tumorzellen kann man eine Reaktion mit dem Antikörper erkennen (←). * blutgefüllte Lakunen

Eine Aussage, welche Tumoren negativ für CD40L sind ist leider nicht möglich, da bei den Tumoren, die keine Reaktion zeigten auch die Positivkontrolle mit dem anti-Zytokeratin 7-Antikörper negativ war. In diesen Paraffinblöcken sind die Antigene wahrscheinlich durch zu lange Fixation in Formalin zerstört worden.

3.5 Charakterisierung auf Protein-Ebene

3.5.1 2-D Page

Die Auswertung der 2-D PAGE erfolgt mit Hilfe der Melanie3-Software. Die Gele werden gescannt und die Proteinspots mit Hilfe der Software detektiert. Nach manueller Korrektur der Spoterkennung werden die Gele miteinander verglichen. Drei Gele einer Zelllinie werden dann zu einem synthetischen Mittelwertsgel dieser Zelllinie verschmolzen. Dabei werden alle Spots in Betracht gezogen, die in zwei der drei Gele vorkommen. Diese synthetischen Gele der verschiedenen Zelllinien werden dann miteinander verglichen.

Bei dem Vergleich der Gele wurden ausschließlich qualitative Unterschiede zwischen den Zelllinien untersucht, d.h. Proteinspot vorhanden oder nicht. Für diese Einschränkung gab es mehrere Gründe. Zum einen ist bei dem stark unterschiedlichen Phänotyp der Zelllinien (tumorigen oder nicht-tumorigen) ein qualitativer Unterschied im Proteinmuster zu erwarten. Zum anderen mußte diese Einschränkung gemacht werden, weil die gewählte Silberfärbung zwar sehr sensitiv ist (0,05 bis 0,1ng/mm²), aber keine wirklich quantitative Aussage zuläßt, da sie nur über einen relativ kleinen Bereich linear ist (Rabilloud, 1999).

Bei dem Vergleich der Zelllinien wurden immer die extremen Phänotypen miteinander verglichen, d.h. die stark tumorigenen Hybridklone AC-1M88 und AC-1M81 mit dem nicht tumorigenen Hybridklon AC-1M59 und der schwach tumorigenen Choriokarzinomzelllinie AC1-1. Die bei diesem Vergleich identifizierten Spots werden dann auf ihre Anwesenheit/Abwesenheit in den intermediären Hybridklonen AC-1M32 und AC-1M46 und der Choriokarzinomzelllinie JEG-3 überprüft.

Die Zusammenfassung der Zelllinien zu Gruppen und die Bildung von Mittelwertgelen haben u.a. spezifische Vorteile für die 2-D PAGE, denn sie verbessern das Signal-Rausch Verhältnis bei der Auswertung der Gele.

- Bei den Gelen erhält man immer Artefakte, die auf die Silberfärbung zurückzuführen sind. Das sind zum einen mit angefärbte Verunreinigungen. Da diese aber nicht in allen Gelen an der gleichen Stelle vorhanden sind, werden sie durch die Mittelung eliminiert.
- Außerdem gibt es Proteine, die sich bei einer Silberfärbung nicht reproduzierbar färben. Auch dieses Problem kann man durch die Zusammenfassung mehrerer Gele in eine Gruppe beseitigen.
- Auch in den Zellen auftretende Schwankungen im Expressionsmuster in verschiedenen Passagen werden durch die Gruppierung aufgefangen.

Bei einer Auswertungsstrategie (s. Abbildung 18, Suche nach tumorigenitätskorrelierten Spots) wurde das synthetische Gel der Zelllinie AC-1M59 (nicht tumorigener Hybridklon) von dem Gel der Zelllinie AC-1M88 (hochtumorigener Hybridklon) subtrahiert. Die verbliebenen

Spots wurden nur behalten, wenn sie in AC-1M81 (hochtumorigener Hybridklon) vorhanden waren, aber nicht in AC1-1 (schwach tumorigene Choriokarzinomzelllinie) auftraten. Dieser Ansatz führt zu einer stringenten Identifikation von solchen Spots, die mit den tumorigenen Eigenschaften der Zelllinien korrelieren.

Im anderen Weg (Suche nach Spots, die mit Tumorsuppressoreigenschaften korrelieren) wurden das synthetische Gel der Zelllinie AC-1M88 (hochtumorigener Hybridklon) von dem Gel der Zelllinie AC-1M59 (nicht tumorigener Hybridklon) subtrahiert und die verbliebenen Spots behalten, wenn sie in AC1-1 (schwach tumorigene Karzinomlinie), aber nicht in AC-1M81 (hoch tumorigener Hybridklon) vorhanden waren.

Die auf diesem Wege identifizierten Spots (numerierte Spots in Abbildung 19 bis Abbildung 29) wurden durch Analyse der Originalgele verifiziert und visuell kontrolliert.

Zuerst wurden Übersichtsgele mit einem pH-Bereich von drei bis zehn in der ersten Dimension von den Zelllinien AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59, AC-1M81, AC-1M88, AC1-1 und JEG-3 hergestellt.

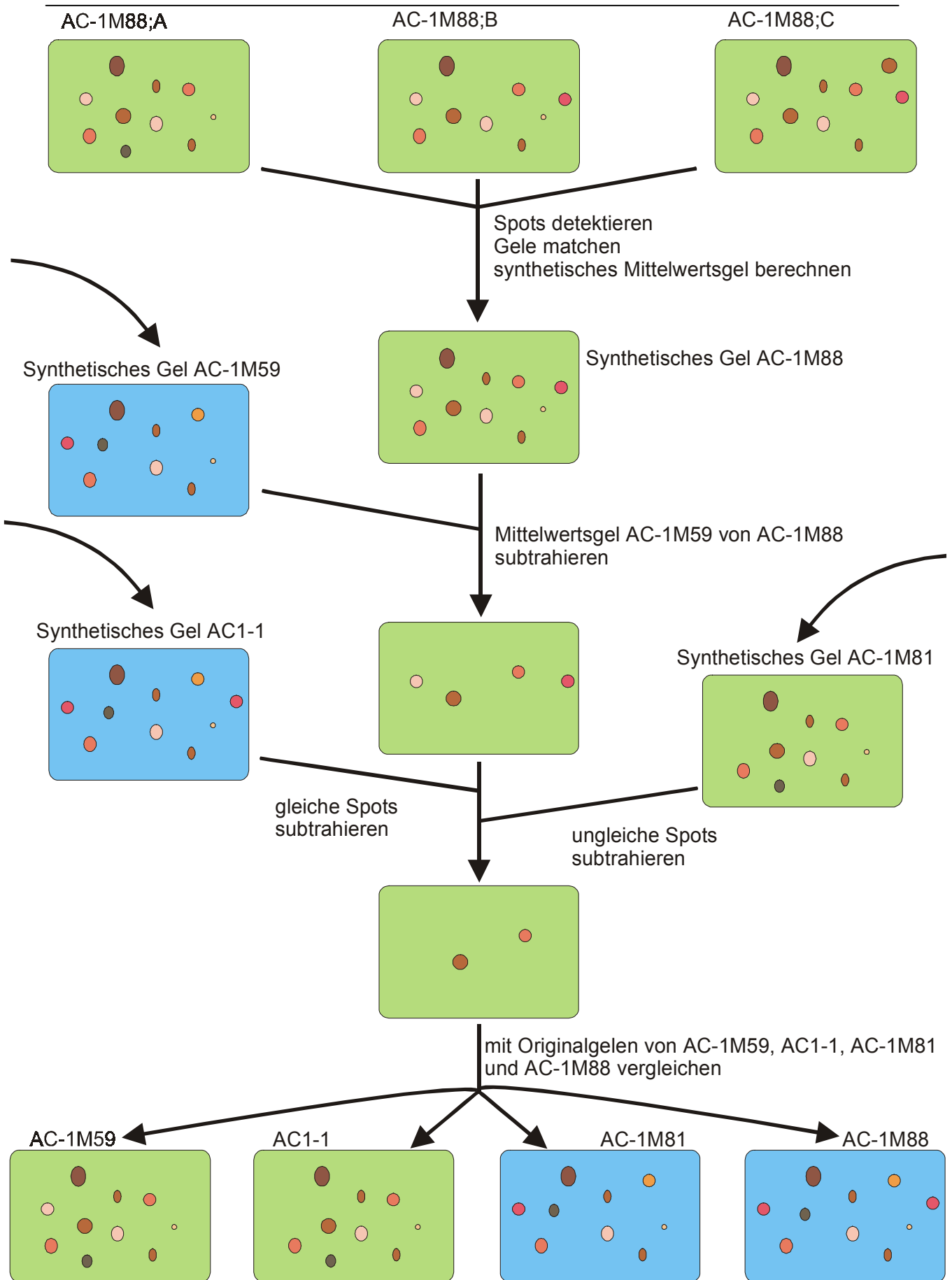


Abbildung 18: Beispielhaftes Schema zur Auswertung der 2-D PAGE. Dargestellt ist die Suche nach tumorigenitätskorrelierten Spots.

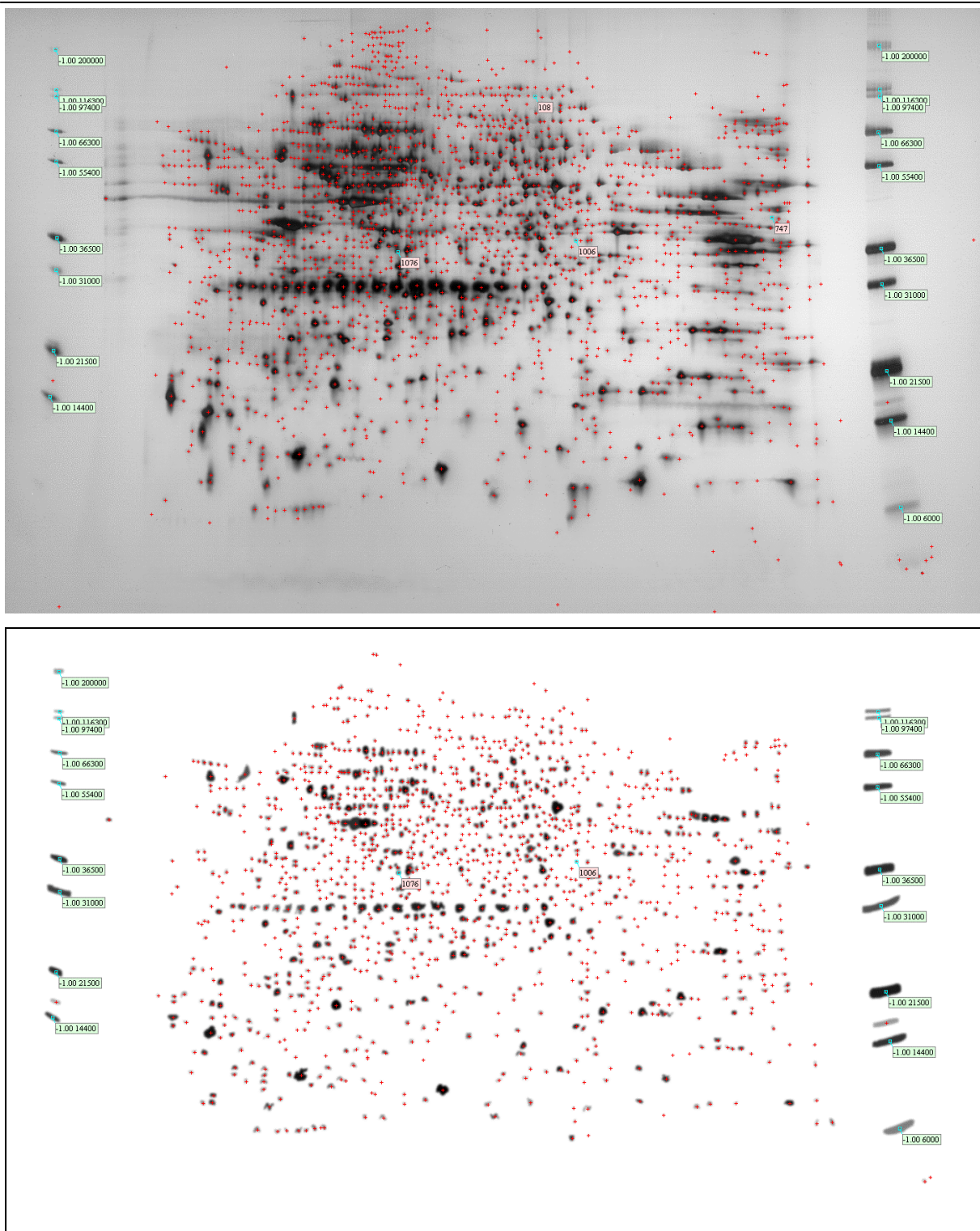


Abbildung 19: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC-1M32. Die Proteine wurden in der 1. Dimension zwischen pH 3 (linke Seite) und pH 10 (rechte Seite) aufgetrennt. Die roten Kreuze geben die Mittelpunkte der von Melanie identifizierten Proteinspots an. Die bei 31kDa nebeneinander liegenden Proteinspots gehören zu dem internen Standard für den pI. Es handelt sich um verschiedenen Carbamylierungsstufen der Carbanhydrase mit einem pI von 4,8 bis 6,7. Die hellgelben Fahnen geben das MW der Markerproteine an und die rosa Fahnen die Nummern der Spots aus der Tabelle 18 und der Tabelle 19.

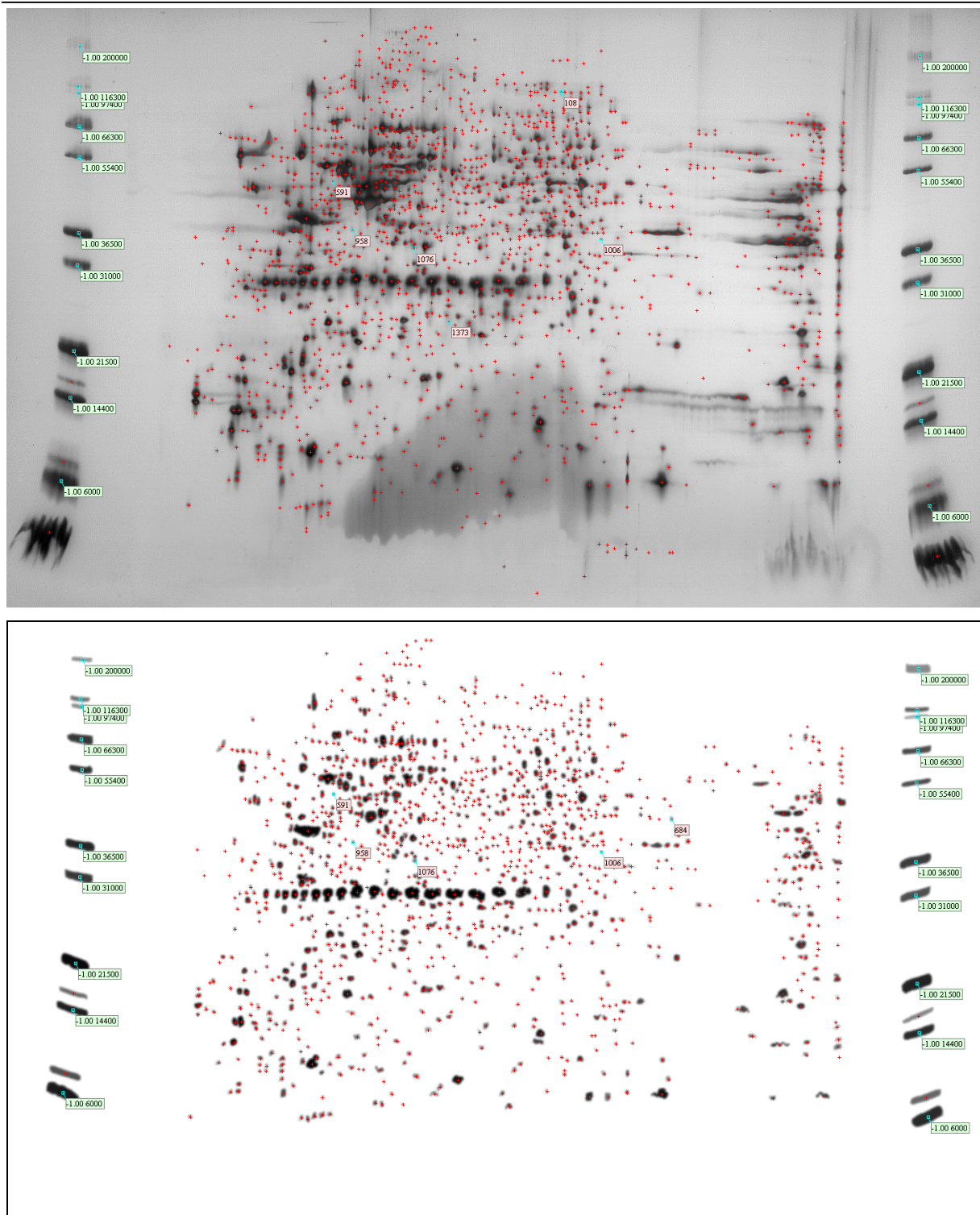


Abbildung 20: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC-1M46. Die Proteine wurden in der 1. Dimension zwischen pH 3 (linke Seite) und pH 10 (rechte Seite) aufgetrennt. Die roten Kreuze geben die Mittelpunkte der von Melanie identifizierten Proteinspots an. Die bei 31kDa nebeneinander liegenden Proteinspots gehören zu dem internen Standard für den pI. Es handelt sich um verschiedenen Carbamylierungsstufen der Carbanhydrase mit einem pI von 4,8 bis 6,7. Die hellgelben Fahnen geben das MW der Markerproteine an und die rosa Fahnen die Nummern der Spots aus der Tabelle 18 und der Tabelle 19.

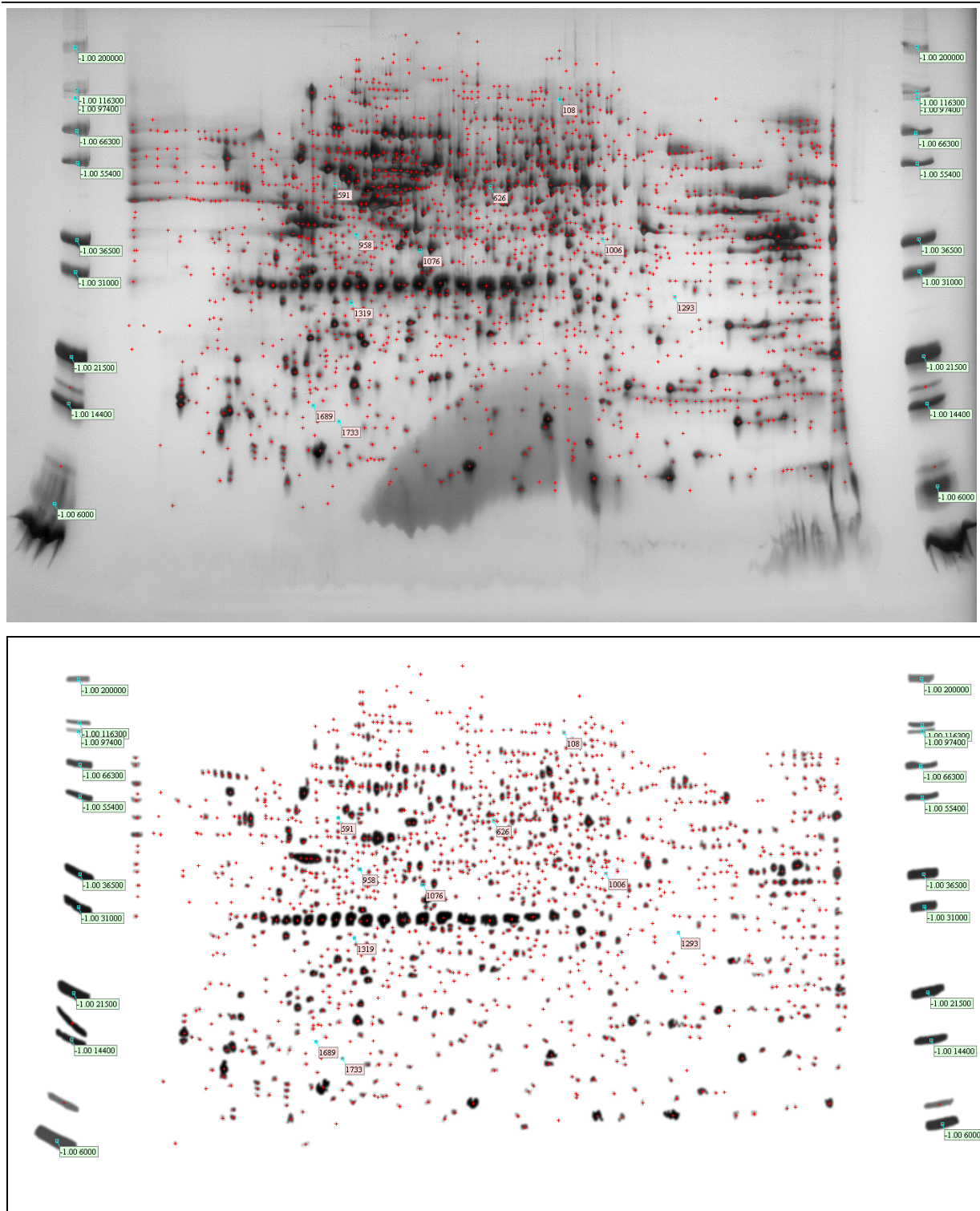


Abbildung 21: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC-1M59. Die Proteine wurden in der 1. Dimension zwischen pH 3 (linke Seite) und pH 10 (rechte Seite) aufgetrennt. Die roten Kreuze geben die Mittelpunkte der von Melanie identifizierten Proteinspots an. Die bei 31kDa nebeneinander liegenden Proteinspots gehören zu dem internen Standard für den pI. Es handelt sich um verschiedenen Carbamylierungsstufen der Carbanhydrase mit einem pI von 4,8 bis 6,7. Die hellgelben Fahnen geben das MW der Markerproteine an und die rosa Fahnen die Nummern der Spots aus der Tabelle 18 und der Tabelle 19.

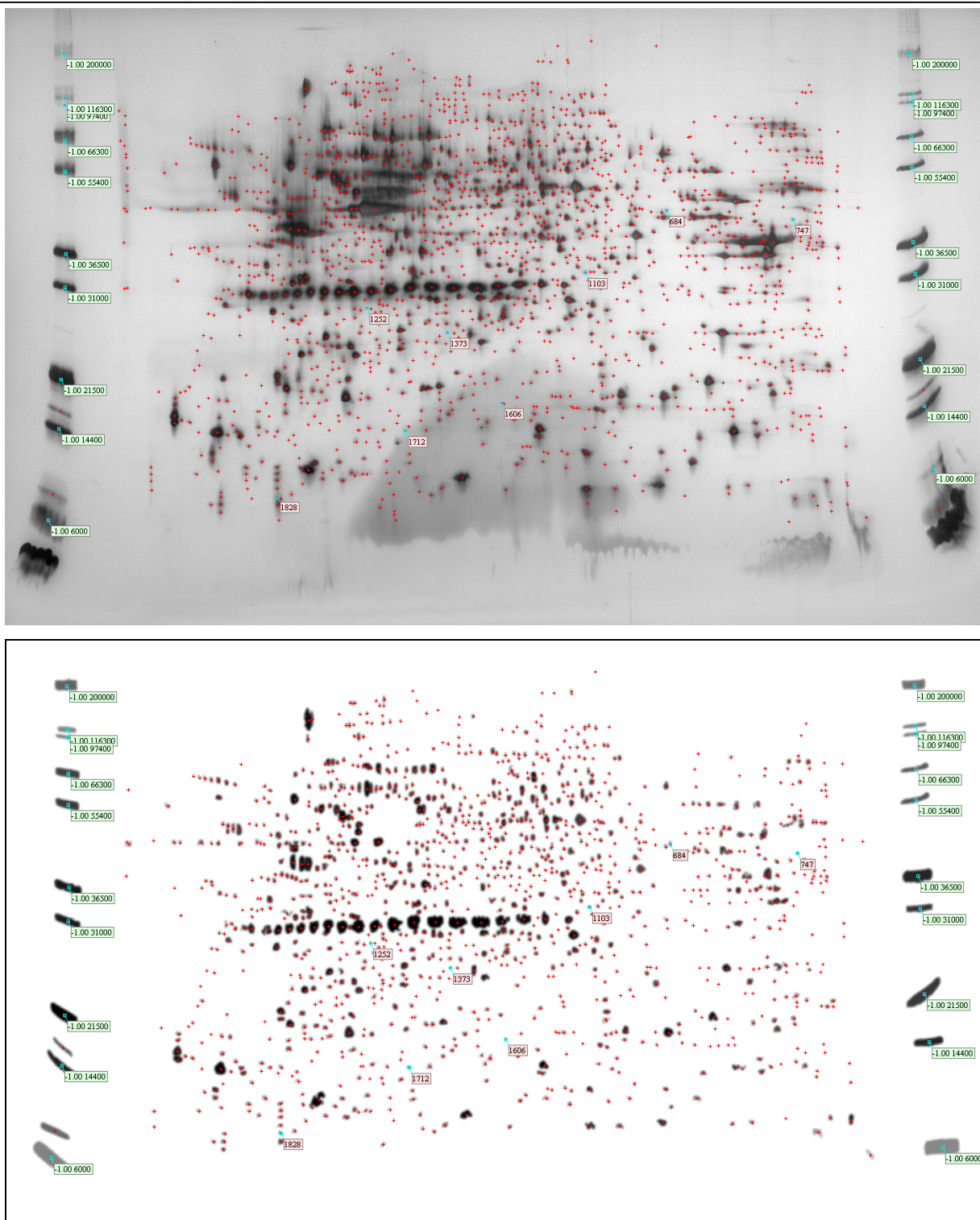


Abbildung 22: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC-1M81. Die Proteine wurden in der 1. Dimension zwischen pH 3 (linke Seite) und pH 10 (rechte Seite) aufgetrennt. Die roten Kreuze geben die Mittelpunkte der von Melanie identifizierten Proteinspots an. Die bei 31kDa nebeneinander liegenden Proteinspots gehören zu dem internen Standard für den pI. Es handelt sich um verschiedenen Carbamylierungsstufen der Carbanhydrase mit einem pI von 4,8 bis 6,7. Die hellgelben Fahnen geben das MW der Markerproteine an und die rosa Fahnen die Nummern der Spots aus der Tabelle 18 und der Tabelle 19.

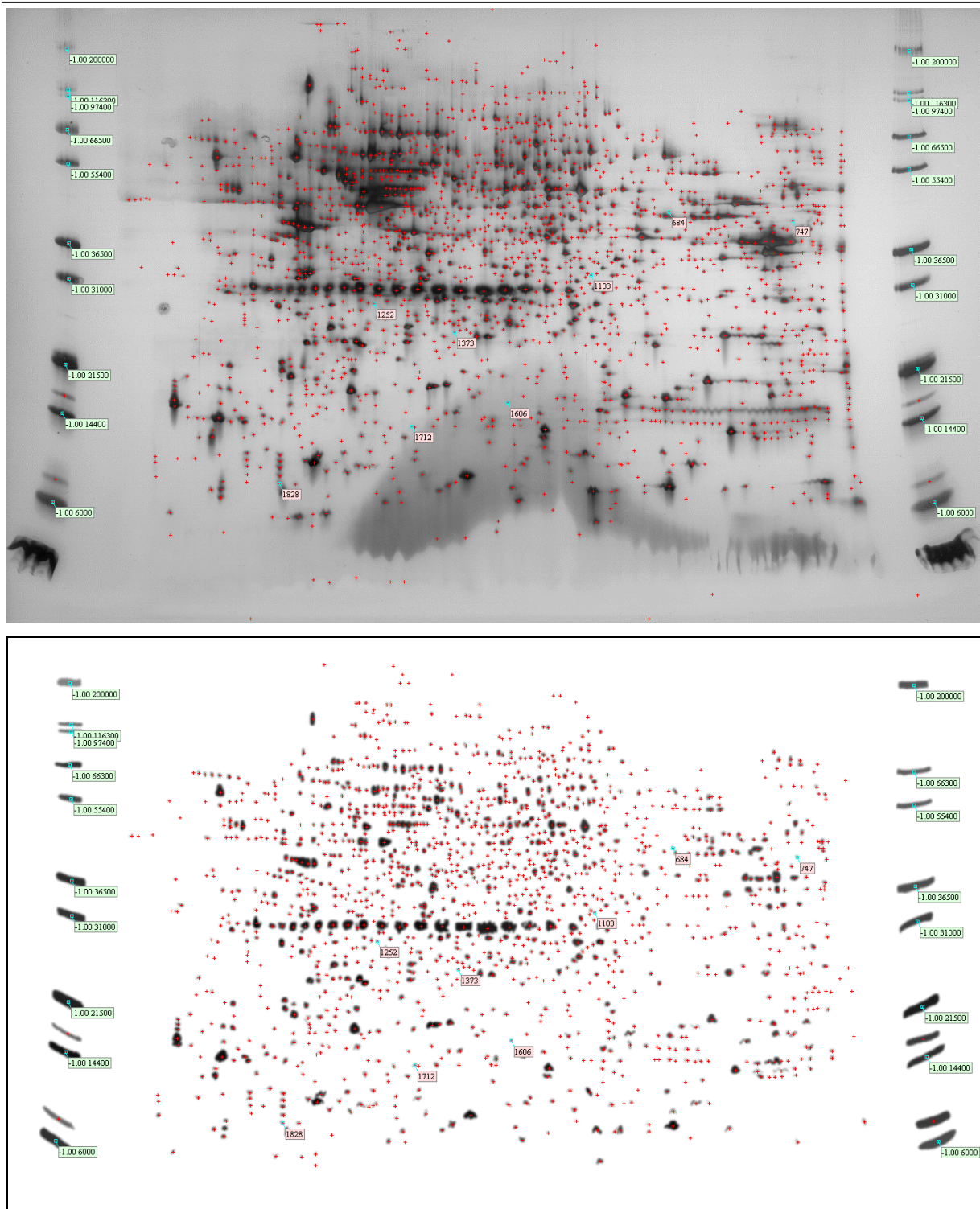


Abbildung 23: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC-1M88. Die Proteine wurden in der 1. Dimension zwischen pH 3 (linke Seite) und pH 10 (rechte Seite) aufgetrennt. Die roten Kreuze geben die Mittelpunkte der von Melanie identifizierten Proteinspots an. Die bei 31kDa nebeneinander liegenden Proteinspots gehören zu dem internen Standard für den pI. Es handelt sich um verschiedenen Carbamylierungsstufen der Carbanhydrase mit einem pI von 4,8 bis 6,7. Die hellgelben Fahnen geben das MW der Markerproteine an und die rosa Fahnen die Nummern der Spots aus der Tabelle 18 und der Tabelle 19.

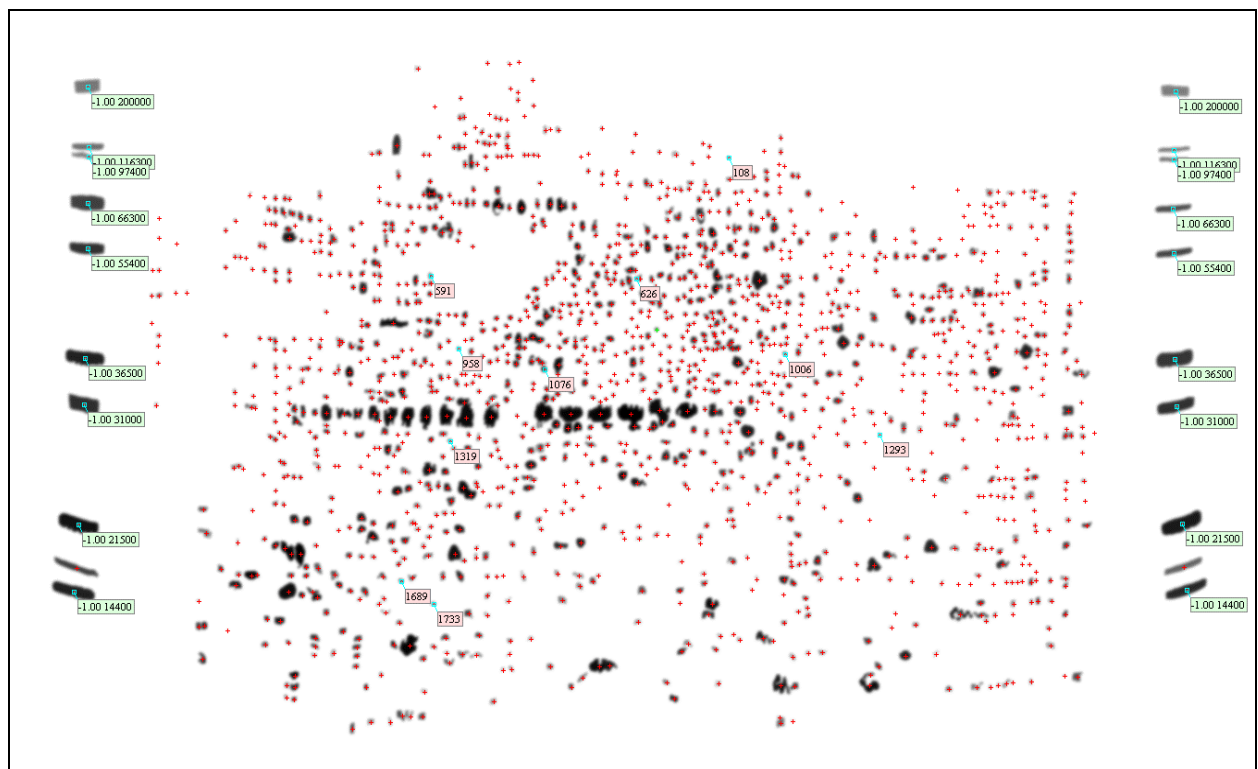
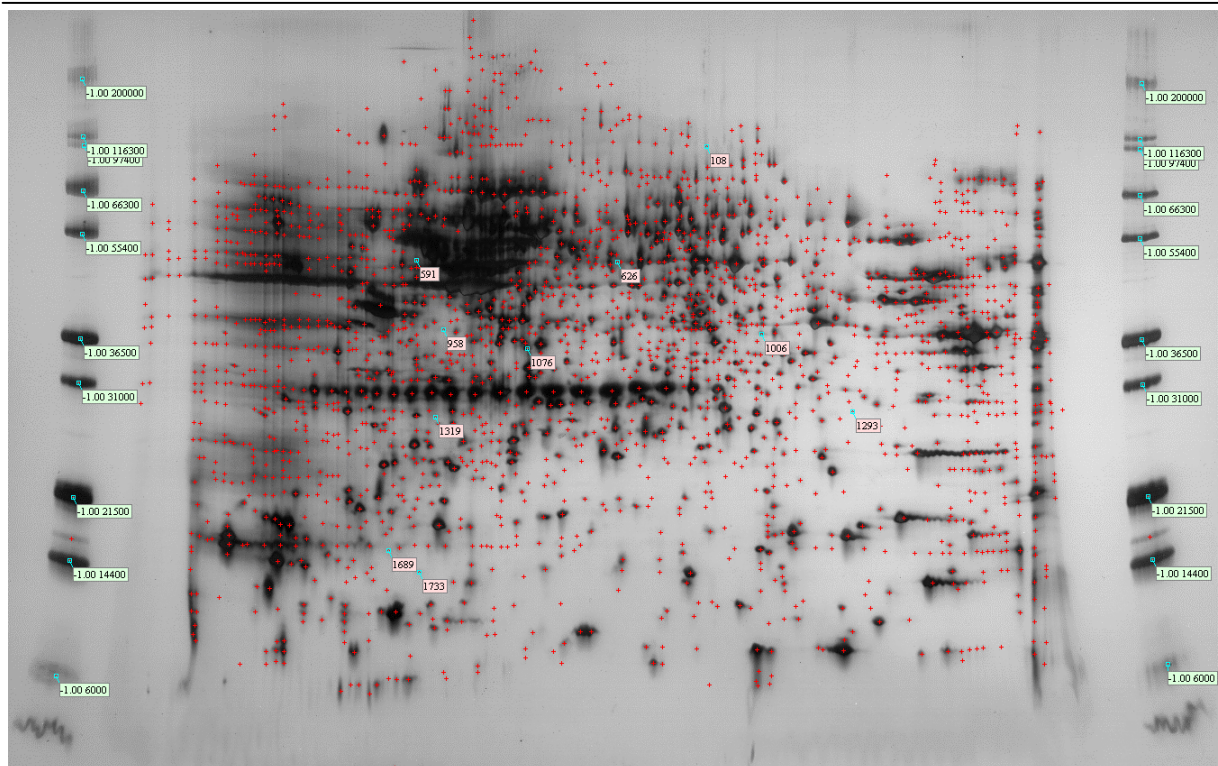


Abbildung 24: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC1-1. Die Proteine wurden in der 1. Dimension zwischen pH 3 (linke Seite) und pH 10 (rechte Seite) aufgetrennt. Die roten Kreuze geben die Mittelpunkte der von Melanie identifizierten Proteinspots an. Die bei 31kDa nebeneinander liegenden Proteinspots gehören zu dem internen Standard für den pI. Es handelt sich um verschiedenen Carbamylierungsstufen der Carbanhydrase mit einem pI von 4,8 bis 6,7. Die hellgelben Fahnen geben das MW der Markerproteine an und die rosa Fahnen die Nummern der Spots aus der Tabelle 18 und der Tabelle 19.

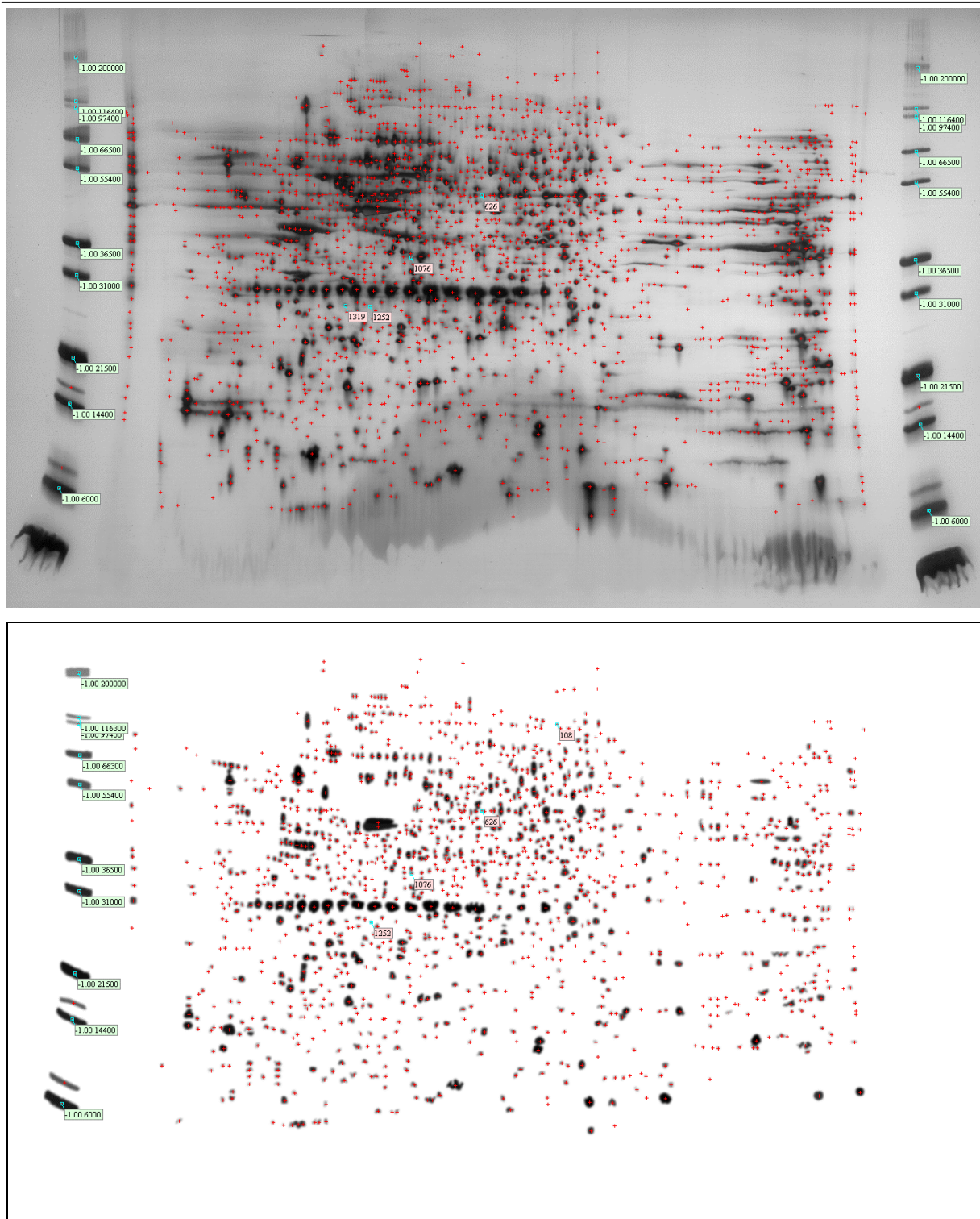


Abbildung 25: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie JEG-3. Die Proteine wurden in der 1. Dimension zwischen pH 3 (linke Seite) und pH 10 (rechte Seite) aufgetrennt. Die roten Kreuze geben die Mittelpunkte der von Melanie identifizierten Proteinspots an. Die bei 31kDa nebeneinander liegenden Proteinspots gehören zu dem internen Standard für den pI. Es handelt sich um verschiedenen Carbamylierungsstufen der Carbanhydrase mit einem pI von 4,8 bis 6,7. Die hellgelben Fahnen geben das MW der Markerproteine an und die rosa Fahnen die Nummern der Spots aus der Tabelle 18 und der Tabelle 19.

Im pH-Bereich von 3-10 sind achtzehn Proteinspots als differentiell exprimiert identifiziert worden. Acht dieser Spots kommen nur in den stark tumorigenen Hybridzelllinien AC-1M81 und AC-1M88 vor, zehn nur in der nicht tumorigenen Hybridzelllinie AC-1M59 und der schwach tumorigenen Zelllinie AC1-1 (s. Tabelle 18 und Tabelle 19).

Auffällig ist hierbei, daß nur ein Proteinspot, der zu den tumorigenen Zelllinien gehört, auch in JEG-3 exprimiert wird. Die anderen Spots aus Tabelle 18 kommen in JEG-3 nicht vor. Auf der anderen Seite werden vier Proteinspots, die zu den nicht bzw. schwach tumorigenen Zelllinien gehören, auch in JEG-3 exprimiert (s. Tabelle 19).

Tabelle 18: Meßwerte und Statistik der Proteinspots, die in den tumorigenen Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88, aber nicht in den nicht bzw. schwach tumorigenen Zelllinien AC-1M59 und AC1-1 exprimiert sind. Die Meßwerte geben den Anteil eines Spots am Gesamtvolumen aller Spots eines Gels in % an. In Spalte 2 (Mitte) ist der Mittelpunkt zwischen den beiden Extremwerten angegeben und in Spalte 3 (M.A.D.) der Mittelwert aller Differenzen zwischen den Meßwerten und dem Wert aus Spalte 2.

Spot	Mitte	M.A.D	AC-1M32	AC-1M46	AC-1M59	AC-1M81	AC-1M88	AC1-1	JEG-3
684	0,01995	0,01652	0	0,03558	0	0,03991	0,01971	0	0
747	0,10341	0,09728	0	0,20682	0	0,02238	0,02055	0	0
1103	0,01472	0,01298	0	0	0	0,02943	0,01213	0	0
1252	0,00930	0,00759	0	0	0	0,01214	0,01859	0	0,01309
1373	0,00886	0,00817	0	0	0	0,01772	0,01287	0	0
1606	0,01169	0,01025	0	0	0	0,01329	0,02338	0	0
1712	0,02029	0,02029	0	0	0	0,04058	0,04056	0	0
1828	0,02229	0,02212	0	0	0	0,04339	0,04458	0	0

Tabelle 19: Meßwerte und Statistik der Proteinspots, die in den nicht bzw. schwach tumorigenen Zelllinien AC-1M59 und AC1-1, aber nicht in den tumorigenen Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88 exprimiert sind. Die Meßwerte geben den Anteil eines Spots am Gesamtvolumen aller Spots eines Gels in % an. In Spalte 2 (Mitte) ist der Mittelpunkt zwischen den beiden Extremwerten angegeben und in Spalte 3 (M.A.D.) der Mittelwert aller Differenzen zwischen den Meßwerten und dem Wert aus Spalte 2.

Spot	Mitte	M.A.D	AC-1M32	AC-1M46	AC-1M59	AC-1M81	AC-1M88	AC1-1	JEG-3
108	0,00960	0,00762	0	0	0,01920	0	0	0,01257	0,01196
591	0,01919	0,01476	0	0,01487	0,02220	0	0	0,03838	0
626	0,00948	0,00884	0	0	0,01896	0	0	0,01568	0,01775
958	0,01539	0,01276	0	0,02595	0,03077	0	0	0,01720	0
1006	0,01354	0,00946	0,01719	0,00880	0,00991	0	0	0,02709	0
1076	0,04518	0,02634	0,09035	0,05419	0,04862	0	0	0,07716	0,04079
1293	0,00625	0,00567	0	0	0,00848	0	0	0,01250	0
1319	0,01454	0,01238	0	0	0,01765	0	0	0,02539	0,02908
1689	0,01938	0,01850	0	0	0,00618	0	0	0,03877	0
1733	0,01445	0,01261	0	0	0,01604	0	0	0,02889	0

Die meisten Proteine der Zelllysate haben einen IEP im sauren Bereich von vier bis sieben. Dieser Bereich kann in den Übersichtsgelen mit einem pH-Bereich von drei bis zehn in der ersten Dimension nicht aufgelöst werden. Aus diesem Grund sind von den Zelllinien AC-1M59, AC-1M81, AC-1M88 und AC1-1 Gele mit einem pH- Bereich von 4 bis 7 in der ersten Dimension hergestellt worden.

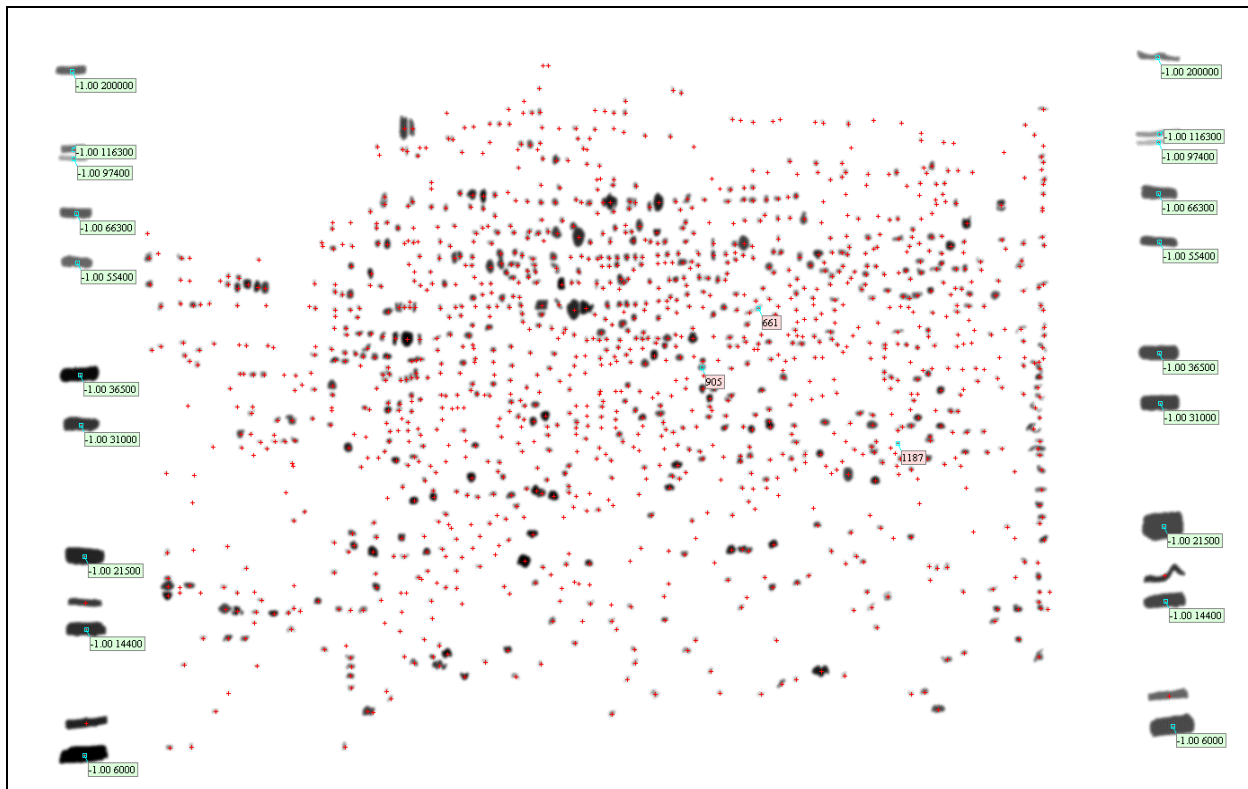
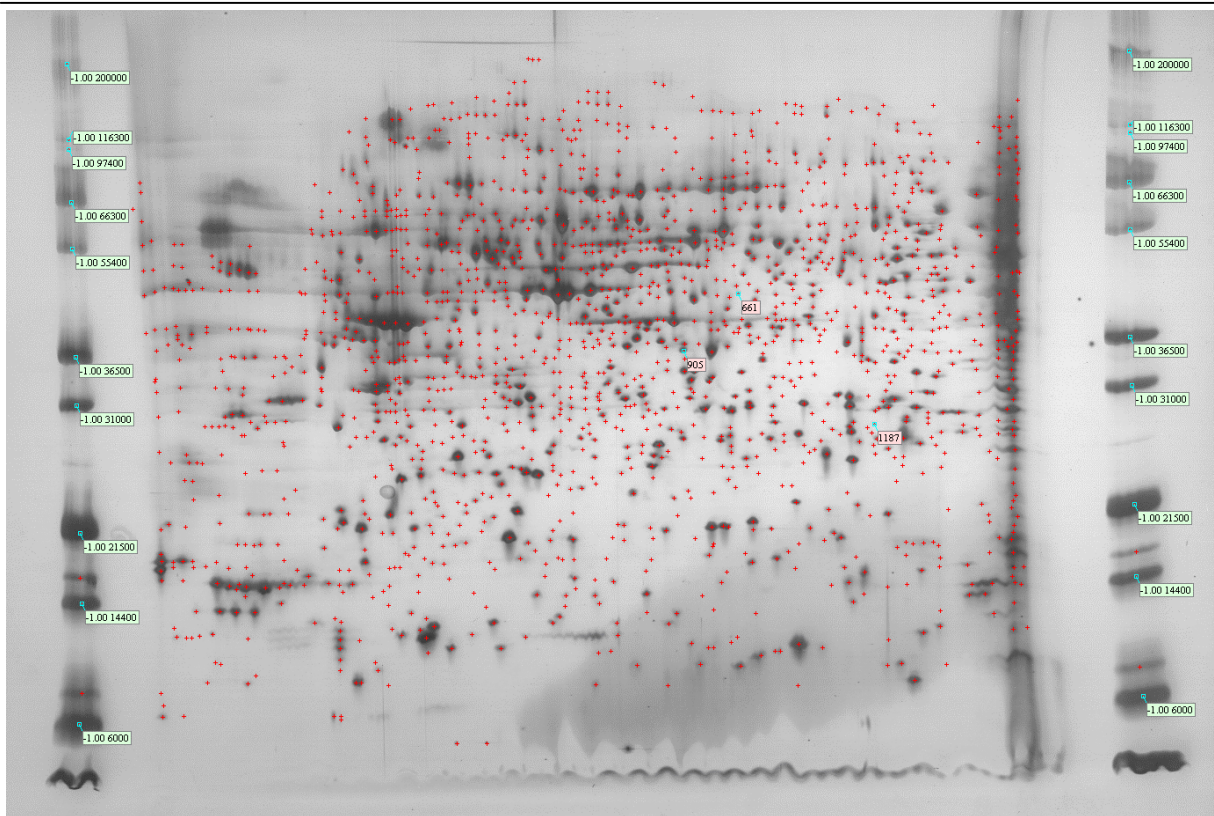


Abbildung 26: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC-1M59. Die Proteine wurden in der 1. Dimension zwischen pH 4 (linke Seite) und pH 7 (rechte Seite) aufgetrennt. Die roten Kreuze geben die Mittelpunkte der von Melanie identifizierten Proteinspots an. Die hellgelben Fahnen geben das MW der Markerproteine an und die rosa Fahnen die Nummern der Spots aus der Tabelle 20 und der Tabelle 21.

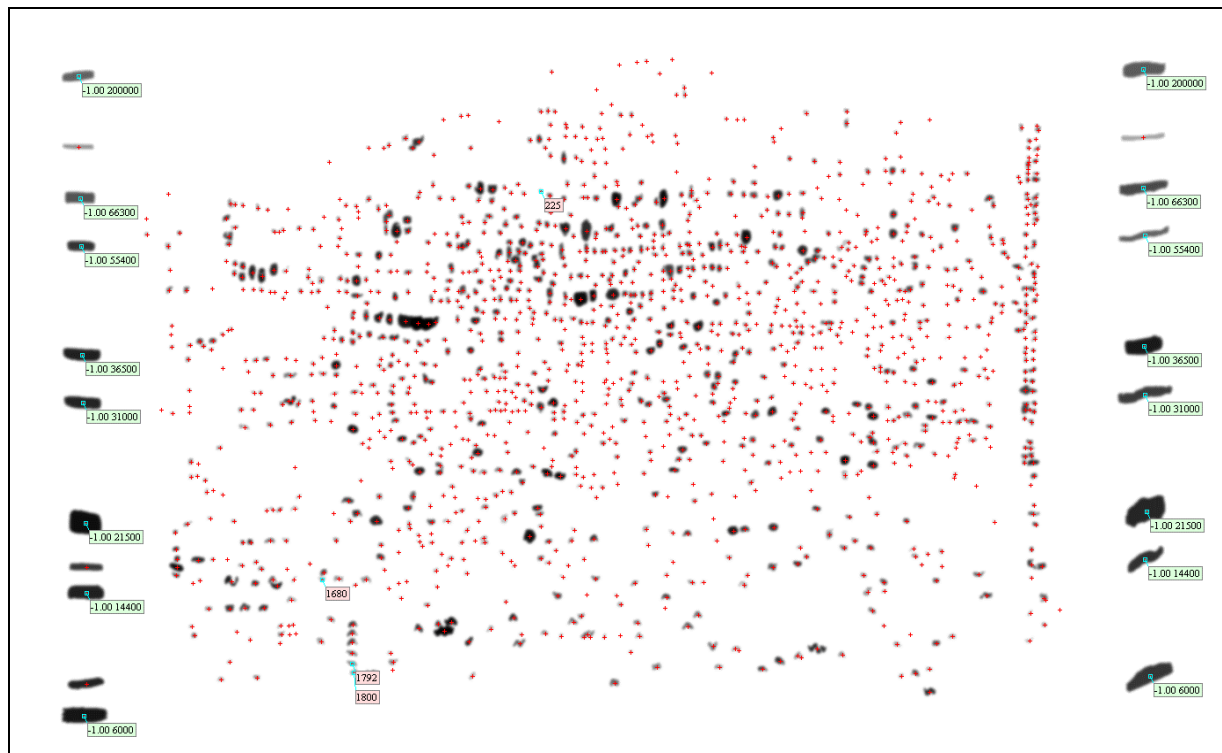
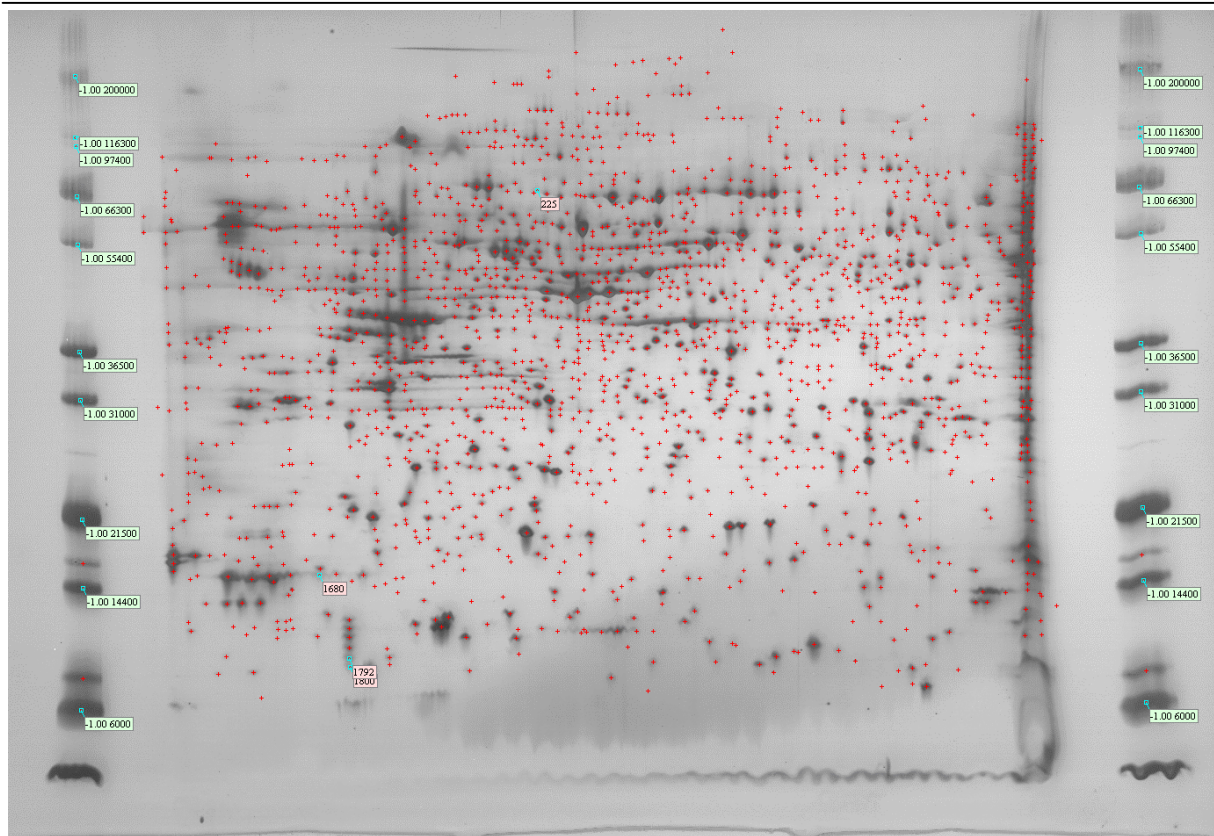


Abbildung 27: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC-1M81. Die Proteine wurden in der 1. Dimension zwischen pH 4 (linke Seite) und pH 7 (rechte Seite) aufgetrennt. Die roten Kreuze geben die Mittelpunkte der von Melanie identifizierten Proteinspots an. Die hellgelben Fahnen geben das MW der Markerproteine an und die rosa Fahnen die Nummern der Spots aus der Tabelle 20 und der Tabelle 21.

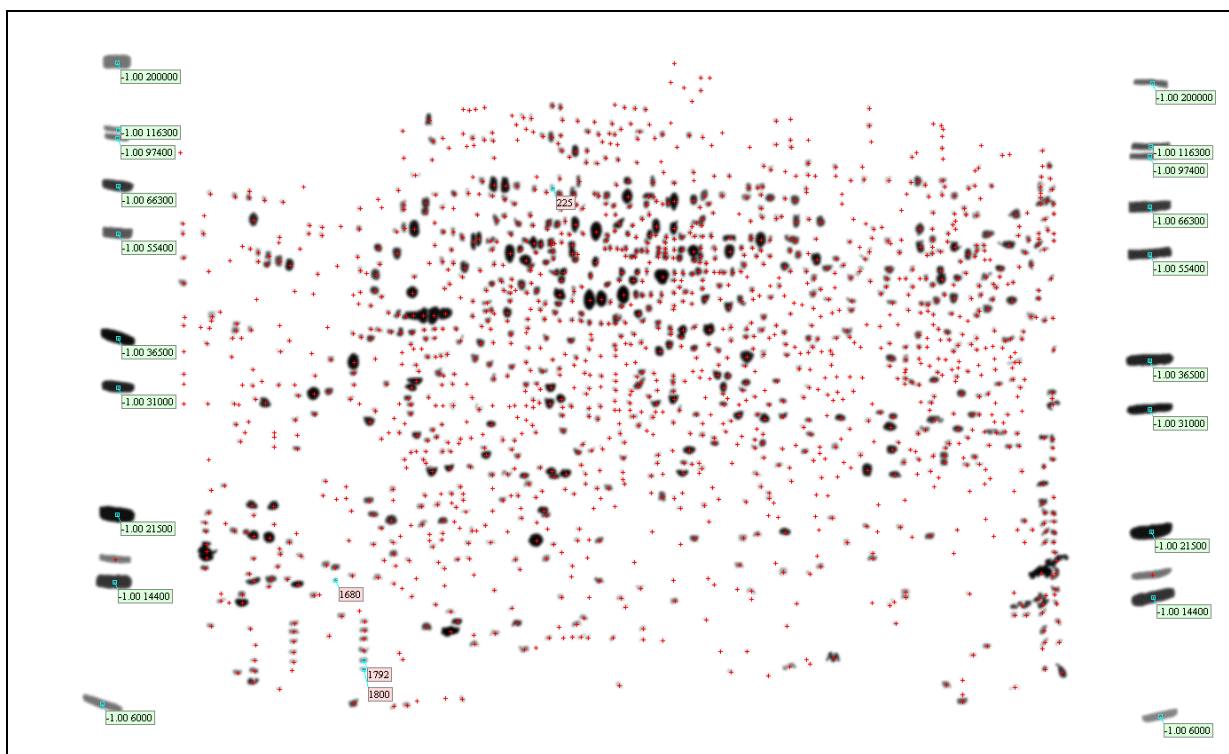
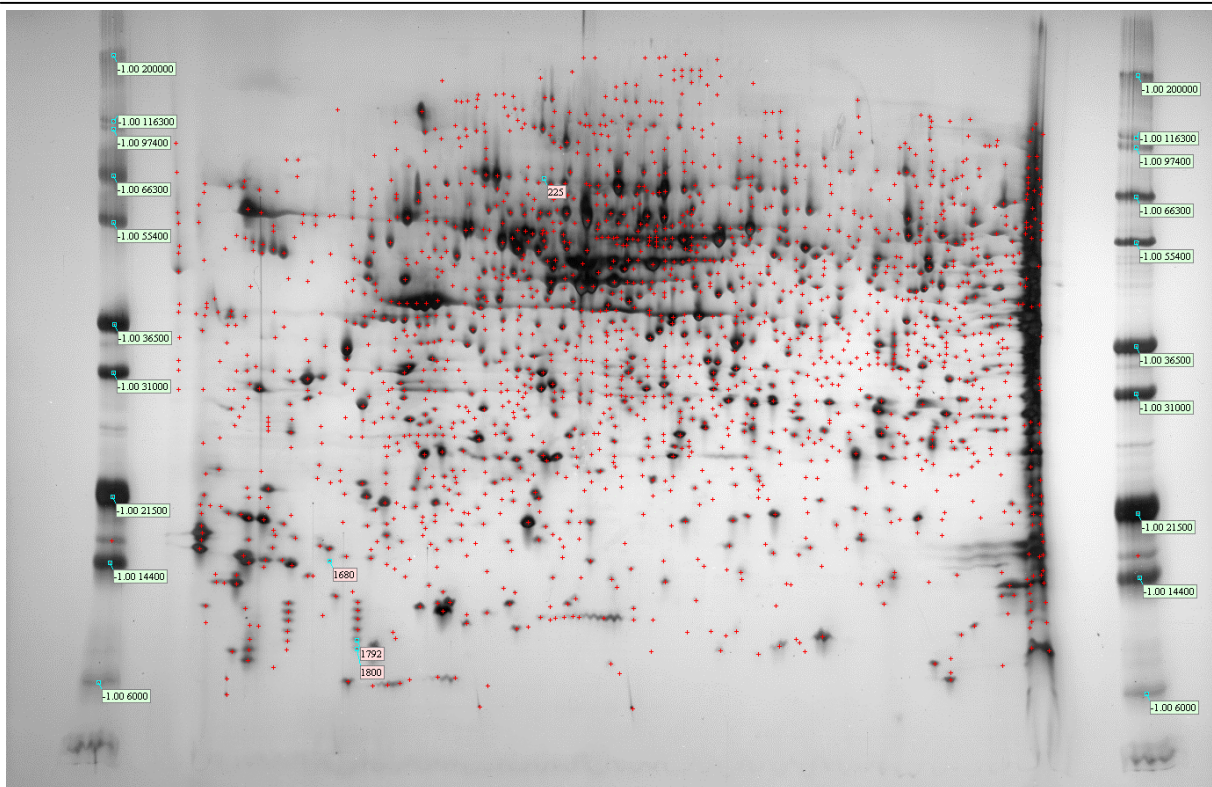


Abbildung 28: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC-1M88. Die Proteine wurden in der 1. Dimension zwischen pH 4 (linke Seite) und pH 7 (rechte Seite) aufgetrennt. Das MW der Markerproteine ist angegeben in Da. Die Fahnen geben die Nummern der Spots aus der Tabelle 20 und der Tabelle 21 an.

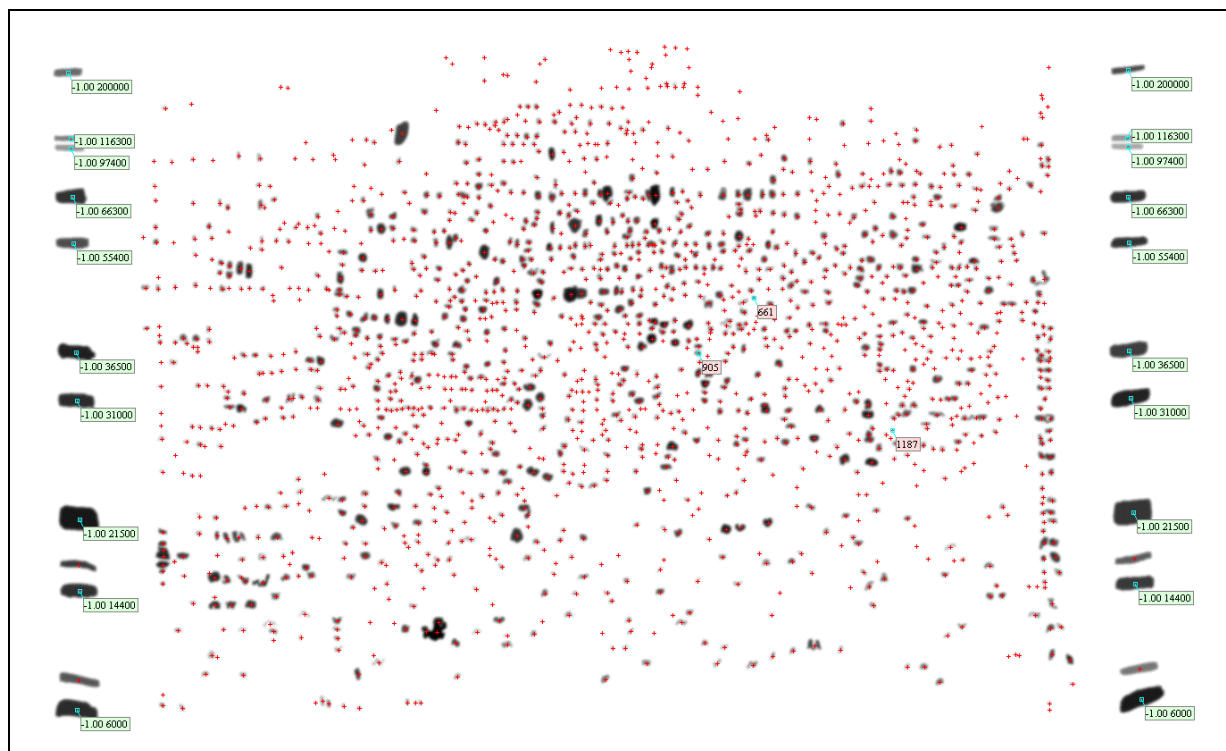
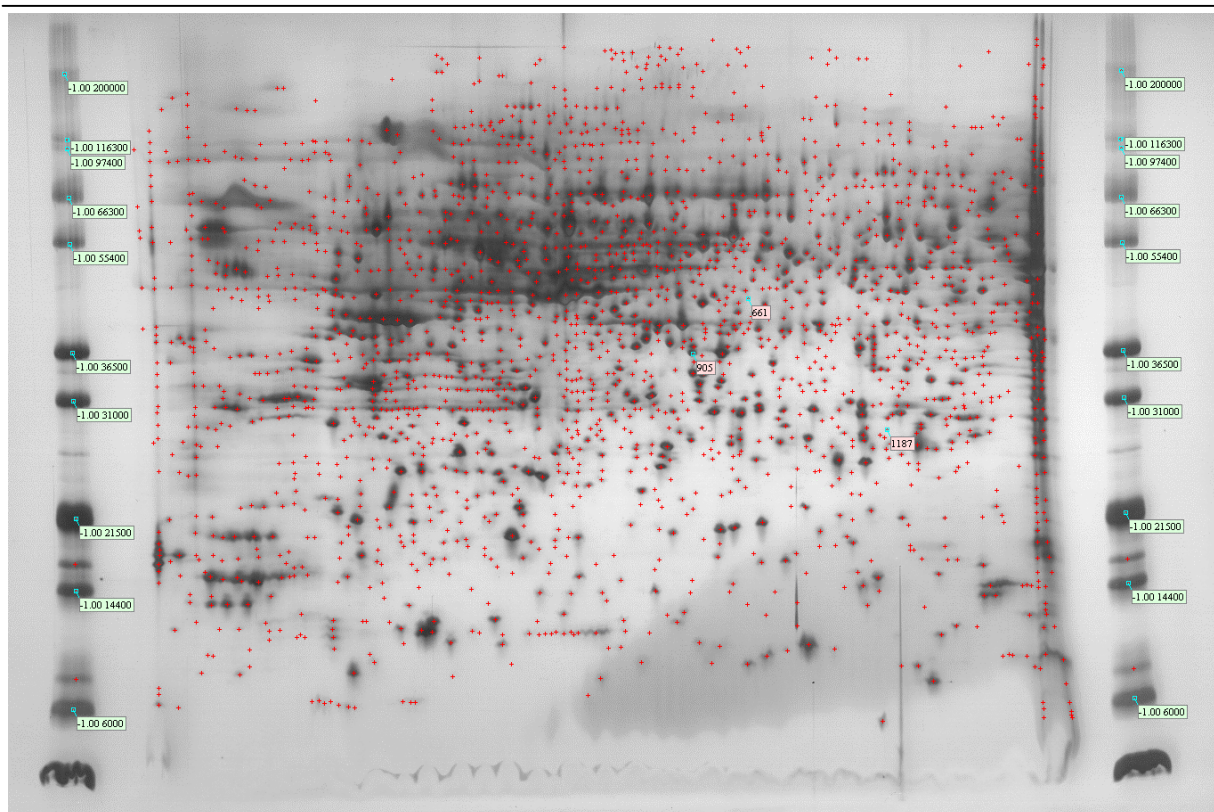


Abbildung 29: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC1-1. Die Proteine wurden in der 1. Dimension zwischen pH 4 (linke Seite) und pH 7 (rechte Seite) aufgetrennt. Die roten Kreuze geben die Mittelpunkte der von Melanie identifizierten Proteinspots an. Die hellgelben Fahnen geben das MW der Markerproteine an und die rosa Fahnen die Nummern der Spots aus der Tabelle 20 und der Tabelle 21.

Im pH-Bereich vier bis sieben sind sieben Spots als differentiell exprimiert identifiziert worden. Vier der Proteinspots werden nur in den tumorigenen Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88 gefunden und drei Spots nur in der nicht tumorigenen Zelllinie AC-1M59 bzw. der schwach tumorigenen Zelllinie AC1-1.

Von den drei bzw. vier gefundenen Spots wurde je einer identifiziert.

Tabelle 20: Meßwerte und Statistik der Proteinspots, die in den tumorigenen Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88, aber nicht in den nicht bzw. schwach tumorigenen Zelllinien AC-1M59 und AC1-1 exprimiert sind. Die Meßwerte geben den Anteil eines Spots am Gesamtvolumen aller Spots eines Gels in % an. In Spalte 2 (Mitte) ist der Mittelpunkt zwischen den beiden Extremwerten angegeben und in Spalte 3 (M.A.D.) der Mittelwert aller Differenzen zwischen den Meßwerten und dem Wert aus Spalte 2.

Spot	Mitte	M.A.D	AC-1M59	AC-1M81	AC-1M88	AC1-1
225	0,01601	0,01269	0	0,01872	0,03202	0
1680	0,01944	0,01513	0	0,03889	0,01725	0
1792	0,03812	0,03389	0	0,07624	0,05933	0
1800	0,02185	0,01771	0	0,04369	0,02714	0

Tabelle 21: Meßwerte und Statistik der Proteinspots, die in den nicht bzw. schwach tumorigenen Zelllinien AC-1M59 und AC1-1, aber nicht in den tumorigenen Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88 exprimiert sind. Die Meßwerte geben den Anteil eines Spots am Gesamtvolumen aller Spots eines Gels in % an. In Spalte 2 (Mitte) ist der Mittelpunkt zwischen den beiden Extremwerten angegeben und in Spalte 3 (M.A.D.) der Mittelwert aller Differenzen zwischen den Meßwerten und dem Wert aus Spalte 2.

Spot	Mitte	M.A.D	AC-1M59	AC-1M81	AC-1M88	AC1-1
661	0,02684	0,02321	0,05368	0	0	0,01451
905	0,04850	0,03882	0,09699	0	0	0,05831
1187	0,00478	0,00448	0,00956	0	0	0,00837

3.5.2 Proteinidentifizierung

Der Spot 1076 (pH 3-10) bzw. 905 (pH 4-7) der nicht tumorigenen Zelllinie AC-1M59 wurde über den Peptidmassen-Fingerabdruck als Annexin III identifiziert.

Die Datenbanksuche wurde mit den folgenden Parametern durchgeführt:

Spezies : Homo sapiens

Datenbanken : SWISS-PROT und TrEMBL

IEP-Bereich : 4,8-6,8

MW-Bereich : 28800-43200

Peptidmassen : 893.2826 910.2570 926.4857 943.4572 971.5158 1018.5400
 1045.5663 1148.6180 1222.6067 1231.5688 1240.8976
 1486.8062 1534.6996 1586.7188 1697.8243 1791.7981
 1882.8732 2007.0731 2212.1167 2195.6219 2224.3272
 2239.5904 2301.1996 2473.2804 2706.2790 3064.3670
 3082.4529 3103.4175 3407.9144

Toleranz : $\pm 0,2$ Da

Minimalzahl
 übereinstimmender Peptide : 4

Massen der auftretenden
 Aminosäurereste : Monoisotopic

Ladung der Peptide : $[M+H]^+$

Enzym : Trypsin

Beim tryptischen Verdau des Proteins ist das Fehlen von zwei Schnittstellen erlaubt.

Modifikationen : Cystein derivatisiert mit Iodacetamid zu Carboxyamidomethylcystein (Cys_Cam)

Tabelle 22: Im Massenspektrum gefundene Massen, die dazu korrelierenden theoretischen Massen, die Differenz zwischen den beiden, nicht geschnittene Trypsinschnittstellen (#MC), Modifikationen und Position und Sequenz der Peptide für Annexin III.

gefundene Masse	korrelierende Masse	Δ Masse (Dalton)	Δ #MC	Modifikationen	Position	Peptid
943.4572	943.4520	-0.0051	0		211-217	LTFDEYR
1018.5400	1018.5316	-0.0083	0		249-257	NTPAFLAER
1222.6067	1222.6062	-0.0004	0		264-274	GIGTDEFTLNR
1534.6996	1534.8224	0.1228	1		261-274	ALKGIGTDEFT LNR
1882.8732	1882.9004	0.0272	1	Cys_CAM: 202	190-204	WGTDKDFTEI LCLR

Die reverse Transkription mit anschließender Annexin III spezifischer PCR ergab, daß die mRNA für das Protein in den Zelllinien AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59 und AC1-1 vorhanden ist, nicht aber in den Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88 (s. Abbildung 30).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

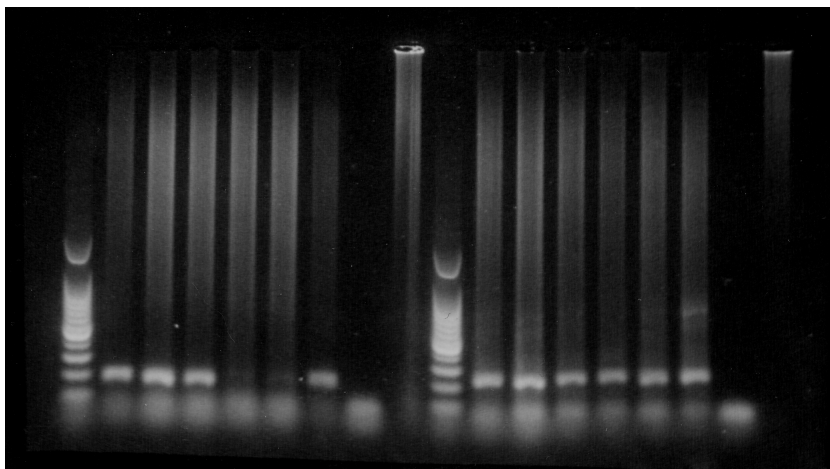


Abbildung 30: Nachweis der Annexin III mRNA in den Zelllinien AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59, AC-1M81, AC-1M88 und AC1-1. Zur Kontrolle der PCR wurde ebenfalls ein Fragment des ADAM 19 Gens amplifiziert. Die erwartete Größe für ADAM-19 beträgt 254 Bp und für Annexin III 185 Bp. Beide PCR Produkte zeigen die richtige Größe. Reihe 1: 100Bp Leiter; Reihe 2-7: Annexin III PCR mit AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59, AC-1M81, AC-1M88, AC1-1; Reihe 8: Kontrolle ohne cDNA; Reihe 9: Kontrolle ohne Primer; Reihe 10: 100Bp Leiter; Reihe 11-16: ADAM19 PCR mit AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59, AC-1M81, AC-1M88, AC1-1; Reihe 17: Kontrolle ohne cDNA; Reihe 18: Kontrolle ohne Primer.

Der Spot 1828 (pH 3-10) bzw. 1792 (pH4-7) der tumorigenen Zelllinie AC-1M88 konnte nicht durch Peptidmassen-Fingerabdruck identifiziert werden, weil das erhaltene Massenspektrum

nicht in den Datenbanken vorhanden ist. Deshalb wurde dieser Spot mittels Peptidfragment Sequenzierung (LC-ESI-MS/MS) untersucht und durch diese Methode als Saposin D identifiziert.

Die Datenbanksuche wurde mit den folgenden Parametern durchgeführt:

Spezies : Homo sapiens
 Datenbank : SWISS-PROT
 IEP-Bereich : 4,6
 MW-Bereich : 8400
 Peptidmassen : 804.2734 835.4598 842.5039 956.3883 963.5615 1006.4894
 1014.5803 1045.5640 1311.6051 1333.5950 1349.5707
 1435.7027 1459.7014 2255.0654 2299.1599
 Toleranz : ± 50 ppm
 Minimalzahl
 übereinstimmender Peptide : 3
 Massen der auftretenden
 Aminosäurereste : Monoisotopic
 Ladung der Peptide : $[M+H]^+$
 Enzym : Trypsin
 Beim tryptischen Verdau des Proteins ist das Fehlen von einer Schnittstellen erlaubt.
 Modifikationen : Cystein derivatisiert mit Iodacetamid zu Carboxyamidomethylcystein (Cys_Cam) und Methionin in oxidierter Form.

Tabelle 23: Im Massenspektrum gefundene Massen, die dazu korrelierenden theoretischen Massen, die Differenz zwischen den beiden, nicht geschnittene Trypsinschnittstellen (#MC), Modifikationen und Position und Sequenz der Peptide für Saposin D.

gefundene Masse	korrelierende Masse	Δ Masse (ppm)	Δ #MC	Modifikationen	Position	Peptid
835.4598	835.467	8.87	0		415-421	LVGYLDR
963.5615	963.562	0.70	1		414-421	KLVGYLDR
1014.5803	1014.583	2.66	0		430-438	QEILAALEK
1311.6051	1311.604	-0.98	0	1xCys_Cam	439-449	GCSFLPDPYQ K

Die reverse Transkription mit anschließender Saposin D spezifischer PCR ergab, daß im Gegensatz zum Protein, welches nur in AC-1M81 und AC-1M88 vorhanden, die mRNA für

das Protein in allen untersuchten Zelllinien (AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59, AC-1M81, AC-1M88 und AC1-1) vorhanden ist (s. Abbildung 31).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

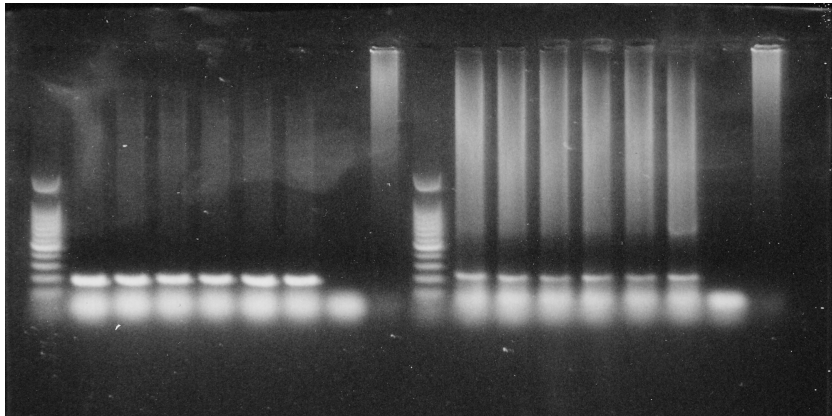


Abbildung 31: Nachweis der Saposin D mRNA in den Zelllinien AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59, AC-1M81, AC-1M88 und AC1-1. Zur Kontrolle der PCR wurde ebenfalls ein Fragment des ADAM 19 Gens amplifiziert. Die erwartete Größe für ADAM-19 beträgt 254 Bp und für Saposin D 218 Bp. Beide PCR Produkte zeigen die richtige Größe. Reihe 1: 100Bp Leiter; Reihe 2-7: Saposin D PCR mit AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59, AC-1M81, AC-1M88, AC1-1; Reihe 8: Kontrolle ohne cDNA; Reihe 9: Kontrolle ohne Primer; Reihe 10: 100Bp Leiter; Reihe 11-16: ADAM19 PCR mit AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59, AC-1M81, AC-1M88, AC1-1; Reihe 17: Kontrolle ohne cDNA; Reihe 18: Kontrolle ohne Primer.

3.6 Zusammenfassung der differentiell exprimierten Gene/Proteine

Mit Hilfe der cDNA-Arrays und der 2-D PAGE konnten 16 Gene bzw. Proteine identifiziert werden, die in den tumorigenen bzw. nicht tumorigenen Zelllinien differentiell exprimiert sind. Folgende Gene und Proteine wurden in der nicht tumorigenen Zelllinien AC-1M59 und/oder der schwach tumorigenen Zelllinie AC1-1, aber nicht in den tumorigenen Hybriden AC-1M81 und AC-1M88 exprimiert:

Tabelle 24: Gene, die mit dem nicht bzw. schwach tumorigenen Phänotyp der Zelllinien AC-1M59 und AC1-1 korrelieren. Angegeben ist der Genname, die Genbankaccessionsnummer, die Methode, mit der die Gene identifiziert wurden und in welcher der beiden Zelllinien die Gene exprimiert sind.

Genname	Accessionsnr.	Methode	Expression in	
			AC-1M59	AC1-1
Annexin III	M20560	2-D PAGE	+	+
C-SRC	HT2291	cDNA-Array	-	+
Faciogenitales Dysplasie Protein	U11690	cDNA-Array	+	+
HSPG2	M85289	cDNA-Array	+	+
MMP-2	J03210	cDNA-Array	+	+
Netrin-2	U86759	cDNA-Array	+	+
nm23-H4	Y07604	cDNA-Array	+	+
RXRA	X52773	cDNA-Array	+	+
Smoothened	U84401	cDNA-Array	-	+
STAT5B	U47686	cDNA-Array	-	+
VEGFR-3	X68203	cDNA-Array	-	+

Annexin III bindet in Abhängigkeit von Ca^{2+} an Phospholipide (Raynal and Pollard, 1994). Das Protein wird stark exprimiert in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Le, V *et al.*, 1992).

Das Protein des C-SRC-Gens ist ein Protoonkogen (Sakaguchi *et al.*, 1985). Eine erhöhte Tyrosin-Kinase-Aktivität des Proteins findet man in Colonkarzinomen (Irby *et al.*, 1999).

Das Fehlen des Dysplasie Proteins führt zum Krankheitsbild des X-Chromosom gekoppelten, rezessiven Aarskog-Scott-Syndroms (Pasteris *et al.*, 1994).

Heparansulfatproteoglycan (HSPG2) kommt ubiquitär in den Basalmembranen vor und kann das Wachstum von Tumoren und Angiogenese induzieren (Dodge *et al.*, 1991; Sharma *et al.*, 1998).

Gelatinase A (MMP-2) spaltet spezifisch Kollagen IV, den Hauptbestandteil der Basalmembran. Die Fähigkeit von Tumorzellen Metastasen zu bilden korreliert mit der Aktivität dieses Enzyms (Koshiba *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1992).

Netrine sind chemotropische Faktoren, die das Wachstum der Axone zu ihren Zielen lenken. Die RNA wurde bis jetzt nur aus dem Rückenmark isoliert (Kennedy *et al.*, 1994).

Das Protein nm23-H4 kommt ubiquitär vor und unterdrückt vermutlich die Metastasierung von Tumoren (Milon *et al.*, 1997).

Retinoinsäure-Rezeptor α spielt unter anderem eine Rolle bei der Herzentwicklung. Retinoinsäure kann die Herzmuskelzellenhypertrophie unterdrücken (Zhou *et al.*, 1995).

Smoothed ist ein Protein, welches zuerst in der Drosophila Entwicklung beschrieben wurde (Stone *et al.*, 1996). In Vertebraten bewirkt es über den Hedgehog-Signaltransduktionsweg die Entwicklung der linken Körperseite (Zhang *et al.*, 2001). Es handelt sich um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, dessen konstitutive Aktivierung zu Basalzellenkarzinom in der Epidermis führen kann (Villavicencio *et al.*, 2000).

Das Protein STAT5B gehört zu dem JAK/STAT-Signaltransduktionsweg. Nach der Aktivierung durch Phosphorylierung wandert es in den Kern, wo es als Transkriptionsregulator wirkt (Liu *et al.*, 1995). Dauerhafte Aktivierung von STAT5B führt zu einem weiten Spektrum hämatologischer Karzinome (Schwaller *et al.*, 2000).

Der VEGF-Rezeptor 3 spielt embryonal eine Rolle bei der Entwicklung der Blutgefäße (Dumont *et al.*, 1998). Im adulten Organismus ist er bei der Stimulation des Wachstums von Lymphgefäßen beteiligt (Kaipainen *et al.*, 1995).

Von den differentiell exprimierten Genen wurden die folgenden fünf in den tumorigenen Hybriden AC-1M81 und AC-1M88, aber nicht in den nicht bzw. schwach tumorigenen Zelllinien AC-1M59 und AC1-1 exprimiert. In der tumorigenen Choriokarzinomzelllinie JEG-3 wurde keines der fünf Gene exprimiert.

Tabelle 25: Gene, die mit dem tumorigenen Phänotyp der Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88 korrelieren. Angegeben ist der Genname, die Genbankaccessionsnummer und die Methode, mit der die Gene identifiziert wurden.

Genname	Accessionsnr	Methode
CD40R	L07414	cDNA-Array
Interleukin-17	U32659	cDNA-Array
RBQ1	X85133	cDNA-Array
Saposin D	M32221	2-D PAGE
Zytokeratin 5	M21389	cDNA-Array

Der CD40-Rezeptor wird in reifen B-Zellen, dendritischen Zellen, und in verschiedenen Primärkarzinomen exprimiert (Paulie *et al.*, 1989; Schriever *et al.*, 1989). Die Interaktion mit dem CD40-Liganden ist kritisch für die Aktivierung der Immunantwort (Kato *et al.*, 1998).

Zytokeratin 5 ist ein Protein des Zytoskeletts, welches vor allem in den Zellen der Epidermis vorkommt (Lersch and Fuchs, 1988). Außerdem wird Zytokeratin 5 in normalen Brustdrüsenepithelzellen exprimiert, nicht aber in den Tumoren (Trask *et al.*, 1990).

Interleukin-17 findet man nur in aktivierten T-Gedächtniszellen. Es induziert die Produktion von proinflammatorischen und hematopoetischen Zytokinen (Yao *et al.*, 1995).

RBQ1 bindet an den Retinoblastoma Suppressor (Sakai *et al.*, 1995).

Saposin D ist ein lysosomales Protein (Chataway *et al.*, 1998), welches die saure Ceramidase aktiviert (Azuma *et al.*, 1994).

4. Diskussion

4.1 Methoden zur Charakterisierung der Zelllinien - Aussagekraft und Limitationen

Für die Charakterisierung der Zelllinien wurden verschiedene Methoden verwendet bzw. im Labor etabliert. Warum eine Methode gewählt wurde und welche Aussagekraft die gewählte Methode hat wird im folgenden erläutert.

4.1.1 Herstellung und genetische Überprüfung der Klone

Die Zelllinien wurden durch Fusion der Choriokarzinomzelllinie AC1-1 mit extravillösen Trophoblastzellen generiert (Kapitel 1.3.3; Frank *et al.*, 2000). Nach solchen physikochemisch induzierten Fusionen gehen während der ersten nachfolgenden Zellteilungen in der Regel Chromosomen verloren (Abbott and Povey, 1995). Auch bei den hier untersuchten Choriokarzinom/Trophoblast Hybriden ist dieser Vorgang, z.B. anhand des Karyotyps von ACH1P nachzuweisen: Der Chromosomensatz von AC1-1 ist hypotriploid bzw. triploid (60-69 Chromosomen, Modalzahl 64). Bei der Addition eines normalen, diploiden, männlichen Chromosomensatzes zu AC1-1 im Rahmen des Fusionsvorganges müßten die resultierenden Hybride pentaploid sein. Sie sind aber tetraploid bis hypertetraploid (89-105 Chromosomen) (Frank *et al.*, 2000). Da der Chromosomenverlust nach unbekanntem Regeln, zumindest teilweise aber stochastisch verläuft, wird durch die chromosomale Segregation eine sekundäre genetische Heterogenität in der Population der Hybride generiert. Um die Phase der chromosomalen Segregation sicher zu verlassen und eine genetisch stabile, wenn auch polyklonale Hybridpopulation zu erhalten, wurde ACH1P nach der Fusion zunächst 40 Passagen kultiviert. Erst nach dieser Anzahl von Passagen begann die Klonierung, die zum Ziel hatte, genetisch homogene, monoklonale Zelllinien von ACH1P abzuleiten.

Die gewählte Klonierungsmethode sollte sicherstellen, daß wirklich nur eine Zelle in jeden Napf überführt wird. Bei einer Klonierung durch Endpunktverdünnung, wie sie z.B. auch bei der Herstellung monoklonaler Antikörper verwendet wird, erhält man i.d.R. immer eine Streuung von null bis zu mehreren Zellen in dem gewählten Volumen. Die Tendenz der ACH1P Zellen aneinander zu haften erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß mehrere Zellen in einen Napf gelangen zusätzlich zur statistischen Wahrscheinlichkeit. Um die Klonierung von Anfang bis Ende verfolgen zu können wurden die Zellen einzeln mit einer Kapillare

aufgenommen und in einen Napf überführt. Diese Methode ist zwar zeitaufwendiger als die Verdünnung, führt aber sicher zu Einzelzellklonen.

Die Effizienz der Methode liegt bei 8,4%, d.h. aus 8,4% der ausgesäten Einzelzellen wurden stabil wachsende Klone. Ein direkter Vergleich zu der Herstellung von Hybridomazellen für die Antikörperproduktion ist nicht möglich, da diese wegen der geringen Wachstumsrate von einzelnen Zellen in einem Napf auf sog. Fütterzellen ausgesät werden. Die Klonierungseffizienz von human/humanen Hybridomen aus B-Lymphozyten und einer HGPRT-negativen humanen Myelomazelllinie liegt in einem beschriebenen Fall bei 5% (De Bernardo and Davies, 1987). Die gewonnenen Klone waren allerdings nicht über längere Zeit stabil. Nach dieser Zahl liegt die in meinem Experiment erzielte Effizienz im normalen Bereich.

Aus den erhaltenen Klonen wurden zufällig fünf zur weiteren Analyse ausgewählt (AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59, AC-1M81 und AC-1M88).

Der Genotyp der gewählten Klone wurde mittels DNA-Fingerabdruck und zytogenetischer Analyse untersucht. Der Fingerabdruck der Zelllinien läßt sich relativ schnell und einfach durchführen. Bei der Auswertung der Fingerabdrücke kann man die untersuchten Zelllinien in zwei große Gruppen einteilen. Auf der einen Seite die Choriokarzinomzelllinien JEG-3 und AC1-1 und auf der anderen Seite die fünf Hybride. Deren Fingerabdrücke zeigen mehrere Banden, die ausschließlich in den Hybriden vorkommen, nicht aber in den Choriokarzinomzelllinien. Diese Banden müssen daher aus dem zweiten Elternteil der Hybride stammen, dem extravillösen Zytotrophoblast. Außerdem kann man an den sehr ähnlichen Bandenmustern erkennen, daß alle fünf Hybride eng miteinander verwandt sind. Trotzdem unterscheiden sie sich genetisch voneinander, da die Fingerabdrücke immer in mindestens einer Bande voneinander abweichen (s. Tabelle 10).

Die zytogenetische Analyse der Zelllinien ist aufwendiger und wurde in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der RWTH Aachen (Prof. Füzesi, Bastian Gunawan) durchgeführt und ausgewertet. Mit dieser Methode erhält man eine Aussage über die mittlere Chromosomenzahl der einzelnen Klone und kann genetisch auffällige Regionen, wie z.B. Chromosomentranslokationen, Verluste, Markerchromosomen etc. in einer Zelllinie erfassen. Die Zytogenetik ergänzt sich mit dem DNA-Fingerabdruck, weil sie chromosomen- und regionenspezifische Informationen liefert, die der im Gegensatz zur Zytogenetik stärker diskriminierende Fingerabdruck nicht liefern kann.

Die gefundenen Translokationen an den Autosomen sind alle nur in den Hybriden vorhanden und nicht in der Elternzelllinie AC1-1. Dies spricht für eine Phase genetischer Instabilität und damit verbundener massiver somatischer Rekombination nach der Fusion. Die Translokationen führen neben dem partiellen Verlust von chromosomalem Material zu einer Erhöhung der genetischen Diversität der Zelllinien. Nur durch die große

Diskriminationsfähigkeit des Fingerabdrucks können die Zelllinien AC-1M32 und AC-1M46 voneinander unterschieden werden. Ihre zytogenetische Analyse liefert nur sehr geringfügige Unterschiede. Diese beiden Zelllinien sind untereinander daher sehr viel enger verwandt als mit den drei anderen ausgewählten Klonen. AC-1M59, AC-1M81 und AC-1M88 unterscheiden sich sowohl in der Zytogenetik als auch im Fingerabdruck und sind daher genetisch untereinander weniger eng verwandt als die beiden Zelllinien AC-1M32 und AC-1M46.

Eine Aussage, welche Chromosomen von welcher Elternzelle stammen, kann nur im Falle der Geschlechtschromosomen getroffen werden. Da AC1-1 außer dem veränderten X-Chromosom addXq26 keine Gonosomen enthält müssen alle anderen X- und Y-Chromosomen aus der Trophoblastzelle stammen.

Genotyp/Phänotyp Korrelationen und funktionelle Interpretationen der genotypischen Daten werden unten in Kapitel 4.2.2 diskutiert.

4.1.2 Analyse des Phänotypes einer Zelllinie

Der Phänotyp der ausgewählten Zelllinien wurde im Nacktmausexperiment untersucht. In diesem System kann das Potential von Zellen überprüft werden, Tumoren zu bilden. Diese – nur im Tierexperiment bestimmbare - Eigenschaft wird als die Tumorigenität einer Zelllinie definiert. Aus ihr wird auf die malignen Eigenschaften der untersuchten Zellen im Menschen zurück geschlossen. Die fehlende zelluläre Abwehr der Nacktmäuse (Wortis, 1971) ermöglicht es auch solchen Zellen zu überleben und sich zu teilen, die in einem immunkompetenten xenogenen Organismus erkannt und getötet würden. Damit ist der Nacktmausassay eine Versuchsumgebung, in der getestet werden kann, ob die wesentlichen, für eine Tumorbildung nötigen Voraussetzungen in einer zu untersuchenden Zelllinie vorliegen oder nicht.

Von einer malignen Zelllinie spricht man dann, wenn Zellen Primärtumoren bilden, d.h. tumorigen sind und ggf. zusätzlich metastasieren. Die Eigenschaft der Metastasierung kann in der Nacktmaus mit dem hier gewählten Versuchsansatz nicht untersucht werden, da bei Applikation der Zellen in die Flanken der Tiere eine Metastasierung im normalen Untersuchungszeitraum nicht auftritt. Längere Versuchszeiträume sind aus Tierschutzgründen nicht möglich, da die Tiere bei Erreichen einer kritischen, zuvor definierten Tumorgröße in jedem Fall getötet werden müssen. Daß in unseren Versuchen keine Metastasierung beobachtet wurde, schließt Metastasierung damit keineswegs aus.

Das System ist trotz seiner Limitierungen gewählt worden, da schon Befunde über trophoblastäre Zellen vorlagen. Zum einen ist die Choriokarzinomzelllinie JEG-3 in Nacktmäusen tumorigen (Grümmer *et al.*, 1999). Auf der anderen Seite ist bekannt, daß isolierte extravillöse Trophoblastzellen in den Mäusen keine Tumoren bilden (Rachmilewitz

et al., 1995). Die Frage stellte sich also, wie sich die aus extravillösen Trophoblastzellen und Choriokarzinomzelllinie (AC1-1) durch Fusion hergestellten Zelllinien verhalten. Theoretisch können sie sich wie eine der Elternzellen verhalten d.h. tumorigen oder nicht tumorigen. Sie könnten aber auch einen Phänotyp der zwischen den beiden Extremen liegt, also eine mehr oder weniger stark reduzierte Tumorigenität, aufweisen.

4.1.3 Suchsysteme zur Entdeckung differentiell exprimierter Merkmale

Bei der Überlegung mit welchen Methoden die zu Grunde liegenden biologischen Unterschiede für die verschiedenen Phänotypen der Zelllinien beleuchtet werden können, muß erst eine prinzipielle Frage geklärt werden: Nimmt man für die folgenden Experimente *in vitro* kultivierte Zellen oder die Zellen aus den Nacktmaustumoren?

Die in der Nacktmaus wachsenden Zellen benötigen mehrere Eigenschaften, die die *in vitro* kultivierten Zellen nicht brauchen. Sie müssen z.B. in der Lage sein, extrazelluläre Matrix abzubauen, da sie sich sonst nicht vermehren können. Außerdem müssen sie an Nährstoffe und Sauerstoff gelangen, in dem sie Blutgefäße des Wirtes arrodieren. Viele – wenn auch nicht notwendigerweise alle – diese Eigenschaften dürften bereits vor der Applikation der Zellen in die Nacktmaus nachweisbar bzw. genetisch prädeterniniert sein. Dies bedeutet aber natürlich auch, daß sich die in der Nacktmaus wachsenden Zellen von den *in vitro* wachsenden Zellen in einer Reihe von Merkmalen unterscheiden können.

Ich habe mich hier auf die bereits *in vitro* ausgeprägten differentiellen Merkmale konzentriert, weil zu diesen Merkmalen ein sinnvoller experimenteller Zugang möglich ist. Zellen aus Nacktmaustumoren sind für die hier im folgenden diskutierten Methoden nur bedingt zu verwenden:

- Zum einen werden für die cDNA-Arrays, aber vor allen Dingen für die 2-D-Gele große Mengen an Zellen benötigt. Damit diese Zellzahl aus den kleinen Tumoren der Nacktmäuse, deren Volumen größtenteils auf blutgefüllte Lakunen zurückzuführen ist, gewonnen werden kann, würden unverhältnismäßig viele Tiere benötigt, deren Notwendigkeit man im Tierversuchsantrag nur schwer begründen kann.
- Im übrigen hätte man für die Zelllinien, die keine Tumoren bilden kein Probenmaterial zur Verfügung. Von diesen Zelllinien dann *in vitro* kultivierte Zellen zu verwenden ist aus Gründen der Vergleichbarkeit problematisch.
- Ein weiteres Problem der Zellen aus der Nacktmaus ist die nicht vermeidbare Kontamination mit Zellen aus der Maus und damit auch Mäuse-RNA beim cDNA-Array und Mäuseproteinen bei den 2-D-Gelen. Bei den cDNA-Arrays soll es zwar nicht zu einer Kreuzreaktion mit anderen Spezies kommen, die Komplexität der Probe würde aber erhöht, was bei diesen sehr sensitiven Systemen zu Problemen wie starker Hintergrund führen kann.

- Bei den 2-D-Gelen würden die Mäuseproteine das schon komplexe Proteinmuster zusätzlich belasten und damit die Aussagefähigkeit der Methode verringern.
- Material aus den im histologischen Bild gut zu erkennenden nekrotischen Arealen würde unweigerlich mit isoliert und im cDNA-Array und im 2-D-Gel verwendet. Die RNA und die Proteine in diesen Zellen sind aber bereits stark degradiert. Gerade degradierte RNA kann aber in den cDNA-Arrays nicht eingesetzt werden, da sie zu falsch positiven oder falsch negativen Befunden führt. Auch bei den 2-D-Gelen wären degradierte Proteine hinderlich, da es auch dabei zu einer Erhöhung der Komplexität und Verfälschung des Proteinmusters kommt. Außerdem erhielte man viele „differentiell exprimierte Proteinspots“, die darauf zurückzuführen wären, daß in den Proben unterschiedliche Degradationsstufen der Proteine vorhanden waren.

4.1.3.1 cDNA-Array

Bei den cDNA-Arrays handelt es sich um ein kommerziell erhältliches System. Mit dem gewählten Array wurde eine Großzahl der zu dieser Zeit (1999) im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren bekannten Gene untersucht. Dabei weist das System eine hohe Sensitivität auf und kann sogar Gene, deren mRNA nur in wenigen Kopien (ca. 20) je Zelle vorliegt entdecken (Angabe des Herstellers). Von der Hypothese ausgehend, daß die unterschiedliche Tumorigenität der Zelllinien in der Nacktmaus auf bereits bekannte, Tumor assoziierte Gene zurückzuführen ist, war bei diesem Ansatz die Wahrscheinlichkeit hoch, ein in unseren Zelllinien relevantes Gen zu finden.

Die von der Herstellerfirma vorgegebene Auswahl der Sequenzen stellt eine Eingangshypothese in diesem Experiment dar. Zu Genen, die nicht enthalten sind, kann keine Aussage getroffen werden. Die Untersuchung ist aus diesem Grund möglicherweise nicht vollständig, obwohl die Eingangshypothese in unserem Zellsystem sinnvoll ist. Wie alle RNA-basierten Suchsysteme kann auch der cDNA-Array keine Informationen über die tatsächliche Translation der mRNA in einer Zelllinie liefern. Aus diesem Grund wurde zur Ergänzung ein proteinbasiertes differentielles Suchsysteme etabliert und benutzt. Dabei wurde ein hypothesenfreies Analysesystem verwendet, das in diesem Punkt komplementär zum cDNA-Array ist.

4.1.3.2 2-D PAGE

Bei der 2-D PAGE handelt es sich um ein offenes Suchsystem, bei dem theoretisch alle in einer Zelle synthetisierten Proteine erfaßt werden. Mit diesem System können also auch unbekannte Proteine und Proteine, die bis jetzt noch nicht in einem speziellen Zusammenhang diskutiert wurden, gefunden werden. Mit diesem System untersucht man direkt auf der Proteinebene und nicht auf dem Umweg über die RNA-Ebene die unterschiedliche Expression in den Zellen. Das hat mehrere Vorteile. Zum einen kann die

Regulation eines Gens auf der Translationsebene liegen und wäre mit den RNA basierten Systemen nicht auffindbar. Zum anderen ist gerade bei unbekanntem oder wenig untersuchten Genen die notwendige Überprüfung auf der Proteinebene nach einem Befund auf der RNA-Ebene schwierig, da es meistens für diese Proteine keine Antikörper gibt. Zusätzlich ist gerade aus Trophoblastzellen bekannt, daß einige Gene zwar transkribiert, aber nicht translatiert werden (Chumbley *et al.*, 1994).

Zu der 2-D PAGE gibt es auf der Proteinebene zur Zeit noch keine Alternative. Die Sensitivität der 2-D PAGE ist grundsätzlich durch die Auflösungskapazität der ersten und zweiten Dimension und der gewählten Visualisierung begrenzt. Mit dem hier gewählten System werden von jeder Zelllinie ca. 2000 Proteine erfaßt. Diese Zahl könnte durch eine vor der elektrophoretischen Trennung durchgeführte Fraktionierung der Probe in lösliche zytoplasmatische Proteine, Membranproteine, Proteine einzelner Zellorganellen usw. wesentlich erhöht werden. Zusätzlich könnten Gele mit sehr engen pH-Gradienten von jeder Probe gemacht werden. Mit diesen engen (z.B. pH 5-6), überlappenden pH-Gradienten wird die Trennstrecke in der ersten Dimension stark vergrößert, so daß auch Proteine, die bei weiten pH-Gradienten einen Spot bilden getrennt werden können. Bei einem derartigen Ansatz können Regulatorgene wie z.B. Transkriptionsfaktoren gefunden werden, die nur in geringer Kopienzahl in der Zelle vorliegen. Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Auftrennung von Gesamtzellproteinen ohne Fraktionierung der Proben in den verwendeten weiten pH-Gradienten können nur Proteine, die in einer relativ hohen Kopienzahl in der Zelle vorliegen im Gel sichtbar gemacht werden. Aus diesem Grund ist die Wahrscheinlichkeit hoch, daß bei der Suche mit dem gewählten Ansatz Effektorgene gefunden werden, da diese in ausreichender Kopienzahl vorliegen. Diese Arbeit hatte aber auch das Ziel, solche Effektorgene zu identifizieren, um ausgehend von diesen Genen weitere Projekte und Schritte zu planen.

Die 2-D PAGE ist außerdem rein qualitativ ausgewertet worden. Dafür gab es zwei Gründe.

- Zum einen ist die gewählte Silberfärbung der Gele sehr sensitiv (0,05-0,1ng/mm²). Der lineare quantitative Bereich ist aber eng und sehr starke Proteinspots werden negativ (d.h. hellgelb bis hellbraun) gefärbt (Rabilloud, 1999).
- Zum anderen wurde davon ausgegangen, daß ein qualitativer Unterschied im Phänotyp (tumorigen vs. nicht tumorigen) auch mit qualitativen Musterunterschieden auf der Proteinebene einhergeht.

4.2 Ergebnisse der Charakterisierung

4.2.1 Tumorigenität in der Nacktmaus

Die Hybridzelllinien AC-1M32, AC-1M46, AC-1M81 und AC-1M88, die Tumoren in der Nacktmaus bilden, sind in der Lage, in ihrem Wirt zu überleben und zu proliferieren. Der Zugang zu Wirtsgefäßen und die Sicherstellung der Nährstoffversorgung für den wachsenden Tumor sind dabei ein zentrales Problem für die Tumorzellen. Viele Tumoren haben die Fähigkeit, Neoangiogenese im Wirtsgewebe zu erzeugen, um ihre Versorgung zu sichern. Erst damit ist in der Regel eine Größenzunahme über 1-2mm möglich (Folkman and Cotran, 1976). Histologisch läßt sich jedoch bei den Tumoren der Choriokarzinomzellen (Grümmer *et al.*, 1999) und bei den Choriokarzinom/Trophoblast-Hybriden keine ausgeprägte Neoangiogenese im Wirtsgewebe nachweisen. Trotzdem sind die Tumoren deutlich größer als 1-2 mm. Das histologische Bild zeigt große, blutgefüllte Lakunen und aggressiv erodierte Wirtsgefäße. Dies spricht dafür, daß die wachsenden Tumoren in benachbarte Wirtsgefäße einbrechen und eine minimale Zirkulation in diesen Lakunen in Gang bringen. Dies wäre ein ganz ähnlicher Mechanismus wie er auch im Rahmen der Implantation der Blastozyste beim normalen Trophoblasten auftritt. Diese Form der Nährstoffversorgung kann allerdings nur die Randbereiche des Tumors ausreichend versorgen, was die großen nekrotischen Areale im Inneren der Tumorknoten erklärt. Die teilweise sehr rasche Größenzunahme und dunkel livide Farbe der wachsenden Tumoren ist auf die in Folge der Arrosion von Wirtsgefäßen auftretenden Einblutungen zurückzuführen. Dieser äußerst aggressive Wachstumsprozess zeigt Analogien zur Invasion des Trophoblasten während der Implantation und erklärt die primär hämatogene Metastasierung von Choriokarzinomen bei Patienten, die an solchen Tumoren erkranken.

Der Hybridzelllinie AC-1M59, die keine Tumoren in der Nacktmaus bildet, fehlt demnach die Fähigkeit, invasiv im Wirtsgewebe zu wachsen.

Die Choriokarzinomzelllinie AC1-1 scheint nur in Ausnahmen zu invasivem Wachstum in der Nacktmaus fähig zu sein.

Die Größenzunahme der Tumoren läßt keinen direkten Rückschluß auf die Proliferationsrate der Zellen zu, da das Wachstum der Tumoren zu einem Teil auf das große Volumen der blutgefüllten Lakunen zurückzuführen ist (Grümmer *et al.*, 1999).

4.2.2 Korrelation genotypischer Veränderungen mit dem Phänotyp der Zelllinien

Bei der Fusion von Zellen und der anschließenden chromosomalen Segregation handelt sich um einen genetisch komplexen Vorgang. Während der Phase der genetischen Instabilität während der ersten Zellteilungen kommen neben Segregationen auch Translokationen und

alle anderen Formen chromosomaler Veränderungen vor. Bekannt ist dies vor allem aus der Anwendung sogenannter somatischer Zellhybride (Abbott and Povey, 1995). Solche Hybride entstehen durch physikochemisch induzierte Fusion eukaryotischer Zellen und werden anschließend durch passende Selektionsbedingungen (häufig HGPRT-Defizienz kombiniert mit funktioneller Komplementation) selektiert. Somatische Zellhybride dienen dem Kartieren von Genen auf bestimmten menschlichen Chromosomen. Dazu werden in der Regel interspezifische (Maus/Mensch; Hamster/Mensch; Hamster/Maus, etc.) Hybride benutzt. Die Phase der chromosomalen Segregation läuft bei interspezifischen Hybriden in der Regel zu Gunsten einer der parentalen Spezies ab, so daß am Ende eines oder sehr wenige Chromosomen der anderen Spezies vor dem Hintergrund eines kompletten Genomes vereinzelt existieren (Abbott and Povey, 1995). Bei der intraspezifischen Hybridisierung, die im Rahmen unsere Experimente erfolgte, kam es ebenfalls zur Segregation von Chromosomen. Allerdings ist nicht eindeutig, ob und wenn ja, welcher der beiden Fusionspartner bevorzugt vom Verlust genetischen Materials nach der Fusion betroffen gewesen sein könnte. Auf der einen Seite enthalten die Hybride im DNA-Fingerabdruck zusätzliche Banden, welche die eine parentale Zelllinie (AC1-1) nicht aufweist. Diese Banden stammen wahrscheinlich aus den extravillösen Trophoblastzellen. Die geringen Unterschiede der Fingerabdrücke innerhalb der Hybride weisen darauf hin, daß das trophoblastäre Genom nicht bevorzugt und ggf. massiv durch Segregation ausgeschleust wurde. Auf der anderen Seite gilt ähnliches für die in den Choriokarzinomzellen nachgewiesenen Bandenmuster. Die Unterschiede zwischen den Hybriden sind diskret. In der Zytogenetik zeigt sich auch, daß die Markerchromosomen der Choriokarzinomzellen im wesentlichen auch in den Hybriden noch stabil nachzuweisen sind. Es ist daher davon auszugehen, daß die relativ klar erkennbaren und diskreten Unterschiede zwischen den Zelllinien durch eine im wesentlichen zufällige chromosomale Segregation zustande kamen. Den numerischen Gegebenheiten zufolge, wurde rund ein fünftel des zum Zeitpunkt der Fusion in den Hybriden vorhandenen genetischen Materials während der ersten Passagen eliminiert. Das dann durchgehend anzutreffende hypertetraploide Genom stellt offensichtlich eine Genomgröße dar, die wieder im Rahmen eines normalen Zellzyklus gehandhabt werden kann.

Bei dem Versuch, den Genotyp der Hybride und Choriokarzinomzelllinien mit ihrem im Nacktmausexperiment bestimmten Phänotyp zu vergleichen, kann nur auf die Zytogenetik zurückgegriffen werden, weil die Methode des DNA-Fingerabdrucks keine Zuordnung von Unterschieden zu genetischen Merkmalen erlaubt. Eine Synopsis der wichtigsten zytogenetischen Merkmale mit der Tumorigenität ist in Tabelle 9 zusammengestellt. Numerische Aberrationen sind grundsätzlich nicht mit der Tumorigenität korreliert, so daß der Blick sich auf die Veränderungen richtet, die an einzelnen Chromosomen oder Markern nachgewiesen werden können. Bei den Autosomen oder von Autosomen derivierten Markern

fällt hierbei nur die mit add(9)(p13) bezeichnete Translokation auf. Dieser Marker findet sich nur in den drei minder tumorigenen Hybriden (AC-1M32, AC-1M46 und AC-1M59) und ist abwesend in den hochtumorigenen Hybriden (AC-1M81 und AC-1M88). Er ist allerdings nicht in JEG-3, und nicht in der schwach tumorigenen Choriokarzinomzelllinie AC1-1 vorhanden. Damit ist eine generelle, in allen Zelllinien vorhandene Rolle von auf diesem Chromosom vorhandenen genetischen Merkmalen nicht mehr wahrscheinlich. Etwas klarer liegen die Verhältnisse bei den Gonosomen. Hier ist in der für die Fusion benutzten Zelllinie AC1-1 nur das veränderte X-Chromosom add(X)(q26) vorhanden, dem alle genetischen Informationen distal von Xq26 fehlen. Hiervon ist mit Sicherheit auch das in diesem Bereich liegende HGPRT-Gen betroffen, denn dieses Gen liegt auf Xq26 und die Zelllinie hat einen HGPRT-negativen Phänotyp. Nach einer Fusion werden in den Selektionsmedien die noch vorhandenen AC1-1 Zellen durch Selektionsbedingungen eliminiert, unter denen HGPRT-negative Zellen nicht überleben können. Aus diesem Grund sind auch in allen Hybriden normale X-Chromosomen vorhanden, die über einen intakten Bereich distal von Xq26 verfügen. Da in der parentalen Zelllinie AC1-1 nur das veränderte X-Chromosom add(X)(q26) vorhanden ist, sind alle in den Hybriden vorhandenen Gonosomen aus dem Trophoblasten eingebracht worden. Dabei kann es sich sowohl um ein X, als auch um ein Y-Chromosom handeln, weil für die Fusion männlicher Trophoblast verwendet wurde. Die Gegenwart des veränderten X-Chromosoms add(X)(q26) korreliert mit einer verminderten Tumorigenität, während die alleinige Anwesenheit eines intakten X-Chromosoms in allen so ausgestatteten Zelllinien mit einer hochgradigen Tumorigenität einhergeht. Ist add(X)(q26) das einzig vorhandene X-Chromosom, so ist nur noch eine stark verringerte Tumorigenität vorhanden.

Die Befunde können nur die Korrelation zwischen den oben erwähnten genotypischen und phänotypischen Merkmalen erfassen. Aus den hier eingesetzten Zelllinien läßt sich nicht zwangsläufig folgern, daß Gene auf dem Bereich distal des Bruchpunktes in add(X)(q26) (d.h. distal von Xq26 und dem HGPRT-Gen) in die Erklärung unseres Phänotypes verwickelt sein müssen. Allerdings konnte (mit der autokrinen Schleife CD40R und CD40L s.u.) ein Kandidatengen identifiziert werden, das tumorigene Eigenschaften hat und auf Xq26 lokalisiert ist.

4.2.3 Identifizierung differentiell exprimierter Gene im cDNA-Array

Die cDNA-Arrays der sieben Zelllinien liefern eine große Datenmenge. Aus dieser Datenmenge müssen mit Hilfe geeigneter Suchstrategien die für den Phänotyp relevanten, differentiell exprimierten Gene herausgefiltert werden. Dazu wurden mehrere Filteroperationen hintereinander durchgeführt, bei denen nicht differentiell exprimierte Gene eliminiert wurden (s. 3.4). Für die anschließend durchgeführten Filterungen wurden die

Zelllinien immer zu Gruppen zusammengefaßt. Für diese Vorgehensweise gab es mehrere Gründe:

Die Arraysysteme sind eigentlich für den Vergleich von zwei Zelllinien oder einer Zelllinie unter zwei unterschiedlichen Bedingungen gedacht. Bei der Zusammenfassung der Zelllinien zu zwei Gruppen erhält man wieder diesen Zustand. Natürlich wäre auch ein Vergleich der stark tumorigenen Zelllinie AC-1M88 mit der nicht tumorigenen Zelllinie AC-1M59 möglich gewesen. Bei diesem Vergleich erhält man 60 Gene, in denen sich die beiden Zelllinien unterscheiden, d.h. immer noch eine für molekularbiologische Nachuntersuchungen sehr große Anzahl zu verifizierender Unterschiede. Viele dieser Gene sind möglicherweise nicht mit der unterschiedlichen Tumorigenität der Zelllinien kausal verknüpft. Die Gruppierung der Zelllinien hilft die Zahl der identifizierten Gene zu reduzieren und erhöht dabei gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit, daß die gefundenen Gene für den analysierten Phänotyp der Zellen relevant sind (Triche *et al.*, 2001).

Nach diesen Gruppenfilteroptionen konnte die Zahl der Gene auf 14 potentiell interessante eingegrenzt werden. Für die angewandten entscheidenden Filterstrategien wurden die folgenden Überlegungen zu Grunde gelegt:

Die Ergebnisse aus den Nacktmausexperimenten und die Zytogenetik der Zellen lieferte eine Korrelation zwischen der Anwesenheit des veränderten X-Chromosoms addXq26 und der Tumorigenität der Zellen. Die Zelllinien JEG-3, AC-1M81 und AC-1M88, die nur ein normales X-Chromosom besitzen, sind stark tumorigen. Sie verursachen in mindestens 60% der Mäuse Tumoren. AC1-1 dagegen besitzt nur das veränderte X-Chromosom addXq26 und zeigt ein stark reduzierte Tumorigenität, da nur 17% (5 von 30) der Mäuse Tumoren bilden. Dies ist besonders deshalb bemerkenswert, da AC1-1 nur eine HGPRT-negative Mutante von JEG-3 ist. Auffälligste Veränderung dabei ist die Translokation am X-Chromosom, die zu einem Verlust des HGPRT-Gens und aller Gene distal dieses Locus geführt hat. Die Hybride AC-1M32, AC-1M46 und AC-1M59, die sowohl ein normales, als auch das veränderte X-Chromosom besitzen, sind entweder nicht tumorigen, wie AC-1M59 oder sie zeigen eine reduzierte Tumorigenität wie AC-1M32 und AC-1M46. Aus diesem Grund wurden in einer Filteroption die Zelllinien mit dem normalen X-Chromosom JEG-3, AC-1M81 und AC-1M88 der Zelllinie AC-1-1 mit dem veränderten X-Chromosom addXq26 gegenübergestellt. Bei der Suche nach Tumorsuppressorgenen, d.h. Genen, die nur in AC1-1 exprimiert werden, wurden neun Gene gefunden (s. Tabelle 13). Bei der umgekehrten Suche nach Onkogenen, d.h. Genen die nicht in AC1-1, aber in allen drei anderen Zelllinien vorkommen, wurden keine Gene identifiziert. Erweitert man die Suche und faßt alle Zelllinien, die das veränderten X-Chromosom besitzen, in eine Gruppe zusammen und wählt den Filter so, daß ein Tumorsupressor in mindestens einer der Zelllinien vorkommen muß, erhält man die selben neun Gene (s. Tabelle 14).

Der zweiten Filteroperation lag eine andere Überlegung zu Grunde. Ausgehend von der Tatsache, daß AC1-1 nur sehr schwach tumorigen ist und extravillöser Trophoblast nicht tumorigen ist (Rachmilewitz *et al.*, 1995), stellte sich die Frage, wie aus der Fusion dieser beiden Zellen wieder stark tumorigene Zellen entstehen können. Dabei ist es durchaus möglich, daß die relevanten Faktoren andere sind als bei JEG-3. Aus diesem Grund wurden die folgenden Filterungen mit einer kleineren Untergruppe von Zelllinien durchgeführt. Die Gruppe, die durch die Fusion die neue Eigenschaft erworben hatte in Nacktmäusen Tumoren zu bilden, bestand aus den Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88. Diese wurden mit der nur schwach tumorigenen Elternzelllinie AC1-1 und der auch nach Fusion nicht tumorigenen Zelllinie AC-1M59 verglichen. Bei dieser Filterung erhielt man sowohl Gene mit Tumorsuppressoreigenschaften (s. Tabelle 15), als auch solche mit Onkogenen Eigenschaften (s. Tabelle 16).

Die unter den mit Hilfe der verschiedenen Filterungen gefundenen potentiell interessanten Gene sind in Tabelle 17 zusammengefaßt.

Keines der gefundenen Gene liegt auf einem der durch die Translokation an das X-Chromosom betroffenen Chromosomenabschnitte. Die Gene können daher nicht direkt durch die Translokation betroffen sein. Wie unten (für CD40R) diskutiert, sind aber mit diesen Proteinen funktionell verknüpfte Gene auf dem verlorengegangenen Teil des X-Chromosoms lokalisiert.

Für die Gene VEGF-Rezeptor 3, Dysplasie Protein und MMP-2 (Huppertz *et al.*, 1998) ist die Expression in der Plazenta beschrieben. Die ubiquitär vorkommenden Gene HSPG2 und nm23-H4 werden ebenfalls in der Plazenta exprimiert. Für die anderen Gene ist eine Expression in der Plazenta oder in Choriokarzinomen nicht nachgewiesen, was aber einfach daran liegen kann, daß noch niemand die Plazenta darauf untersucht hat. Die Gene, die in anderen epithelialen Zellen exprimiert werden, wie Zytokeratin 5, Smoothened, C-SRC und CD40R könnten auch in Trophoblastzellen exprimiert werden.

Welche Funktion die einzelnen Gene in den Hybridzelllinien bzw. im Trophoblasten haben könnten wird weiter unten zusammen mit den aus der Proteomanalyse identifizierten Kandidatengenen diskutiert.

4.2.4 Identifizierung differentiell exprimierter Kandidatengene in der 2-D PAGE

Bei der Analyse der 2-D PAGE wurden die Zelllinien in zwei Untergruppen wie bei der zweiten Filterungsstrategie der cDNA-Arrays zusammengefaßt. Die tumorigenen Hybridzelllinien AC-1M81 und AC-1M88 wurden also mit den nicht bzw. schwach tumorigenen Zelllinien AC-1M59 und AC1-1 verglichen. Die Gruppierung der Zelllinien erhöht auch hier die Wahrscheinlichkeit, daß die gefundenen Proteine für den untersuchten Phänotyp der Zellen eine Rolle spielen.

Gele von isolierten extravillösen Trophoblastzellen wurden nicht in die Analyse mit einbezogen. Für eine Proteomanalyse müssen die Zellen in einer Reinheit und Menge vorliegen, die zur Zeit labortechnisch noch nicht erreicht werden kann. Die Zellisolationen haben eine Reinheit von ca. 80% Trophoblastzellen., d.h. 20% der Präparation sind andere Zellen. Bei diesem großen Anteil sind die Proteine der kontaminierenden Zellen im Gel sichtbar und verschlechtern das Signal-Rausch Verhältnis bis hin zu Bedingungen, die eine vergleichende Auswertung nicht mehr sinnvoll erscheinen lassen.

Vergleicht man die Proteinmuster der verschiedenen Hybride und Choriokarzinomzelllinien fällt zuerst auf, daß sie sehr ähnlich sind. Die Gele lassen sich auf den ersten Blick nicht voneinander unterscheiden. Der größte Teil der Proteine liegt in einem pH-Bereich von 4 bis 7 und in der Größe von 90 bis 30kDA.

Die in den Gelen identifizierten unterschiedlichen Proteinspots sind in Tabelle 18 bis Tabelle 21 aufgeführt. Ein Vergleich mit den im cDNA-Array identifizierten Gene ist leider nicht möglich, weil die dort für die gefundenen Proteine ausgewiesenen MG und IEP theoretisch generiert wurden. Das bedeutet, daß die Daten einfach auf Grund der Proteinsequenz berechnet wurden und posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung, Entfernung von Signalpeptiden u.ä. nicht berücksichtigt sind. Die Proteine im Gel sind aber modifiziert und ein Vergleich zwischen beiden Gruppen ist daher nicht sinnvoll. Eine Identifizierung der Proteinspots mit Hilfe des MG und IEP ist ebenfalls nicht möglich. Deshalb werden im folgenden nur die beiden Proteine besprochen, die im Massenspektrum identifiziert worden sind.

Das durch Peptidmassenfingeringdruck identifizierte Protein Annexin III wird in der Plazenta exprimiert und kann daraus isoliert werden (Ross *et al.*, 1990; Ross and Majerus, 1986).

Das durch Peptidfragmentsequenzierung identifizierte Protein Saposin D ist bei der Untersuchung plazentarer Lysosomen dort gefunden worden (Chataway *et al.*, 1998).

4.2.5 Analyse der 16 differentiell exprimierten Gene

Von den 16 als differentiell exprimierten Genen werden 12 im folgenden zu zwei Gruppen zusammengefaßt und kurz diskutiert. Die vier Gene Annexin III, Saposin D, Interleukin-17 und CD40R werden anschließend ausführlich besprochen.

a) Gene, die in Signaltransduktionswegen oder als Morphogene beschrieben sind

Das Gen von *RBQ1* (=RBBP6) ist 1995 erstmals isoliert und beschrieben worden (Sakai *et al.*, 1995). Das Protein bindet an das Retinoblastoma Protein und inaktiviert dadurch diesen Tumorsupressor. Das Protein könnte durch diese Interaktion zu der Tumorigenität der Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88 beitragen. Ob das Retinoblastom Protein in den Zelllinien exprimiert wird, muß durch weitere Experimente geklärt werden.

Netrin-2 wurde erstmals 1994 beschrieben. Die Netrine spielen eine wichtige Rolle bei der Lenkung der Axone während des Auswachsens (Kennedy *et al.*, 1994). Der zugehörige Rezeptor DCC (*deleted colorectal cancer*) wurde zuerst in Colonkarzinomen beschrieben (Chan *et al.*, 1996; Fearon *et al.*, 1990). Der Rezeptor wird in verschiedenen epithelialen Zellen exprimiert. Liegt der Rezeptor alleine vor aktiviert er konstitutiv einen Apoptoseweg. Bei Interaktion mit dem Liganden Netrin wird diese Aktivierung inhibiert (Livesey, 1999; Mehlen *et al.*, 1998). Die Expression von Netrin-2 kann also Zellen vor der Apoptose bewahren. Dieser Befund aus der Literatur paßt zu der gefundenen Expression in den tumorigenen Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88. Die Expression des Rezeptors in den Zelllinien muß durch weitere Experimente geklärt werden.

Der Retinoid X Rezeptor α (*RXRA*) wurde erstmals 1990 beschrieben. Er gehört zur Superfamilie der Steroid- und Thyroid-Hormonrezeptoren, die die Transkription regulieren (Mangelsdorf *et al.*, 1990). Als Ligand für den Rezeptor wurde 9-cis-Retinoinsäure identifiziert (Heyman *et al.*, 1992). Der Ligand inhibiert das Wachstum von Östrogenrezeptor positiven Brustkrebszelllinien (Rubin *et al.*, 1994). Außerdem ist die Aktivierung von RXRA notwendig für die über IGFBP-3 induzierte Apoptose (Baxter, 2001). RXRA kann also das Wachstum von Zellen verhindern, was zu seiner Expression in den nicht bzw. schwach tumorigenen Zelllinien AC-1M32, AC-1M59 und AC-1-1 paßt. Welche Funktion der Rezeptor in den Zellen genau hat muß noch durch weiterführende Experimente untersucht werden.

Die differentielle Expression dieser drei Gene (*RBQ1*, *Netrin-2* und *RXRA*) kann daher tatsächlich zur Erklärung der unterschiedlichen Phänotypen der Zelllinien beitragen. Die Untersuchung ihrer genauen Funktion in weiteren Experimenten erscheint daher sinnvoll.

Das humane Homolog zum *Drosophila* Protein *Smoothed* (*SMOH*) wurde 1996 kloniert (Stone *et al.*, 1996). Das Protein ist ein Membranprotein und Teil des Sonic Hedgehog (*SHH*) Signaltransduktionsweges. Die Signalweitergabe durch *SMOH* ist durch die Interaktion mit Patched (*PTC*) inhibiert. Erst bei Bindung von *SHH* an *PTC* kommt es zu einer Konformationsänderung der Proteine *SMOH* und *PTC* und das Signal wird weitergegeben (Villavicencio *et al.*, 2000). Mutationen, die zu einer permanenten Aktivierung von *SMOH* führen, können eine onkogene Transformation von Zellen bewirken (Stone *et al.*, 1996). Man findet Mutationen von *SMOH* in Basalzellkarzinomen (Villavicencio *et al.*, 2000). In den Zelllinien wird *SMOH* in den schwach bis mittel tumorigenen Zelllinien AC-1M32, AC-1M46 und AC-1-1 exprimiert. Ob das Protein die Tumorigenität dieser Zellen beeinflusst ist unklar und muß vor allem vor dem Hintergrund, daß keine der untersuchten Zelllinien die zugehörigen Gene *SHH* und *PTC* exprimiert, kritisch untersucht werden.

Die Nukleosid-diphosphatkinase nm23-H4 wurde 1997 erstmals beschrieben (Milon *et al.*, 1997). Das Gen wird in der Plazenta schwach exprimiert. Für die Mitglieder dieser Familie wird eine Funktion als Tumor- bzw. Metastasesuppressor diskutiert (Hennessy *et al.*,

1991; Nakayama *et al.*, 1992). Das paßt zu der Expression des nm23-H4-Gens in den nicht bzw. schwach tumorigenen Zelllinien AC-1M32, AC-1M59 und AC1-1. Auf der anderen Seite kann eine erhöhte Expression von nm23-H4 in Tumoren des Colons und der Niere beobachtet werden (Hayer *et al.*, 2001). Dies ist möglicherweise ein Hinweis auf die Beteiligung von nm23-H4 bei der Entstehung dieser Tumoren. Dieser Befund widerspricht der gefundenen Expression in den nicht bzw. schwach tumorigenen Zelllinien. Ob nm23-H4 trotzdem eine Rolle als Tumorsuppressor in den Hybriden spielen kann, müssen weitere Experimente zeigen.

Das Gen für das faciogenitale Dysplasie Protein wurde 1994 kloniert und als *FDG1* bezeichnet (Pasteris *et al.*, 1994). Das Protein gehört zur Familie der dbl-Proteine, welche die Fähigkeit haben, die Aktivität von Guanidinnukleotid-Exchange-Faktoren für bestimmte Mitglieder der Rho-Familie zu katalysieren (Cerione and Zheng, 1996). Die Transfektion von NIH3T3-Fibroblasten mit *FDG1* und dessen konstitutive Expression bewirkt eine rasche Tumorbildung in Nacktmäusen. Die Kontrollzellen mit leerem Vektor bilden dagegen keine Tumoren (Whitehead *et al.*, 1998). *FDG1* aktiviert in den Zellen die Transkriptionsfaktoren SRF, Elk-1 und c-Jun, deren Rolle in der Regulation des Zellwachstums nachgewiesen wurde (Whitehead *et al.*, 1998). Diese Befunde stehen im Widerspruch zu der gefundenen Expression in den nicht bzw. schwach tumorigenen Zelllinien AC-1M32, AC-1M59 und AC1-1.

Das humane homolog (*C-SRC*) zum transformierenden Gen des Rous-Sarcoma-Virus (*v-src*) wurde 1985 isoliert (Gibbs *et al.*, 1985). Das Gen ist überexprimiert in einer Reihe von Tumoren und spielt eine kritische Rolle in Signaltransduktionswegen, welche die Entwicklung und das Wachstum von Tumorzellen kontrollieren. Das Gen wird ausschließlich in AC1-1 exprimiert. Welche Aufgabe es in dieser Zelllinie spielt ist zur Zeit unklar und muß durch weitere Experimente geklärt werden.

STAT5B (=signal transducer and activator of transcription) wurde erstmals 1995 beschrieben (Liu *et al.*, 1995). Die STAT-Proteine sind Substrate der Janus Kinase (JAK). Nach der Phosphorylierung dimerisieren sie und wandern in den Kern. Eine permanente Aktivierung von *STAT5B* durch chromosomale Translokation und Fusion des Gens mit dem Retinoinsäurerezeptor α (*RARA*) wurde in einem Patienten mit akuter promyelotischer Leukämie beschrieben (Arnould *et al.*, 1999). Das Protein scheint bei konstitutiver Aktivierung also eher eine onkogene Wirkung zu haben. In welchem Zusammenhang diese Eigenschaft mit der Expression in den schwach tumorigenen Zelllinien AC-1M32 und AC1-1 steht, muß durch weitere Versuche geklärt werden.

b) Gene, die auch bei der normalen Trophoblastdifferenzierung exprimiert werden

Die folgenden fünf Gene werden auch bei der Differenzierung normaler Trophoblastzellen exprimiert. Auch wenn sie teilweise in dem Array unter den Onkogenen geführt werden sind

sie eher im Zusammenhang mit ihrer Expression im normalen Trophoblasten zu sehen und ein Beweis dafür, daß in den Zelllinien trophoblastäre Gene aktiv sind.

Das Gen für das Heparansulfatproteoglycan *HSPG2* wurde 1991 identifiziert (Dodge *et al.*, 1991). Das Protein ist Bestandteil der Basalmembran in normalen Plazenten und wird daher von Trophoblastzellen exprimiert (Onodera *et al.*, 1997).

Das Gen für den *VEGFR-3* (=FLT4) wurde 1992 aus einer Plazenta cDNA-Bibliothek isoliert (Galland *et al.*, 1992). Der Rezeptor ist essentiell für die Lymphangiogenese während der embryonalen Entwicklung (Clauss, 2000).

Zytokeratin 5 wurde erstmals 1988 beschrieben (Lersch *et al.*, 1989; Lersch and Fuchs, 1988). Das Protein wird in den basalen Zellen der Epidermis zusammen mit Zytokeratin 14 exprimiert. Eine Expression der epidermalen Zytokeratine ist auch für alle Trophoblastpopulationen beschrieben (Beham *et al.*, 1988).

Die Struktur des Gens von MMP-2 wurde 1990 aufgeklärt (Huhtala *et al.*, 1990). Das Protein ist eine Gelatinase und baut Kollagen der extrazellulären Matrix ab. Damit ist die Expression dieses Proteins wichtig sowohl für die physiologische als auch die maligne Invasion von Zellen (Corcoran *et al.*, 1996). Das Protein wird von extravillösen Trophoblastzellen des invasiven Phänotyps exprimiert (Huppertz *et al.*, 1998).

Die folgenden vier Gene/Proteine Annexin III, Saposin D, Interleukin-17 und CD40R werden ausführlicher diskutiert, da ihre im Zusammenhang mit dem tumorigenen bzw. nicht tumorigenen Phänotyp besonders interessant ist und teilweise schon mehr Befunde vorliegen.

1. Annexin III

Für Annexin III wurde die differentielle Expression sowohl auf der Proteinebene durch die 2-D PAGE als auch auf der RNA-Ebene durch die reverse Transkription mit anschließender spezifischer PCR nachgewiesen. Das Protein gehört zu der Familie der Annexine. Diese Proteinfamilie besteht zur Zeit aus 13 Mitgliedern, welche in Säugetieren, Drosophila und Hydra vorkommen (Raynal and Pollard, 1994). Die Proteine binden in Abhängigkeit von Ca^{2+} an Phospholipide, bevorzugt an anionische Phospholipide wie Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Phosphatidsäure. Einige Annexine binden auch an das neutrale Phosphatidylethanolamin. Die C-terminale Ca^{2+} - und Phospholipidbindungsdomäne ist innerhalb der Familie hoch konserviert. Sie besteht aus 4 bzw. 8 (Annexin VI) Wiederholungen von 70 Aminosäuren und enthält 2 bis 4 Ca^{2+} -Bindungsstellen. Die N-terminale Domäne ist bei jedem Protein unterschiedlich und es existieren große Längenunterschiede. Man nimmt an, daß dieser N-terminale Teil der Proteine für die unterschiedlichen Funktionen der Annexine verantwortlich ist. Bei den Annexinen entspricht

das aus der Sequenz kalkulierte Molekulargewicht demjenigen im Gel. Es kommt also nicht zu starken posttranslationalen Modifikationen der Proteine (Raynal and Pollard, 1994). Die Annexin I, II, III, VII, VIII und X besitzen in ihrer N-terminalen Domäne das Aminosäuremotiv, das für Substrate der Proteinkinase C typisch ist. Für Annexin II ist die Phosphorylierung durch Proteinkinase C *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen worden. Annexin I wird *in vitro* phosphoryliert und die anderen oben genannten Annexine können auf Grund ihrer Aminosäuresequenz auch Substrate für Proteinkinase C sein (Rothhut, 1997).

Annexin III hat eine N-terminale Domäne von 16 Aminosäuren (Favier-Perron *et al.*, 1996). Das Protein findet man als 33kDa-Form in neutrophilen Granulozyten, wo es bis zu 1% der Gesamtproteinmenge ausmachen kann und als 36kDa-Form in Makrophagen (Le, V *et al.*, 1992). Ross und Majerus isolierten 1986 das Enzym Inositol-1,2-cyclo-phosphat-2-phosphohydrolase aus der Plazenta und stellten später dessen Identität mit Annexin III fest (Ross *et al.*, 1990; Ross and Majerus, 1986). Das Enzym katalysiert die Umsetzung von 1,2-cyclo-phosphat zu Inositol-1-phosphat. Sie konnten nachweisen, daß die Zelllinie 3T3, die das Enzym nicht exprimiert, nach der Transfektion mit dem Gen bei Erreichen der Konfluenz eine niedrigere Zellzahl aufweist, als nicht transfizierte Zellen. Sie schlossen daraus, daß Annexin III eine Rolle bei der Regulation der Zellteilung spielt (Ross *et al.*, 1991). Damit stimmen die Ergebnisse von Sekar und Graham überein, die in Tumoren der Niere (Sekar *et al.*, 1995) und der Leber (Graham *et al.*, 1987) eine erniedrigte Aktivität des Enzyms und dadurch erhöhte Spiegel von 1,2-cyclo-phosphat feststellten. Diese Ergebnisse legen nahe, daß Annexin III in noch ungeklärter Weise als Tumorsuppressor wirkt und damit ein Effektorprotein sein kann, welches den nicht bzw. schwach tumorigenen Phänotyp der Zelllinien AC-1M59 und AC1-1 erklärt. Auch für andere Annexine ist in der Literatur eine Tumorsuppressoraktivität beschrieben. Die humane Plattenepithel-Karzinomzelllinie A431 besitzt kein endogenes Annexin VI. Nach Transfektion mit dem Gen für Annexin VI zeigen die Zellen eine reduzierte Wachstumsrate, da es zu einer Verlangsamung des Zellzyklus und damit längeren Generationszeiten kommt (Theobald *et al.*, 1994). Bei Experimenten in Nacktmäusen bilden die transfizierten Zelllinien um 60% kleinere Tumoren als die nicht transfizierten (Theobald *et al.*, 1995). Auch für Annexin I gibt es Hinweise auf eine Tumorsuppressoraktivität. So wird die Expression von Annexin I durch Glucokortikoide wie Dexamethasone, die das Wachstum der Adenokarzinomzelllinie A549 inhibieren, induziert. Durch die Zugabe von Anti-Annexin I-Antikörpern kann dieser Effekt aufgehoben werden. Das spricht dafür, daß Annexin I das Molekül ist, welches das Signal in der Zelle umsetzt (Croxtall and Flower, 1992). In der Karzinomzelllinie SqCC/Y1 stimuliert Annexin I die terminale Differenzierung der Zellen. Auch dieser Effekt kann durch Anti-Annexin I-Antikörper neutralisiert werden (Violette *et al.*, 1990).

Es gibt allerdings Arbeitsgruppen, welche die Identität von Annexin III mit Inositol-1,2-cyclophosphat-2-phosphohydrolase bestreiten (Perron *et al.*, 1997; Sekar *et al.*, 1996). Die vorhandene Auswirkung von Annexin III auf das Wachstum der Zellen bei (Ross *et al.*, 1991) erklären (Perron *et al.*, 1997) damit, daß Annexin III entweder mit dem Enzym interagiert und dessen Aktivität verstärkt, oder daß Annexin III das Substrat Inositol-1,2-cyclophosphat bindet und dem Enzym präsentiert. Für die zweite Möglichkeit spricht die Tatsache, daß die Autoren eine Affinität von Annexin III für das Substrat gemessen haben. Dieser Artikel widerspricht damit nicht der Hypothese, daß Annexin III eine Tumorsuppressoreigenschaft entweder selbst besitzt oder vermittelt. Auch wenn die oben genannten Befunde überwiegend an anderen Mitgliedern der Annexin-Familie erhoben wurden, legt die Vielzahl der Beobachtungen doch nahe, daß auch Annexin III ein Protein ist, das eine Tumorsuppressoraktivität entfalten könnte. Möglicherweise ist Annexin III alleine nicht in der Lage, die komplette Tumorsuppression zu bewirken, sondern bewirkt sie im Verband mit den anderen, noch zu diskutierenden Faktoren. Sicherlich rechtfertigen diese Beobachtungen die Einordnung von Annexin III als Kandidatengen in die Reihe der Tumorsuppressorgene, die in den Zelllinien aktiv sind. Auch legen die oben erwähnten rekombinanten und antikörperbasierten Methoden, die bei anderen Mitgliedern der Annexin-Familie eingesetzt wurden, ähnlich experimentelle Ansätze bei Annexin III in unserem System nahe. Dies sprengt jedoch den Rahmen der vorliegenden Arbeit, die im wesentlichen die Identifizierung geeigneter Kandidatengene zum Ziel hatte.

2. Saposin D

Die Saposine A, B, C und D sind eine Familie von kleinen (~80 Aminosäuren), hitzestabilen Glycoproteinen, die proteolytisch aus einem Vorläufer, dem Prosaposin entstehen (Kishimoto *et al.*, 1992). Aus diesem Grund kann die differentielle Expression von Saposin D in den Hybriden nur auf der Proteinebene durch die 2-D PAGE und nicht auf der mRNA Ebene verifiziert werden, da die mRNA für Prosaposin in allen Zellen vorhanden ist und die Regulation der Expression ausschließlich auf posttranslationaler Ebene erfolgt.

Alle vier Saposine haben eine ähnliche dreidimensionale Struktur mit sechs Cysteinresten und Prolinresten an den gleichen Positionen. Über die Cysteinreste werden innerhalb eines Proteins mehrere Disulfidbrücken ausgebildet. Dadurch sind die Moleküle extrem kompakt und resistent gegen Proteasen. Saposin A enthält zwei Glykosilierungsstellen und die anderen Saposine jeweils eine (O'Brien and Kishimoto, 1991; Vaccaro *et al.*, 1995). Die Saposine sind lysosomale Proteine und können verschiedene lysosomale Hydrolasen, vorwiegend solche, die am Metabolismus von Sphingolipiden beteiligt sind, aktivieren. Dabei zeigen die vier Proteine trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit unterschiedliche Spezifitäten. Saposine findet man in fast allen Geweben (Kishimoto *et al.*, 1992).

Sapogenin D wurde erstmals 1988 isoliert (Morimoto *et al.*, 1988). Anfangs wurde aus *in vitro* Befunden gefolgert, daß Sapogenin D als Sphingomyelinaseaktivator wirkt (Morimoto *et al.*, 1988; Tayama *et al.*, 1993). Inzwischen ist aus *in vivo* Befunden deutlich geworden, daß es in Wahrheit ein Ceramidaseaktivator ist (Azuma *et al.*, 1994; Klein *et al.*, 1994; Tatti *et al.*, 1999). Dabei interagiert Sapogenin D mit dem Enzym und nicht mit dem Substrat (Azuma *et al.*, 1994). In welchem Zusammenhang kann nun dieses Protein mit der Tumorigenität der Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88 stehen? Die Anwesenheit von Sapogenin D verstärkt den Abbau von Ceramid zu Sphingosin. Ceramid diffundiert in Membranen und wirkt als Second Messenger (Testi, 1996). Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß eine Erhöhung des Ceramidspiegels in Zellen Apoptose induzieren kann. So haben Santana *et al.* bei Lymphoblasten nach der Bestrahlung eine Erhöhung der Aktivität der sauren Sphingomyelinase festgestellt. Der Ceramidspiegel in diesen Zellen war ebenfalls erhöht und sie wurden apoptotisch. Bei Lymphoblasten von Patienten mit der Niemann-Pick-Krankheit, die einen Defekt in der sauren Sphingomyelinase haben, kommt es nach der Bestrahlung nicht zu einem Anstieg der Ceramidkonzentration und die Zellen werden nicht apoptotisch. Transduziert man diese Zellen allerdings mit der cDNA von saurer Sphingomyelinase verhalten sie sich wieder wie normalen Lymphoblasten. Auch die Lungenepithelzellen einer Knockout-Maus für saure Sphingomyelinase sind resistent gegen die Induktion von Apoptose durch Bestrahlung. Die Autoren gehen allerdings davon aus, daß die Signaltransduktion in dieser Streß induzierten Apoptose anders abläuft als bei der Apoptose in der Entwicklung, da sowohl die Niemann-Pick-Patienten als auch die Mäuse bei der Geburt normal sind (Santana *et al.*, 1996). In der B-Lymphoma Zelllinie WEHI231 kann Apoptose über Oberflächen-IgM-Antikörper induziert werden (anti-IgM-induzierte Apoptose). Der zeitliche Ablauf und das Ausmaß der Apoptose korreliert dabei direkt mit der Bildung von Ceramid. Die Zellen kann man aber auch durch Inkubation mit N-Oleylethanolamin (OE), einem Inhibitor der Ceramidase, in die Apoptose treiben. Bei gleichzeitiger Inkubation mit anti-IgM und OE verdoppelt sich die Effizienz von anti-IgM bei der Induktion von Apoptose. Dabei ist die über Ceramid vermittelte Apoptose in den frühen Stadien reversibel (Quintans *et al.*, 1994; Wiesner *et al.*, 1997). Bei der Untersuchung der NO induzierten Apoptose in glomerulären Mesangium- und Endothelzellen wurde bei einer Langzeitinkubation mit NO ein Anstieg im Ceramidspiegel festgestellt. TNF α dagegen bewirkt einen raschen, aber nur vorübergehenden Anstieg des Ceramidspiegels und ist nicht in der Lage in diesen Zellen Apoptose zu induzieren. Beide Signale führen zu einer chronischen Aktivierung der sauren und neutralen Sphingomyelinase. TNF α aktiviert aber gleichzeitig die saure und neutrale Ceramidase, wodurch der Ceramidspiegel in den Zellen konstant bleibt. Inkubiert man die Zellen nun mit TNF α und dem Ceramidasehemmer OE wird auch über TNF α in den Zellen Apoptose induziert (Huwiler *et al.*, 1999). Zusammenfassend kann man sagen, daß eine

Erhöhung der Ceramidkonzentration entweder durch Sphingomyelinabbau und/oder durch Hemmung des Ceramidabbaus in Zellen Apoptose induzieren kann. In den tumorigenen Hybride AC-1M81 und AC-1M88 könnte die Anwesenheit von Saposin D, dem Ceramidaseaktivator, einen schnellen Abbau von Ceramid bewirken und so die Zellen vor der Apoptose retten. Die Zelllinien AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59 und AC1-1 dagegen fehlt der Ceramidaseaktivator und bei ihnen ist die Induktion einer Ceramid-abhängigen Apoptose niederschwelliger.

3. Interleukin-17

Interleukin-17 wurde in den 90er Jahren erstmals beschrieben. Das Zytokin wird ausschließlich von aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten produziert. Andere untersuchte Gewebe einschließlich Plazenta zeigten keine mRNA für das Protein. Das Protein kommt in glykosylierter und unglykosylierter Form vor und bildet Homodimere. Es induziert die Sekretion von Interleukin-6, Interleukin-8, G-CSF und PGE₂ und die Oberflächenexpression vom ICAM-1 in Fibroblasten. Es handelt sich also um ein übergeordnetes Zytokin, welches die Sekretion anderer Zytokine induziert (Fossiez *et al.*, 1996; Yao *et al.*, 1995). Das von Interleukin-17 induzierte Interleukin-6 wirkt bei vielen Tumorzelllinien als Wachstumsfaktor (Fridman and Tartour, 1997). Interleukin-8 ist ein autokrin wirkender Wachstumsfaktor für Melanome (Schadendorf *et al.*, 1993). Interleukin-8 Expression wurde in direktem Zusammenhang mit der Fähigkeit von Zellen, in der Nacktmaus zu metastasieren, beschrieben (Singh *et al.*, 1994). Tartour *et al.* haben gezeigt, daß Interleukin-17 die Sekretion von Interleukin-6 und Interleukin-8 in den Tumorzelllinien HeLa (Zervixkarzinom), IC1 (Zervixkarzinom), WM793 (Melanom) und HT144 (Melanom) signifikant erhöht. Außerdem wird bei den beiden Zervixkarzinomzelllinien HeLa und IC1, die mit Interleukin-17 transfiziert wurden, das Tumorstadium in Nacktmäusen im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen beschleunigt. Die Expression von Maus-Interleukin-6 wurde durch das von den Tumorzellen exprimierte Interleukin-17 induziert. Die Tumoren der transfizierten Zellen waren durch Mausmakrophagen infiltriert, die man in den Tumoren der nicht transfizierten Zellen nicht findet. Die Tumorzinsidenz ist in den transfizierten Zellen allerdings nicht erhöht (Tartour *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu normalem Ovargewebe, in dem Interleukin-17 nicht gefunden wird, wurde die Expression des Zytokins auch in Biopsien von Ovarkarzinomen nachgewiesen (Kato *et al.*, 2001). Zusammenfassend kann man sagen, das Interleukin-17 das Wachstum von Tumorzellen über die Induktion von Interleukin-6 und Interleukin-8 fördert, aber nicht ursächlich für die Entstehung von Tumorzellen verantwortlich ist. In den Hybriden bedeutet dies, daß Interleukin-17 das Wachstum der Tumoren in der Nacktmaus fördert. Tatsächlich wachsen die Tumoren der Zelllinie AC-1M88 schneller als die von JEG-3, die kein Interleukin-17 exprimieren. Da Interleukin-6 nicht in den Zellen

exprimiert wird muß man davon ausgehen, daß bei einer Wachstumsförderung durch Interleukin-17 in den Tumoren die Interleukine 6 und 8 von Mäusezellen sezerniert werden.

4. CD40R

Der CD40-Rezeptor (CD40R; TNFRSF5) ist ein Membranprotein von 48kDa und gehört zur Superfamilie der Tumornekrosefaktor (TNF)-rezeptoren (Smith *et al.*, 1994). Er wurde erstmals im Jahr 1989 beschrieben (Stamenkovic *et al.*, 1989). Der Rezeptor wird exprimiert von B-Zellen, dendritischen Zellen und verschiedenen Karzinomen (Paulie *et al.*, 1989; Schriever *et al.*, 1989). Die Aktivierung des Rezeptors erfolgt durch den CD40-Liganden (CD40L; TNFSF5). In den B-Lymphozyten führt die Aktivierung von CD40R zur T-Zell-abhängigen Aktivierung von B-Lymphozyten. Das Signal wird benötigt für die Proliferation von B-Zellen, die Bildung von Keimzentren, die Aktivierung von B-Gedächtniszellen und den Wechsel der Ig-Klasse (Isotype switching). Der Signaltransduktionsweg über CD40R führt in den Keimzentren zur Rettung der aktivierten B-Zellen aus dem apoptotischen Standardweg. Dies ist wichtig für die Entstehung hoch affiner Antikörper im Rahmen der *in vivo* Maturation der Immunantwort (Kehry, 1996). Der Ligand wird in diesem Fall von CD4+-T-Lymphozyten nicht als lösliches Protein, sondern als Membranprotein exprimiert.

Bei Patienten mit X-gekoppelter Immundefizienz mit Hyper-IgM liegt eine Mutation im CD40L vor, dessen Gen auf Xq26 – distal des Lokus von HGPRT - liegt. Durch die Mutation unterbleibt die Rettung aktivierter B-Zellen vor der Apoptose über den durch CD40R vermittelten Weg und der Wechsel der Ig-Klasse ist gestört. In diesem Krankheitsbild kommt es nicht zu einer Bildung von Keimzentren, die T-Zell-abhängige Aktivierung von B-Lymphozyten findet nicht statt und man findet stark erhöhte Level von IgM-Antikörpern im Serum bei gleichzeitigem Fehlen von IgG und IgE, weil die B-Zellen den Antikörperisotyp nicht wechseln können. Bei CD40R-Knockout Mäusen findet man einen vergleichbaren Phänotyp (Castigli *et al.*, 1994).

Neben dieser physiologischen Funktion im Immunsystem wird CD40R auch auf B- und T-Zell-Lymphomen und Karzinomen exprimiert. In den Karzinomen kann CD40R zwei unterschiedliche Funktionen übernehmen. Zum einen führt die Aktivierung von CD40R in verschiedenen Karzinomen zur Apoptose der malignen Zellen (Young *et al.*, 1998). Auf der anderen Seite kann der Signaltransduktionsweg über CD40R Zellen aus der Apoptose retten. Die Inhibition von Fas und TNF α induzierter Apoptose durch die Aktivierung von CD40R wurde bei mehreren Blasen- und Leberzellkarzinomen beschrieben (Jakobson *et al.*, 1998; Sugimoto *et al.*, 1999). Bei Lungenkrebspatienten wurde zudem eine Korrelation zwischen der Expression von CD40R und dem weiteren Krankheitsverlauf gefunden. Erhöhte CD40R Expression korreliert mit einer schlechteren klinischen Prognose. Von 18

aus den Tumoren von Patienten etablierten Zelllinien waren 14 CD40R+. Von diesen 14 Patienten hatten 13 Metastasen in den Lymphknoten oder hämatogene bzw. generalisierte Metastasen und die durchschnittliche Überlebensrate lag bei $1,1 \pm 0,4$ Jahren. Die vier Patienten, deren Tumorzelllinien CD40- waren zeigten keine Metastasen und die durchschnittliche Überlebensrate lag bei $2,5 \pm 0,9$ Jahren (Sabel *et al.*, 2000).

Für B- und T-Zell-Lymphome wird eine autokrine oder parakrine Stimulation von CD40R über seinen Liganden postuliert. So findet man in B-Zelllymphomen eine Koexpression von CD40L und CD40R in den Zellen und der CD40L-Serumspiegel der Patienten ist erhöht (Clodi *et al.*, 1998; Younes *et al.*, 1998). Auch in neoplastischen T-Zellen ist eine konstitutive Koexpression von CD40R und CD40L beschrieben (Storz *et al.*, 2001). In beiden Systemen besteht die Möglichkeit, daß die Zellen durch eine autokrine oder parakrine Schleife vor der physiologischen Apoptose bewahrt werden. In einer Studie mit 71 Patienten über die Expression von CD40R in malignen Melanomen waren 41 Tumoren positiv für CD40R. Ein Teil der CD40R+ Tumoren zeigten in den gleichen Arealen eine Expression von CD40L. Patienten mit dieser Koexpression hatten kürzere tumorfreie Phasen als Patienten, deren Tumoren CD40R+ und CD40L- waren. Die Autoren erklären dies mit einer autokrinen Stimulation der Zellen über CD40R, durch die die Zellen auch in den Melanomen aus der Apoptose gerettet werden (van den Oord *et al.*, 1996).

Bei der physiologische Rettung der B-Zellen aus der Apoptose aktiviert CD40R direkt NF- κ B (Berberich *et al.*, 1994). Die wichtigste Funktion von NF- κ B ist die Aktivierung anti-apoptotisch wirkender Gene wie z.B. Bcl-x_L (Hinz *et al.*, 2001) und A20 (Sarma *et al.*, 1995). Beide Moleküle sind als wichtige Faktoren bei der Rettung der B-Zellen aus der Apoptose beschrieben (Kehry, 1996; Sarma *et al.*, 1995). NF- κ B aktiviert außerdem die Transkription von CD40R, so daß es zu einer konstitutiven Expression von CD40R und NF- κ B in den Zellen kommt (Hinz *et al.*, 2001).

In den Hybriden könnte ebenfalls eine autokrine oder parakrine Schleife für die Aktivierung von CD40R vorliegen, da der Ligand in den Tumorzellen der Nacktmaustumoren nachgewiesen werden konnte. Diese Schleife kann nur in den Zelllinien existieren, in denen ein normales X-Chromosom aktiv ist, weil bei dem veränderten X-Chromosom addXq26 das Gen für den CD40L nicht mehr vorhanden ist, da dieses distal der Bruchstelle im HGPRT-Lokus liegt. In der Zelllinie AC1-1 ist die autokrine oder parakrine Stimulation von CD40 also gar nicht möglich, da diesen Zellen eine Kopie des CD40L-Gens fehlt. Die Zellen können über CD40R also nicht aus der Apoptose gerettet werden. Dies kann erklären, warum diese Zellen den wirtseigenen Abwehrmechanismen weniger entgegenzusetzen haben und damit eine geringere Tumorigenität aufweisen. In den Hybriden AC-1M81 und AC-1M88 ist die Stimulation von CD40R in jedem Fall möglich, denn diese Zellen enthalten nur normale X-Chromosomen. Diese beiden Zelllinien sind die am stärksten tumorigenen Hybride. Diese

Tatsache könnte also damit erklärt werden, daß es diesen Zellen möglich ist trotz Apoptose-Signalen zu überleben, da sie über die Aktivierung von NF- κ B die Apoptosekaskade stoppen können. Bei den drei anderen Zelllinien AC-1M32, AC-1M46 und AC-1M59, die sowohl ein normales als auch ein verändertes X-Chromosom enthalten, ist entscheidend, welches X-Chromosom aktiv ist. Im Nacktmausexperiment wäre dann möglicherweise ein Selektionsprozess zu erwarten, bei dem CD40R/CD40L positive Zellen bevorzugt überleben. Dies ist eine plausible Hypothese, die erklärt, warum in diesen Zelllinien die Tumoren später (nach einer längeren in vivo lag-phase) auftraten und kleiner waren. In der Zelllinie AC-1M59, die keine Tumoren verursacht, müßte danach immer das addXq26 das aktive X-Chromosom sein. Trotz dieser naheliegenden Interpretation kann nicht ausgeschlossen werden, daß weitere, bisher unbekannte Faktoren eine Erklärung für die Befunde liefern können. Allerdings ist die CD40R/CD40L Hypothese eine attraktive Eingangshypothese für weiterführende Studien. Im Rahmen solcher Experimente wäre zu überprüfen, welche X-Chromosomen in den Tumoren tatsächlich aktiviert sind und ob es zu einer klonalen Selektion bei den mittelgradig tumorigenen Zelllinien in vivo kommt. Das Ziel dieser Arbeit, sinnvolle und überprüfbare Kandidatengene zu identifizieren und für die weitere experimentelle Arbeit vorbereitende Daten zu liefern, ist aber erreicht.

4.3 *Schlußfolgerungen und Ausblick*

Zusammenfassend kann man sagen, daß bei den Onkogenen zwei Moleküle (CD40-Rezeptor und Saposin D) identifiziert worden sind, deren Aktivierung einen Abbruch der Apoptosekaskade zur Folge haben kann. Diese Moleküle sind ursächlich für die Entstehung von Tumoren verantwortlich, da sie es Zellen ermöglichen zu überleben und sich letztendlich zu vermehren, die eigentlich sterben sollten. In den tumorigenen Hybriden kann diese Rettung aus der Apoptose zu der nach der Fusion wieder neu erworbenen Eigenschaft der starken Tumorigenität beitragen.

Um zu überprüfen, inwieweit die autokrine Schleife **CD40R/CD40L** funktionell relevant ist, sind weitere Versuche erforderlich. In Nacktmaustumoren muß die Expression von CD40R und von CD40L quantitativ bestimmt werden. Außerdem muß man untersuchen, ob wirklich eine Kolokalisation der beiden Proteine in den Tumoren vorliegt. Dies ist leider mit dem uns zur Verfügung stehenden Tumormaterial nicht möglich. Ob die autokrine oder parakrine Stimulation für die Entstehung von Tumoren ausreicht, kann durch konstitutive Expression von CD40R und CD40L nach Transfektion in AC-1M59 und AC1-1 überprüft werden. Auch Versuche mit antisense-RNA in den Hybriden AC-1M81 und AC-1M88, welche die Translation von CD40R oder CD40L hemmt sind möglich. In diesem Fall müßte die Tumorigenität der Zelllinien geringer werden. Die Hypothese der in vivo Selektion auf

CD40R/CD40L positive Zellen in den Zelllinien AC-1M32 und AC-1M46 kann durch Kultivierung und Charakterisierung von Zellen aus Nacktmaustumoren überprüft werden.

Da **Saposin D** posttranslational aus Prosaposin gespleißt wird, kann die Klärung seiner Rolle nur auf der Proteinebene erfolgen, d.h. durch Herstellung von geeigneten Antikörpern mit Hilfe der in der Arbeitsgruppe vorhandenen Phage Display Bibliothek. Mit diesen Antikörpern kann dann eine Expression in den Tumoren nachgewiesen werden. Außerdem kann in den Zelllinien und in den Tumoren der Ceramidspiegel bestimmt werden, um daraus Rückschlüsse auf die Anfälligkeit der Zellen für Apoptose zu ziehen. Auch bei Saposin D kann in weiteren Experimenten mit antisense-RNA untersucht werden, ob es zu einer Abnahme der Tumorigenität in den Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88 kommt.

Das dritte Molekül, **Interleukin-17**, fördert das Wachstum von Tumoren. In welcher Wachstumsphase der Zellen das Gen exprimiert wird kann durch reverse Transkription mit anschließender spezifischer PCR geklärt werden. In weiteren Experimenten muß durch in situ Hybridisierung oder Antikörper untersucht werden, ob in den Tumoren Maus-Interleukin-6 und Interleukin-8 exprimiert wird und welche Zellen die Proteine sezernieren. Außerdem kann untersucht werden, ob bei konstitutiver Expression von Interleukin-17 in Zelllinien, die kein endogenes Interleukin-17 besitzen, die Tumoren der transfizierten Zellen in den Nacktmäusen schneller wachsen.

Annexin III scheint auf Grund seiner Expression in den nicht bzw. schwach tumorigenen Zelllinien AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59 und AC1-1 in unserem System als Tumorsuppressor zu wirken. Ob diese Funktion wirklich zutrifft kann nach der Transfektion von AC-1M81 und AC-1M88 mit dem Gen für Annexin III in weiteren Nacktmausexperimenten überprüft werden. Bei einer positiven Korrelation müßte die Tumorigenität der Zelllinien abnehmen. Wie das Protein als Tumorsuppressor wirkt und mit welchen Proteinen es interagiert ist dabei zur Zeit völlig unbekannt. Aus diesem Grund wäre es interessant mit geeigneten Yeast-Two-Hybrid-Systemen für dieses Protein erst einmal nach Reaktionspartnern zu suchen. Erst wenn diese Partner gefunden sind können weitere Experimente zur Klärung der Funktion von Annexin III in den Hybriden entworfen werden.

Bei allen hier angeregten Versuchen mit transfizierten Zellen darf allerdings nicht vergessen werden, daß mit gewisser Wahrscheinlichkeit das Zusammenspiel mehrerer Faktoren, d.h. eventuell aller vier hier zusammengefaßten Proteine, ursächlich für das tumorigene Potential einer Zelllinie verantwortlich ist. In so einem Fall würde die Elimination oder Neuexpression eines Faktors nicht zu einer umfassenden Änderung des Phänotyps führen. Bei Ausschalten eines Weges zur Verhinderung der Apoptose steht den Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88 z.B. immer noch ein zweiter Weg zur Verfügung. Auch könnte die Transfektion von AC-1M59

mit z.B. CD40R und CD40L bei gleichzeitiger Anwesenheit des Tumorsuppressors Annexin III nicht den gewünschten oder erwarteten Effekt zeigen.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß

- ein experimentelles System geschaffen worden ist, in dem Gene, die für Invasivität/Tumorigenität verantwortlich sind, identifiziert werden konnten;
- die 16 identifizierten Gene, die positiv bzw. negativ mit Tumorigenität korrelieren, bisher nicht im Zusammenhang mit Invasivität bzw. Malignität von menschlichen Trophoblasten diskutiert worden sind;
- es sich interessanterweise herausstellte, daß genetisches Material (vorzugsweise X-chromosomal) normaler Trophoblastzellen für die volle Ausbildung der Tumorigenität der Hybriden erforderlich war;
- sich für CD40R/CD40L Phänotyp und Genotyp zusammenführen lassen, da CD40L auf dem Abschnitt des X-Chromosoms (Xq26) kodiert wird, dessen Deletion zur Verringerung der Tumorigenität führt.

5. Zusammenfassung

Normale menschliche Trophoblastzellen sind natürlicherweise invasiv. Sie unterscheiden sich von ihren malignen Gegenstücken, den Choriokarzinomzellen vor allem dadurch, daß ihre Invasionstiefe und Invasionsdauer begrenzt sind.

Um die molekularen Unterschiede zwischen normaler und maligner Invasion analysieren zu können, wurden normale invasive extravillöse Trophoblastzellen aus der menschlichen Eihaut mit einer HGPRT-negativen Mutante der Choriokarzinomzelllinie JEG-3 hybridisiert.

In dem vorgelegten Projekt wurden 92 monoklonale Zelllinien aus der Hybridpopulation ACH1P isoliert. Fünf der gewonnenen Zelllinien wurden zufällig ausgewählt und näher charakterisiert.

Mit Hilfe des DNA-Fingerabdruckes konnte festgestellt werden, daß die untersuchten Zelllinien sich unterscheiden und daß sie sowohl genetisches Material der einen Elternzelllinie AC1-1 als auch zusätzliches genetisches Material vermutlich aus der zweiten Elternzelle, dem extravillösen Trophoblast, enthalten. Zusätzlich konnte mit Hilfe der Zytogenetik die klonale Identität der Zelllinien bestätigt werden und die Karyogramme beweisen den Hybridcharakter der Zellen.

Die Untersuchung der Tumorigenität der Zelllinien in den Nacktmäusen ergab, daß die Zelllinie AC-1M59 nicht tumorigen ist, die Zelllinien AC1-1, AC-1M32 und AC-1M46 schwach tumorigen sind und die Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88 stark tumorigen sind.

Die in den Nacktmäusen festgestellte Tumorigenität korreliert dabei positiv mit der Abwesenheit des von AC1-1 in die Fusion eingebrachten veränderten X-Chromosoms addXq26, da nur die Zellen ohne dieses X-Chromosom stark tumorigen sind. AddXq26 unterscheidet sich von einem normalen X-Chromosom durch die Deletion allen genetischen Materials distal der Bruchstelle bei Xq26. Dieser Befund impliziert, daß die von der Deletion bzw. Translokation betroffenen Gene eine Auswirkung auf den Phänotyp der Zelllinien haben könnten.

Per cDNA-Array und 2-D PAGE wurden 16 Gene/Genprodukte identifiziert, die beim Vergleich von tumorigenen mit nicht bzw. schwach tumorigenen Zelllinien differentiell exprimiert werden (s. Tabelle 24 und Tabelle 25). Die identifizierten Gene sind nicht auf den von der Deletion bzw. Translokation an addXq26 betroffenen Abschnitten lokalisiert. Der

Ligand des differentiell exprimierten CD40-Rezeptors liegt allerdings auf dem deletierten Abschnitt des X-Chromosoms, so daß man für dieses Rezeptor/Ligand-Paar eine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp herstellen kann.

6. Literaturverzeichnis

- Abbott, C. and Povey, S. (1995). "Somatic cell hybrids," IRL Press , Oxford.
- Ahmad, A. and Hart, I. R. (1997). Mechanisms of metastasis. *Crit Rev Oncol Hematol* **26**:163-173.
- Albelda, S. M., Mette, S. A., Elder, D. E., Stewart, R., Damjanovich, L., Herlyn, M., and Buck, C. A. (1990). Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res* **50**:6757-6764.
- Aplin, J. D. (1993). Expression of integrin alpha 6 beta 4 in human trophoblast and its loss from extravillous cells. *Placenta* **14**:203-215.
- Ardini, E., Tagliabue, E., Magnifico, A., Buto, S., Castronovo, V., Colnaghi, M. I., and Menard, S. (1997). Co-regulation and physical association of the 67-kDa monomeric laminin receptor and the alpha6beta4 integrin. *J Biol Chem* **272**:2342-2345.
- Arnould, C., Philippe, C., Bourdon, V., Gr goire, M. J., Berger, R., and Jonveaux, P. (1999). The signal transducer and activator of transcription STAT5b gene is a new partner of retinoic acid receptor alpha in acute promyelocytic-like leukaemia. *Hum Mol Genet* **8**:1741-1749.
- Azuma, N., O'Brien, J. S., Moser, H. W., and Kishimoto, Y. (1994). Stimulation of acid ceramidase activity by saposin D. *Arch Biochem Biophys* **311**:354-357.
- Baxter, R. C. (2001). Signalling pathways involved in antiproliferative effects of IGFBP-3: a review. *Mol Pathol* **54**:145-148.
- Beham, A., Denk, H., and Desoye, G. (1988). The distribution of intermediate filament proteins, actin and desmoplakins in human placental tissue as revealed by polyclonal and monoclonal antibodies. *Placenta* **9**:479-492.
- Benirschke, K. and Kaufmann, P. (2000). "Pathology of the human placenta," Springer Verlag, New York.
- Berberich, I., Shu, G. L., and Clark, E. A. (1994). Cross-linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor-kappa B. *J Immunol* **153**:4357-4366.
- Billstrom, A., Lecander, I., Dagnaes-Hansen, F., Dahllof, B., Stenram, U., and Hartley-Asp, B. (1995). Differential expression of uPA in an aggressive (DU 145) and a nonaggressive (1013L) human prostate cancer xenograft. *Prostate* **26**:94-104.
- Bohle, A. S. and Kalthoff, H. (1999). Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Langenbecks Arch Surg* **384**:133-140.
- Bosserhoff, A. K., Lederer, M., Kaufmann, M., Hein, R., Stolz, W., Apfel, R., Bogdahn, U., and Buettner, R. (1999). MIA, a novel serum marker for progression of malignant melanoma . *Anticancer Res* **19**:2691-2693.
- Campo, E., Merino, M. J., Liotta, L., Neumann, R., and Stetler-Stevenson, W. (1992). Distribution of the 72-kd type IV collagenase in nonneoplastic and neoplastic thyroid tissue. *Hum Pathol* **23**:1395-1401.
- Canete-Soler, R., Litzky, L., Lubensky, I., and Muschel, R. J. (1994). Localization of the 92 kd gelatinase mRNA in squamous cell and adenocarcinomas of the lung using in situ hybridization. *Am J Pathol* **144**:518-527.

- Castigli, E., Alt, F. W., Davidson, L., Bottaro, A., Mizoguchi, E., Bhan, A. K., and Geha, R. S. (1994). CD40-deficient mice generated by recombination-activating gene-2- deficient blastocyst complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:12135-12139.
- Castronovo, V., Campo, E., van den Brule, F. A., Claysmith, A. P., Cioce, V., Liu, F. T., Fernandez, P. L., and Sobel, M. E. (1992a). Inverse modulation of steady-state messenger RNA levels of two non-integrin laminin-binding proteins in human colon carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **84**:1161-1169.
- Castronovo, V., Colin, C., Claysmith, A. P., Chen, P. H., Lifrange, E., Lambotte, R., Krutzsch, H., Liotta, L. A., and Sobel, M. E. (1990). Immunodetection of the metastasis-associated laminin receptor in human breast cancer cells obtained by fine-needle aspiration biopsy. *Am J Pathol* **137**:1373-1381.
- Castronovo, V., Luyten, F., van den, B. F., and Sobel, M. E. (1992b). Identification of a 14-kDa laminin binding protein (HLBP14) in human melanoma cells that is identical to the 14-kDa galactoside binding lectin. *Arch Biochem Biophys* **297**:132-138.
- Castronovo, V., Taraboletti, G., and Sobel, M. E. (1991). Functional domains of the 67-kDa laminin receptor precursor. *J Biol Chem* **266**:20440-20446.
- Cerione, R. A. and Zheng, Y. (1996). The Dbl family of oncogenes. *Curr Opin Cell Biol* **8**:216-222.
- Chan, B. M., Matsuura, N., Takada, Y., Zetter, B. R., and Hemler, M. E. (1991). In vitro and in vivo consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells. *Science* **251**:1600-1602.
- Chan, S. S., Zheng, H., Su, M. W., Wilk, R., Killeen, M. T., Hedgecock, E. M., and Culotti, J. G. (1996). UNC-40, a *C. elegans* homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues. *Cell* **87**:187-195.
- Chataway, T. K., Whittle, A. M., Lewis, M. D., Bindloss, C. A., Davey, R. C., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Hopwood, J. J., and Meikle, P. J. (1998). Two-dimensional mapping and microsequencing of lysosomal proteins from human placenta. *Placenta* **19**:643-654.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156-159.
- Chou, J. Y. (1978). Establishment of clonal human placental cells synthesizing human choriogonadotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**:1854-1858.
- Chumbley, G., King, A., Gardner, L., Howlett, S., Holmes, N., and Loke, Y. W. (1994). Generation of an antibody to HLA-G in transgenic mice and demonstration of the tissue reactivity of this antibody. *J Reprod Immunol* **27**:173-186.
- Cioce, V., Castronovo, V., Shmookler, B. M., Garbisa, S., Grigioni, W. F., Liotta, L. A., and Sobel, M. E. (1991). Increased expression of the laminin receptor in human colon cancer. *J Natl Cancer Inst* **83**:29-36.
- Clarke, M. R., Landreneau, R. J., Finkelstein, S. D., Wu, T. T., Ohori, P., and Yousem, S. A. (1997). Extracellular matrix expression in metastasizing and nonmetastasizing adenocarcinomas of the lung. *Hum Pathol* **28**:54-59.
- Clauss, M. (2000). Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost* **26**:561-569.
- Clodi, K., Asgary, Z., Zhao, S., Kliche, K. O., Cabanillas, F., Andreeff, M., and Younes, A. (1998). Coexpression of CD40 and CD40 ligand in B-cell lymphoma cells. *Br J Haematol* **103**:270-275.

- Corcoran, M. L., Hewitt, R. E., Kleiner, D. E., Jr., and Stetler-Stevenson, W. G. (1996). MMP-2: expression, activation and inhibition. *Enzyme Protein* **49**:7-19.
- Coussens, L. M. and Werb, Z. (1996). Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol* **3**:895-904.
- Croxtall, J. D. and Flower, R. J. (1992). Lipocortin 1 mediates dexamethasone-induced growth arrest of the A549 lung adenocarcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:3571-3575.
- D'Errico, A., Garbisa, S., Liotta, L. A., Castronovo, V., Stetler-Stevenson, W. G., and Grigioni, W. F. (1991). Augmentation of type IV collagenase, laminin receptor, and Ki67 proliferation antigen associated with human colon, gastric, and breast carcinoma progression. *Mod Pathol* **4**:239-246.
- Damsky, C. H., Fitzgerald, M. L., and Fisher, S. J. (1992). Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J Clin Invest* **89**:210-222.
- De Bernardo, E. and Davies, T. F. (1987). A study of human-human hybridomas from patients with autoimmune thyroid disease. *J Clin Immunol* **7**:71-77.
- Dodge, G. R., Kovalszky, I., Chu, M. L., Hassell, J. R., McBride, O. W., Yi, H. F., and Iozzo, R. V. (1991). Heparan sulfate proteoglycan of human colon: partial molecular cloning, cellular expression, and mapping of the gene (HSPG2) to the short arm of human chromosome 1. *Genomics* **10**:673-680.
- Dreau, D., Bosserhoff, A. K., White, R. L., Buettner, R., and Holder, W. D. (1999). Melanoma-inhibitory activity protein concentrations in blood of melanoma patients treated with immunotherapy. *Oncol Res* **11**:55-61.
- Duffy, M. J., Reilly, D., O'Sullivan, C., O'Higgins, N., Fennelly, J. J., and Andreasen, P. (1990). Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res* **50**:6827-6829.
- Dumont, D. J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K., Breitman, M., and Alitalo, K. (1998). Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* **282**:946-949.
- Favier-Perron, B., Lewit-Bentley, A., and Russo-Marie, F. (1996). The high-resolution crystal structure of human annexin III shows subtle differences with annexin V. *Biochemistry* **35**:1740-1744.
- Fearon, E. R., Cho, K. R., Nigro, J. M., Kern, S. E., Simons, J. W., Ruppert, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Thomas, G., Kinzler, K. W., and . (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* **247**:49-56.
- Fidler, I. J. and Hart, I. R. (1982). Recent observations on the pathogenesis of cancer metastasis. *Prog Clin Biol Res* **85 Pt B**:601-619.
- Folkman, J. and Cotran, R. (1976). Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol* **16**:207-248.
- Fossiez, F., Djossou, O., Chomarot, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J. J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., Blanchard, D., Gaillard, C., Das, M. B., Rouvier, E., Golstein, P., Banchereau, J., and Lebecque, S. (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* **183**:2593-2603.
- Frank, H. G., Gunawan, B., Ebeling-Stark, I., Schulten, H. J., Funayama, H., Cremer, U., Huppertz, B., Gaus, G., Kaufmann, P., and Fuzesi, L. (2000). Cytogenetic and DNA-fingerprint characterization

- of choriocarcinoma cell lines and a trophoblast/choriocarcinoma cell hybrid. *Cancer Genet Cytogenet* **116**:16-22.
- Frank, H. G., Huppertz, B., Kertschanska, S., Blanchard, D., Roelcke, D., and Kaufmann, P. (1995). Anti-adhesive glycosylation of fibronectin-like molecules in human placental matrix-type fibrinoid. *Histochem Cell Biol* **104**:317-329.
- Frank, H. G., Malekzadeh, F., Kertschanska, S., Crescimanno, C., Castellucci, M., Lang, I., Desoye, G., and Kaufmann, P. (1994). Immunohistochemistry of two different types of placental fibrinoid. *Acta Anat (Basel)* **150**:55-68.
- Fridman, W. H. and Tartour, E. (1997). Cytokines and cell regulation. *In* "Molecular aspects of medicine" pp. 3-90, Elsevier Science, Oxford.
- Friedrichs, K., Ruiz, P., Franke, F., Gille, I., Terpe, H. J., and Imhof, B. A. (1995). High expression level of alpha 6 integrin in human breast carcinoma is correlated with reduced survival. *Cancer Res* **55**:901-906.
- Funayama, H., Gaus, G., Ebeling, I., Takayama, M., Fuzesi, L., Huppertz, B., Kaufmann, P., and Frank, H. G. (1997). Parent cells for trophoblast hybridization II: AC1 and related trophoblast cell lines, a family of HGPRT-negative mutants of the choriocarcinoma cell line JEG-3. *Trophoblast Research* **10**:191-201.
- Galland, F., Karamysheva, A., Mattei, M. G., Rosnet, O., Marchetto, S., and Birnbaum, D. (1992). Chromosomal localization of FLT4, a novel receptor-type tyrosine kinase gene. *Genomics* **13**:475-478.
- Garbisa, S., Pozzatti, R., Muschel, R. J., Saffiotti, U., Ballin, M., Goldfarb, R. H., Khoury, G., and Liotta, L. A. (1987). Secretion of type IV collagenolytic protease and metastatic phenotype: induction by transfection with c-Ha-ras but not c-Ha-ras plus Ad2-E1a. *Cancer Res* **47**:1523-1528.
- Gaus, G., Funayama, H., Huppertz, B., Kaufmann, P., and Frank, H. G. (1997). Parent cells for trophoblast hybridization I: Isolation of extravillous trophoblast cells from human term chorion laeve. *Trophoblast Research* **10**:181-190.
- Giancotti, F. G. and Mainiero, F. (1994). Integrin-mediated adhesion and signaling in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* **1198**:47-64.
- Giancotti, F. G. and Ruoslahti, E. (1990). Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. *Cell* **60**:849-859.
- Gibbs, C. P., Tanaka, A., Anderson, S. K., Radul, J., Baar, J., Ridgway, A., Kung, H. J., and Fujita, D. J. (1985). Isolation and structural mapping of a human c-src gene homologous to the transforming gene (v-src) of Rous sarcoma virus. *J Virol* **53**:19-24.
- Giovanella, B. C. and Fogh, J. (1985). The nude mouse in cancer research. *Adv Cancer Res* **44**:69-120.
- Görg, A. Two-dimensional electrophoresis of proteins using immobilized pH gradients. TU München . 1998.
- Ref Type: Electronic Citation
- Graham, C. H., Hawley, T. S., Hawley, R. G., MacDougall, J. R., Kerbel, R. S., Khoo, N., and Lala, P. K. (1993). Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res* **206**:204-211.

- Graham, R. A., Meyer, R. A., Szwergold, B. S., and Brown, T. R. (1987). Observation of myo-inositol 1,2-(cyclic) phosphate in a Morris hepatoma by ^{31}P NMR. *J Biol Chem* **262**:35-37.
- Grümmer, R., Donner, A., and Winterhager, E. (1999). Characteristic growth of human choriocarcinoma xenografts in nude mice. *Placenta* **20**:547-553.
- Hall, C. L., Lange, L. A., Prober, D. A., Zhang, S., and Turley, E. A. (1996). pp60(c-src) is required for cell locomotion regulated by the hyaluronanreceptor RHAMM. *Oncogene* **13**:2213-2224.
- Hayer, J., Engel, M., Seifert, M., Seitz, G., and Welter, C. (2001). Overexpression of nm23-H4 RNA in colorectal and renal tumours. *Anticancer Res* **21**:2821-2825.
- Haywood-Reid, P. L., Zipf, D. R., and Springer, W. R. (1997). Quantification of integrin subunits on human prostatic cell lines-- comparison of nontumorigenic and tumorigenic lines. *Prostate* **31**:1-8.
- Heiss, M. M., Allgayer, H., Gruetzner, K. U., Funke, I., Babic, R., Jauch, K. W., and Schildberg, F. W. (1995). Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer. *Nat Med* **1**:1035-1039.
- Hennessy, C., Henry, J. A., May, F. E., Westley, B. R., Angus, B., and Lennard, T. W. (1991). Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: an association with good prognosis. *J Natl Cancer Inst* **83**:281-285.
- Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**:28-32.
- Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., Stein, R. B., Eichele, G., Evans, R. M., and Thaller, C. (1992). 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* **68**:397-406.
- Hinz, M., Loser, P., Mathas, S., Krappmann, D., Dorken, B., and Scheidereit, C. (2001). Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* **97**:2798-2807.
- Huhtala, P., Chow, L. T., and Tryggvason, K. (1990). Structure of the human type IV collagenase gene. *J Biol Chem* **265**:11077-11082.
- Hunt, J. S., Fishback, J. L., Chumbley, G., and Loke, Y. W. (1990). Identification of class I MHC mRNA in human first trimester trophoblast cells by in situ hybridization. *J Immunol* **144**:4420-4425.
- Hunt, J. S. and Hsi, B. L. (1990). Evasive strategies of trophoblast cells: selective expression of membrane antigens. *Am J Reprod Immunol* **23**:57-63.
- Huppertz, B., Kertschanska, S., Demir, A. Y., Frank, H. G., and Kaufmann, P. (1998). Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res* **291**:133-148.
- Huppertz, B., Kertschanska, S., Frank, H. G., Gaus, G., Funayama, H., and Kaufmann, P. (1996). Extracellular matrix components of the placental extravillous trophoblast: immunocytochemistry and ultrastructural distribution. *Histochem Cell Biol* **106**:291-301.
- Huppertz, B., Tews, D. S., and Kaufmann, P. (2001). Apoptosis and syncytial fusion in human placental trophoblast and skeletal muscle. *Int Rev Cytol* **205**:215-253.
- Huwiler, A., Pfeilschifter, J., and van den, B. H. (1999). Nitric oxide donors induce stress signaling via ceramide formation in rat renal mesangial cells. *J Biol Chem* **274**:7190-7195.

- Iba, K., Albrechtsen, R., Gilpin, B. J., Loechel, F., and Wewer, U. M. (1999). Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. *Am J Pathol* **154**:1489-1501.
- Irby, R. B., Mao, W., Coppola, D., Kang, J., Loubeau, J. M., Trudeau, W., Karl, R., Fujita, D. J., Jove, R., and Yeatman, T. J. (1999). Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nat Genet* **21**:187-190.
- Jakobson, E., Jonsson, G., Bjorck, P., and Paulie, S. (1998). Stimulation of CD40 in human bladder carcinoma cells inhibits anti-Fas/APO-1 (CD95)-induced apoptosis. *Int J Cancer* **77**:849-853.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., and Thein, S. L. (1985). Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* **314**:67-73.
- Jenq, W., Cooper, D. R., and Ramirez, G. (1996). Integrin expression on cell adhesion function and up-regulation of P125FAK and paxillin in metastatic renal carcinoma cells. *Connect Tissue Res* **34**:161-174.
- Jokhi, P. P., King, A., and Loke, Y. W. (1994). Reciprocal expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and c-erbB2 by non-invasive and invasive human trophoblast populations. *Cytokine* **6**:433-442.
- Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., van Hinsbergh, V. W., Fang, G. H., Dumont, D., Breitman, M., and Alitalo, K. (1995). Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:3566-3570.
- Kato, K., Cantwell, M. J., Sharma, S., and Kipps, T. J. (1998). Gene transfer of CD40-ligand induces autologous immune recognition of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* **101**:1133-1141.
- Kato, T., Furumoto, H., Ogura, T., Onishi, Y., Irahara, M., Yamano, S., Kamada, M., and Aono, T. (2001). Expression of IL-17 mRNA in ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **282**:735-738.
- Kaufmann, P. and Castellucc, M. (1997). Extravillous trophoblast in the human placenta - a review. *Trophoblast Research* **10**:21-65.
- Kehry, M. R. (1996). CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death. *J Immunol* **156**:2345-2348.
- Kennedy, T. E., Serafini, T., de, I. T., Jr., and Tessier-Lavigne, M. (1994). Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* **78**:425-435.
- Khoo, N. K., Bechberger, J. F., Shepherd, T., Bond, S. L., McCrae, K. R., Hamilton, G. S., and Lala, P. K. (1998). SV40 Tag transformation of the normal invasive trophoblast results in a premalignant phenotype. I. Mechanisms responsible for hyperinvasiveness and resistance to anti-invasive action of TGFbeta. *Int J Cancer* **77**:429-439.
- King, A., Boocock, C., Sharkey, A. M., Gardner, L., Beretta, A., Siccardi, A. G., and Loke, Y. W. (1996). Evidence for the expression of HLA-C class I mRNA and protein by human first trimester trophoblast. *J Immunol* **156**:2068-2076.
- Kingdom, J. C. and Kaufmann, P. (1997). Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta* **18**:613-621.
- Kishimoto, Y., Hiraiwa, M., and O'Brien, J. S. (1992). Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics. *J Lipid Res* **33**:1255-1267.

- Klein, A., Henseler, M., Klein, C., Suzuki, K., Harzer, K., and Sandhoff, K. (1994). Sphingolipid activator protein D (sap-D) stimulates the lysosomal degradation of ceramide in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **200**:1440-1448.
- Kohler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**:495-497.
- Kohler, P. O. and Bridson, W. E. (1971). Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **32**:683-687.
- Koshiba, T., Hosotani, R., Wada, M., Fujimoto, K., Lee, J. U., Doi, R., Arai, S., and Imamura, M. (1997). Detection of matrix metalloproteinase activity in human pancreatic cancer. *Surg Today* **27**:302-304.
- Kuhn, W., Pache, L., Schmalfeldt, B., Dettmar, P., Schmitt, M., Janicke, F., and Graeff, H. (1994). Urokinase (uPA) and PAI-1 predict survival in advanced ovarian cancer patients (FIGO III) after radical surgery and platinum-based chemotherapy. *Gynecol Oncol* **55**:401-409.
- Lang, I., Hartmann, M., Blaschitz, A., Dohr, G., Kaufmann, P., Frank, H. G., Hahn, T., Skofitsch, G., and Desoye, G. (1994). Differential lectin binding to the fibrinoid of human full-term placenta: correlation with a fibrin antibody and the PAF-Halmi method. *Acta Anat (Basel)* **150**:170-177.
- Lata, J. A., Tuan, R. S., Shepley, K. J., Mulligan, M. M., Jackson, L. G., and Smith, J. B. (1992). Localization of major histocompatibility complex class I and II mRNA in human first-trimester chorionic villi by in situ hybridization. *J Exp Med* **175**:1027-1032.
- Le, C., V, Russo-Marie, F., and Maridonneau-Parini, I. (1992). Differential expression of two forms of annexin 3 in human neutrophils and monocytes and along their differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **189**:1471-1476.
- Leiser, R. and Kaufmann, P. (1994). Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol* **102**:122-134.
- Lersch, R. and Fuchs, E. (1988). Sequence and expression of a type II keratin, K5, in human epidermal cells. *Mol Cell Biol* **8**:486-493.
- Lersch, R., Stellmach, V., Stocks, C., Giudice, G., and Fuchs, E. (1989). Isolation, sequence, and expression of a human keratin K5 gene: transcriptional regulation of keratins and insights into pairwise control. *Mol Cell Biol* **9**:3685-3697.
- Levy, A. T., Cioce, V., Sobel, M. E., Garbisa, S., Grigioni, W. F., Liotta, L. A., and Stetler-Stevenson, W. G. (1991). Increased expression of the Mr 72,000 type IV collagenase in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res* **51**:439-444.
- Liotta, L. A., Kleinerman, J., and Saidel, G. M. (1974). Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* **34**:997-1004.
- Liotta, L. A. and Kohn, E. C. (2000). Invasion and metastasis. In "Cancer medicine" (R. C. Bast, Jr., D. W. Kufe, R. E. Pollock, R. R. Weichselbaum, J. F. Holland, and E. Frei, Eds.), BC Decker Inc., Kanada.
- Liotta, L. A. and Stetler-Stevenson, W. G. (1990). Metalloproteinases and cancer invasion. *Semin Cancer Biol* **1**:99-106.

- Liu, X., Robinson, G. W., Gouilleux, F., Groner, B., and Hennighausen, L. (1995). Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:8831-8835.
- Livesey, F. J. (1999). Netrins and netrin receptors. *Cell Mol Life Sci* **56**:62-68.
- Mafune, K., Ravikumar, T. S., Wong, J. M., Yow, H., Chen, L. B., and Steele, G. D., Jr. (1990). Expression of a Mr 32,000 laminin-binding protein messenger RNA in human colon carcinoma correlates with disease progression. *Cancer Res* **50**:3888-3891.
- Mangelsdorf, D. J., Ong, E. S., Dyck, J. A., and Evans, R. M. (1990). Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* **345**:224-229.
- Martignone, S., Menard, S., Bufalino, R., Cascinelli, N., Pellegrini, R., Tagliabue, E., Andreola, S., Rilke, F., and Colnaghi, M. I. (1993). Prognostic significance of the 67-kilodalton laminin receptor expression in human breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst* **85**:398-402.
- Matrisian, L. M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* **14**:455-463.
- Mehlen, P., Rabizadeh, S., Snipas, S. J., Assa-Munt, N., Salvesen, G. S., and Bredesen, D. E. (1998). The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* **395**:801-804.
- Milon, L., Rousseau-Merck, M. F., Munier, A., Erent, M., Lascu, I., Capeau, J., and Lacombe, M. L. (1997). nm23-H4, a new member of the family of human nm23/nucleoside diphosphate kinase genes localised on chromosome 16p13. *Hum Genet* **99**:550-557.
- Mitelman, F. (1995). "An international system for human cytogenetic nomenclature (1995)," S. Karger, Basel.
- Moreau, P., Carosella, E., Teyssier, M., Prost, S., Gluckman, E., Dausset, J., and Kirszenbaum, M. (1995). Soluble HLA-G molecule. An alternatively spliced HLA-G mRNA form candidate to encode it in peripheral blood mononuclear cells and human trophoblasts. *Hum Immunol* **43**:231-236.
- Moreau, P., Teyssier, M., Kirszenbaum, M., Gluckman, E., Gourand, L., Carosella, E., and Dausset, J. (1994). HLA-G mRNA forms in human trophoblasts and peripheral blood lymphocytes: potential use in prenatal diagnosis. *Folia Biol (Praha)* **40**:431-438.
- Morimoto, S., Martin, B. M., Kishimoto, Y., and O'Brien, J. S. (1988). Saposin D: a sphingomyelinase activator. *Biochem Biophys Res Commun* **156**:403-410.
- Moser, T. L., Young, T. N., Rodriguez, G. C., Pizzo, S. V., Bast, R. C., Jr., and Stack, M. S. (1994). Secretion of extracellular matrix-degrading proteinases is increased in epithelial ovarian carcinoma. *Int J Cancer* **56**:552-559.
- Muhlhauser, J., Crescimanno, C., Kaufmann, P., Hofler, H., Zaccheo, D., and Castellucci, M. (1993). Differentiation and proliferation patterns in human trophoblast revealed by c-erbB-2 oncogene product and EGF-R. *J Histochem Cytochem* **41**:165-173.
- Nabholz, M., Miggiano, V., and Bodmer, W. (1969). Genetic analysis with human-mouse somatic cell hybrids. *Nature* **223**:358-363.
- Nakayama, T., Ohtsuru, A., Nakao, K., Shima, M., Nakata, K., Watanabe, K., Ishii, N., Kimura, N., and Nagataki, S. (1992). Expression in human hepatocellular carcinoma of nucleoside diphosphate kinase, a homologue of the nm23 gene product. *J Natl Cancer Inst* **84**:1349-1354.

- O'Brien, J. S. and Kishimoto, Y. (1991). Saposin proteins: structure, function, and role in human lysosomal storage disorders. *FASEB J* **5**:301-308.
- Onodera, S., Sasaki, T., and Tashiro, S. (1997). Isolation and immunochemical characterization of heparan sulfate rich proteoglycan (HSPG) present in the basement membrane of human placenta. *Biol Pharm Bull* **20**:113-117.
- Ossowski, L. and Reich, E. (1983). Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis. *Cell* **35**:611-619.
- Pasteris, N. G., Cadle, A., Logie, L. J., Porteous, M. E., Schwartz, C. E., Stevenson, R. E., Glover, T. W., Wilroy, R. S., and Gorski, J. L. (1994). Isolation and characterization of the faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome) gene: a putative Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor. *Cell* **79**:669-678.
- Paulie, S., Rosen, A., Ehlin-Henriksson, B., Braesch-Andersen, S., Jakobson, E., Koho, H., and Perlmann, P. (1989). The human B lymphocyte and carcinoma antigen, CDw40, is a phosphoprotein involved in growth signal transduction. *J Immunol* **142**:590-595.
- Perron, B., Lewit-Bentley, A., Geny, B., and Russo-Marie, F. (1997). Can enzymatic activity, or otherwise, be inferred from structural studies of annexin III? *J Biol Chem* **272**:11321-11326.
- Plantefaber, L. C. and Hynes, R. O. (1989). Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. *Cell* **56**:281-290.
- Potgens, A. J., Gaus, G., Frank, H. G., and Kaufmann, P. (2001). Characterization of trophoblast cell isolations by a modified flow cytometry assay. *Placenta* **22**:251-255.
- Price, J. T., Bonovich, M. T., and Kohn, E. C. (1997). The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **32**:175-253.
- Pyke, C., Ralfkiaer, E., Huhtala, P., Hurskainen, T., Dano, K., and Tryggvason, K. (1992). Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res* **52**:1336-1341.
- Quintans, J., Kilkus, J., McShan, C. L., Gottschalk, A. R., and Dawson, G. (1994). Ceramide mediates the apoptotic response of WEHI 231 cells to anti-immunoglobulin, corticosteroids and irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* **202**:710-714.
- Rabilloud, T. (1999). Silver staining of 2-D electrophoresis gels. *Methods Mol Biol* **112**:297-305.
- Rachmilewitz, J., Elkin, M., Rosensaft, J., Gelman-Kohan, Z., Ariel, I., Lustig, O., Schneider, T., Goshen, R., Biran, H., de Groot, N., and . (1995). H19 expression and tumorigenicity of choriocarcinoma derived cell lines. *Oncogene* **11**:863-870.
- Rao, C. N., Castronovo, V., Schmitt, M. C., Wewer, U. M., Claysmith, A. P., Liotta, L. A., and Sobel, M. E. (1989). Evidence for a precursor of the high-affinity metastasis-associated murine laminin receptor. *Biochemistry* **28**:7476-7486.
- Raynal, P. and Pollard, H. B. (1994). Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1197**:63-93.
- Ross, T. S. and Majerus, P. W. (1986). Isolation of D-myo-inositol 1:2-cyclic phosphate 2-inositolphosphohydrolase from human placenta. *J Biol Chem* **261**:11119-11123.

- Ross, T. S., Tait, J. F., and Majerus, P. W. (1990). Identity of inositol 1,2-cyclic phosphate 2-phosphohydrolase with lipocortin III. *Science* **248**:605-607.
- Ross, T. S., Whiteley, B., Graham, R. A., and Majerus, P. W. (1991). Cyclic hydrolase-transfected 3T3 cells have low levels of inositol 1,2- cyclic phosphate and reach confluence at low density. *J Biol Chem* **266**:9086-9092.
- Rothhut, B. (1997). Participation of annexins in protein phosphorylation. *Cell Mol Life Sci* **53**:522-526.
- Rubin, M., Fenig, E., Rosenauer, A., Menendez-Botet, C., Achkar, C., Bentel, J. M., Yahalom, J., Mendelsohn, J., and Miller, W. H., Jr. (1994). 9-Cis retinoic acid inhibits growth of breast cancer cells and down- regulates estrogen receptor RNA and protein. *Cancer Res* **54**:6549-6556.
- Sabel, M. S., Yamada, M., Kawaguchi, Y., Chen, F. A., Takita, H., and Bankert, R. B. (2000). CD40 expression on human lung cancer correlates with metastatic spread. *Cancer Immunol Immunother* **49**:101-108.
- Sakaguchi, A. Y., Mohandas, T., and Naylor, S. L. (1985). A human c-src gene resides on the proximal long arm of chromosome 20 (cen---q131). *Cancer Genet Cytogenet* **18**:123-129.
- Sakai, Y., Saijo, M., Coelho, K., Kishino, T., Niikawa, N., and Taya, Y. (1995). cDNA sequence and chromosomal localization of a novel human protein, RBQ-1 (RBBP6), that binds to the retinoblastoma gene product. *Genomics* **30**:98-101.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning, a laboratory manual," Cold Spring Harbour Press , New York.
- Santana, P., Pena, L. A., Haimovitz-Friedman, A., Martin, S., Green, D., McLoughlin, M., Cordon-Cardo, C., Schuchman, E. H., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (1996). Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* **86**:189-199.
- Sarma, V., Lin, Z., Clark, L., Rust, B. M., Tewari, M., Noelle, R. J., and Dixit, V. M. (1995). Activation of the B-cell surface receptor CD40 induces A20, a novel zinc finger protein that inhibits apoptosis. *J Biol Chem* **270**:12343-12346.
- Sato, H., Kida, Y., Mai, M., Endo, Y., Sasaki, T., Tanaka, J., and Seiki, M. (1992). Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene* **7**:77-83.
- Schadendorf, D., Moller, A., Algermissen, B., Worm, M., Sticherling, M., and Czarnetzki, B. M. (1993). IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *J Immunol* **151**:2667-2675.
- Schriever, F., Freedman, A. S., Freeman, G., Messner, E., Lee, G., Daley, J., and Nadler, L. M. (1989). Isolated human follicular dendritic cells display a unique antigenic phenotype. *J Exp Med* **169**:2043-2058.
- Schwaller, J., Parganas, E., Wang, D., Cain, D., Aster, J. C., Williams, I. R., Lee, C. K., Gerthner, R., Kitamura, T., Frantsve, J., Anastasiadou, E., Loh, M. L., Levy, D. E., Ihle, J. N., and Gilliland, D. G. (2000). Stat5 is essential for the myelo- and lymphoproliferative disease induced by TEL/JAK2. *Mol Cell* **6**:693-704.
- Sekar, M. C., Sambandam, V., Grizzle, W. E., and McDonald, J. M. (1996). Dissociation of cyclic inositol phosphohydrolase activity from annexin III. *J Biol Chem* **271**:8295-8299.

- Sekar, M. C., Sambandam, V., Roy, D., and Grizzle, W. E. (1995). Decreased cyclic inositol phosphohydrolase activity in hamster renal tumors and human renal cell carcinomas. *Biochem Mol Med* **56**:104-107.
- Sharma, B., Handler, M., Eichstetter, I., Whitelock, J. M., Nugent, M. A., and Iozzo, R. V. (1998). Antisense targeting of perlecan blocks tumor growth and angiogenesis in vivo. *J Clin Invest* **102**:1599-1608.
- Shih, I., Wang, T., Wu, T., Kurman, R. J., and Gearhart, J. D. (1998). Expression of Mel-CAM in implantation site intermediate trophoblastic cell line, IST-1, limits its migration on uterine smooth muscle cells. *J Cell Sci* **111 (Pt 17)**:2655-2664.
- Singh, R. K., Gutman, M., Radinsky, R., Bucana, C. D., and Fidler, I. J. (1994). Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. *Cancer Res* **54**:3242-3247.
- Smith, C. A., Farrah, T., and Goodwin, R. G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**:959-962.
- Stamenkovic, I., Clark, E. A., and Seed, B. (1989). A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J* **8**:1403-1410.
- Stone, D. M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T. A., Gu, Q., Johnson, R. L., Scott, M. P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., Noll, M., Hooper, J. E., de Sauvage, F., and Rosenthal, A. (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* **384**:129-134.
- Storz, M., Zepter, K., Kamarashev, J., Dummer, R., Burg, G., and Haffner, A. C. (2001). Coexpression of CD40 and CD40 ligand in cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides). *Cancer Res* **61**:452-454.
- Sugimoto, K., Shiraki, K., Ito, T., Fujikawa, K., Takase, K., Tameda, Y., Moriyama, M., and Nakano, T. (1999). Expression of functional CD40 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **30**:920-926.
- Tait, J. F., Frankenberry, D. A., Miao, C. H., Killary, A. M., Adler, D. A., and Disteché, C. M. (1991). Chromosomal localization of the human annexin III (ANX3) gene. *Genomics* **10**:441-448.
- Tartour, E., Fossiez, F., Joyeux, I., Galinha, A., Gey, A., Claret, E., Sastre-Garau, X., Couturier, J., Mosseri, V., Vives, V., Banchereau, J., Fridman, W. H., Wijdenes, J., Lebecque, S., and Sautès-Fridman, C. (1999). Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res* **59**:3698-3704.
- Tatti, M., Salvioli, R., Ciaffoni, F., Pucci, P., Andolfo, A., Amoresano, A., and Vaccaro, A. M. (1999). Structural and membrane-binding properties of saposin D. *Eur J Biochem* **263**:486-494.
- Tayama, M., Soeda, S., Kishimoto, Y., Martin, B. M., Callahan, J. W., Hiraiwa, M., and O'Brien, J. S. (1993). Effect of saposins on acid sphingomyelinase. *Biochem J* **290 (Pt 2)**:401-404.
- Testi, R. (1996). Sphingomyelin breakdown and cell fate. *Trends Biochem Sci* **21**:468-471.
- Theobald, J., Hanby, A., Patel, K., and Moss, S. E. (1995). Annexin VI has tumour-suppressor activity in human A431 squamous epithelial carcinoma cells. *Br J Cancer* **71**:786-788.
- Theobald, J., Smith, P. D., Jacob, S. M., and Moss, S. E. (1994). Expression of annexin VI in A431 carcinoma cells suppresses proliferation: a possible role for annexin VI in cell growth regulation. *Biochim Biophys Acta* **1223**:383-390.

- Trask, D. K., Band, V., Zajchowski, D. A., Yaswen, P., Suh, T., and Sager, R. (1990). Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:2319-2323.
- Traut, W. (1991). "Chromosomen. Klassische und molekulare Zytogenetik.," Springer Verlag, Berlin.
- Urbanski, S. J., Edwards, D. R., Maitland, A., Leco, K. J., Watson, A., and Kossakowska, A. E. (1992). Expression of metalloproteinases and their inhibitors in primary pulmonary carcinomas. *Br J Cancer* **66**:1188-1194.
- Vaccaro, A. M., Ciaffoni, F., Tatti, M., Salvioli, R., Barca, A., Tognozzi, D., and Scerch, C. (1995). pH-dependent conformational properties of saposins and their interactions with phospholipid membranes. *J Biol Chem* **270**:30576-30580.
- van den Oord, J. J., Maes, A., Stas, M., Nuyts, J., Battocchio, S., Kasran, A., Garmyn, M., De, W., I, and Wolf-Peeters, C. (1996). CD40 is a prognostic marker in primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol* **149**:1953-1961.
- Villavicencio, E. H., Walterhouse, D. O., and Iannaccone, P. M. (2000). The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet* **67**:1047-1054.
- Violette, S. M., King, I., Browning, J. L., Pepinsky, R. B., Wallner, B. P., and Sartorelli, A. C. (1990). Role of lipocortin I in the glucocorticoid induction of the terminal differentiation of a human squamous carcinoma. *J Cell Physiol* **142**:70-77.
- Weetman, A. P. (1999). The immunology of pregnancy. *Thyroid* **9**:643-646.
- Wewer, U. M., Liotta, L. A., Jaye, M., Ricca, G. A., Drohan, W. N., Claysmith, A. P., Rao, C. N., Wirth, P., Coligan, J. E., Albrechtsen, R., and . (1986). Altered levels of laminin receptor mRNA in various human carcinoma cells that have different abilities to bind laminin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:7137-7141.
- Whitehead, I. P., Abe, K., Gorski, J. L., and Der, C. J. (1998). CDC42 and FGD1 cause distinct signaling and transforming activities. *Mol Cell Biol* **18** :4689-4697.
- Wiesner, D. A., Kilkus, J. P., Gottschalk, A. R., Quintans, J., and Dawson, G. (1997). Anti-immunoglobulin-induced apoptosis in WEHI 231 cells involves the slow formation of ceramide from sphingomyelin and is blocked by bcl-XL. *J Biol Chem* **272**:9868-9876.
- Wolf, C., Chenard, M. P., Durand, d. G., Bellocq, J. P., Chambon, P., and Basset, P. (1992). Breast-cancer-associated stromelysin-3 gene is expressed in basal cell carcinoma and during cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol* **99**:870-872.
- Woodhouse, E. C., Chuaqui, R. F., and Liotta, L. A. (1997). General mechanisms of metastasis. *Cancer* **80**:1529-1537.
- Wortis, H. H. (1971). Immunological responses of 'nude' mice. *Clin Exp Immunol* **8**:305-317.
- Yao, Z., Painter, S. L., Fanslow, W. C., Ulrich, D., Macduff, B. M., Spriggs, M. K., and Armitage, R. J. (1995). Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* **155**:5483-5486.
- Younes, A., Snell, V., Consoli, U., Clodi, K., Zhao, S., Palmer, J. L., Thomas, E. K., Armitage, R. J., and Andreeff, M. (1998). Elevated levels of biologically active soluble CD40 ligand in the serum of patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* **100** :135-141.
- Young, L. S., Eliopoulos, A. G., Gallagher, N. J., and Dawson, C. W. (1998). CD40 and epithelial cells: across the great divide. *Immunol Today* **19**:502-506.

Yow, H. K., Wong, J. M., Chen, H. S., Lee, C. G., Davis, S., Steele, G. D., Jr., and Chen, L. B. (1988). Increased mRNA expression of a laminin-binding protein in human colon carcinoma: complete sequence of a full-length cDNA encoding the protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:6394-6398.

Zetter, B. R. (1998). Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* **49**:407-424.

Zhang, X. M., Ramalho-Santos, M., and McMahon, A. P. (2001). Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R symmetry by the mouse node. *Cell* **106**:781-792.

Zhou, M. D., Sucov, H. M., Evans, R. M., and Chien, K. R. (1995). Retinoid-dependent pathways suppress myocardial cell hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:7391-7395.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Synopsis zur Differenzierung extravillöser Trophoblastzellen.....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung einer 2-D PAGE.....	20
Abbildung 3: Karyogramm der Zelllinie AC-1M32.....	30
Abbildung 4: Karyogramm der Zelllinie AC-1M46.....	30
Abbildung 5: Karyogramm der Zelllinie AC-1M59.....	31
Abbildung 6: Karyogramm der Zelllinie AC-1M81.....	31
Abbildung 7: Karyogramm der Zelllinie AC-1M88.....	32
Abbildung 8: Genetischer Fingerabdruck der Zelllinien AC-1M32 (1), AC-1M46 (2), AC-1M59 (3), AC-1M81 (4), AC-1M88 (5), AC1-1 (6) und JEG-3 (7).....	34
Abbildung 9: Histologisches Bild eines Tumors von JEG-3 in Nacktmäusen.....	38
Abbildung 10: cDNA-Array der Zelllinie AC-1M32.....	41
Abbildung 11: cDNA-Array der Zelllinie AC-1M46.....	42
Abbildung 12: cDNA-Array der Zelllinie AC-1M59.....	42
Abbildung 13: cDNA-Array der Zelllinie AC-1M81.....	43
Abbildung 14: cDNA-Array der Zelllinie AC-1M88.....	43
Abbildung 15: cDNA-Array der Zelllinie AC1-1.....	44
Abbildung 16: cDNA-Array der Zelllinie JEG-3.....	44
Abbildung 17: Histologisches Bild eines Nacktmaustumors der Zelllinie AC-1M88 inkubiert mit dem anti-CD40L-Antikörper.....	46
Abbildung 18: Beispielhaftes Schema zur Auswertung der 2-D PAGE.....	49
Abbildung 19: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC-1M32.....	50
Abbildung 20: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC-1M46.....	51
Abbildung 21: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC-1M59.....	52
Abbildung 22: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC-1M81.....	53
Abbildung 23: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC-1M88.....	54
Abbildung 24: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC1-1.....	55
Abbildung 25: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie JEG-3.....	56
Abbildung 26: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC-1M59.....	59
Abbildung 27: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC-1M81.....	60
Abbildung 28: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC-1M88.....	61
Abbildung 29: 2-D PAGE und synthetisches Mittelwertsgel der Zelllinie AC1-1.....	62
Abbildung 30: Nachweis der Annexin III mRNA in den Zelllinien AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59, AC-1M81, AC-1M88 und AC1-1.....	65
Abbildung 31: Nachweis der Saposin D mRNA in den Zelllinien AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59, AC-1M81, AC-1M88 und AC1-1.....	67

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Programm des Netzgerätes für die Focussierung von analytischen Gelen im pH-Gradient 3-10.....	18
Tabelle 2: Programm des Netzgerätes für die Focussierung von analytischen Gelen im pH-Gradient 4-7	18
Tabelle 3: Programm des Netzgerätes für die SDS-PAGE	20
Tabelle 4: Programm des Netzgerätes für die Focussierung von präparativen Gelen im pH-Gradient 4-7.....	21
Tabelle 5: Sequenz der Primer zum Nachweis von Annexin III und ADAM19.	22
Tabelle 6: Ansatz und Zyklus für die PCR zum Nachweis von Annexin III, Saposin D und ADAM19.	22
Tabelle 7: Rezepturen der Zellkulturmedien	23
Tabelle 8: Rezepturen der Pufferlösungen, in alphabetischer Reihenfolge.	24
Tabelle 9: Zusammenfassung der zytogenetischen Analyse von AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59, AC-1M81, AC-1M88, AC1-1 und JEG-3.....	33
Tabelle 10: Zusammenfassung der Bandenverteilung des genetischen Fingerabdrucks.....	35
Tabelle 11: Zeitpunkt der Messung in Tagen (d) nach Versuchsbeginn und Größe (in cm) der gemessenen Tumoren.....	36
Tabelle 12: Zusammenfassung der Nacktmausexperimente.....	37
Tabelle 13: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die in AC1-1, aber nicht in AC-1M81, AC-1M88 oder JEG-3 exprimiert werden.....	40
Tabelle 14: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die in Zelllinien mit addXq26 (AC-1M32, AC-1M46, AC-1M59 und AC1-1), nicht aber in Zelllinien ohne das veränderte X-Chromosom (AC-1M81, AC-1M88 und JEG-3) exprimiert werden.....	40
Tabelle 15: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die in AC-1M81 und AC-1M88, aber nicht in AC-1M59 und AC1-1 exprimiert sind.	41
Tabelle 16: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die in AC-1M59 und AC1-1, aber nicht in AC-1M81 und AC-1M88 exprimiert sind.	41
Tabelle 17: Durch die cDNA-Arrays identifizierte differentiell exprimierte Gene, deren chromosomale Lokalisation und die theoretisch generierten Molekulargewichte und isoelektrische Punkte der korrespondierenden Proteine.	45
Tabelle 18: Meßwerte und Statistik der Proteinspots, die in den tumorigenen Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88, aber nicht in den nicht bzw. schwach tumorigenen Zelllinien AC-1M59 und AC1-1 exprimiert sind.	57
Tabelle 19: Meßwerte und Statistik der Proteinspots, die in den nicht bzw. schwach tumorigenen Zelllinien AC-1M59 und AC1-1, aber nicht in den tumorigenen Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88 exprimiert sind.....	58
Tabelle 20: Meßwerte und Statistik der Proteinspots, die in den tumorigenen Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88, aber nicht in den nicht bzw. schwach tumorigenen Zelllinien AC-1M59 und AC1-1 exprimiert sind.	63
Tabelle 21: Meßwerte und Statistik der Proteinspots, die in den nicht bzw. schwach tumorigenen Zelllinien AC-1M59 und AC1-1, aber nicht in den tumorigenen Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88 exprimiert sind.....	63
Tabelle 22: Im Massenspektrum gefundene Massen, die dazu korrelierenden theoretischen Massen, die Differenz zwischen den beiden, nicht geschnittene Trypsinschnittstellen (#MC), Modifikationen und Position und Sequenz der Peptide für Annexin III.	65
Tabelle 23: Im Massenspektrum gefundene Massen, die dazu korrelierenden theoretischen Massen, die Differenz zwischen den beiden, nicht geschnittene Trypsinschnittstellen (#MC), Modifikationen und Position und Sequenz der Peptide für Saposin D.....	66
Tabelle 24: Gene, die mit dem nicht bzw. schwach tumorigenen Phänotyp der Zelllinien AC-1M59 und AC1-1 korrelieren.....	68

Tabelle 25: Gene, die mit dem tumorigenen Phänotyp der Zelllinien AC-1M81 und AC-1M88 korrelieren.	69
Tabelle 26: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die in keiner der sieben Zelllinien exprimiert waren.	117
Tabelle 27: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die in allen sieben Zelllinien gleich stark exprimiert waren.	129
Tabelle 28: Genbanknummer, Name und Array-Position der 186 Gene, die als differentiell exprimierte Gene weiter untersucht wurden.	132
Tabelle 29: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die nicht auswertbar waren.	138
Tabelle 30: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die von extravillösem Trophoblast in die Fusion eingebracht worden sind (AC1-1 und JEG-3=0; Mindestens ein Hybrid>0).	139
Tabelle 31: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die in allen fünf Hybriden, aber nicht in AC1-1 oder JEG-3 exprimiert werden.	142
Tabelle 32: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die durch die Fusion in die Zelllinien eingebracht worden sind (mindesten ein Hybrid>0, AC1-1=0).	142
Tabelle 33: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die in allen Hybriden, aber nicht in AC1-1 exprimiert werden.	147

9. Abkürzungen

'	: Minuten
µg	: Mikrogramm
µl	: Mikroliter
AA	: Acrylamid
AC1-1	: HGPRT negative Mutante von JEG-3
AMV	: Avian Myeloblastosis Virus
AMV RT	: Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transkriptase
APS	: Ammoniumpersulfat
Bp	: Basenpaar
BPB	: Bromphenolblau
BSA	: bovines Serumalbumin
CHAPS	: (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
dest.	: destilliert
DNA	: Desoxyribonukleinsäure
dNTP	: Desoxynukleositriphosphat
DTT	: Dithiothreitol
ECM	: extrazelluläre Matrix
EDTA	: Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	: foetales Kälberserum
g	: Gravitationskonstante
HBSS	: Hanks balanced salts
HEPES	: N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HGPRT	: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IEF	: isoelektrische Focussierung
IEP	: isoelektrischer Punkt
Ig	: Immunglobulin
IPG	: immobilisierter pH-Gradient
M	: Molar
ml	: Milliliter
mM	: Millimolar
MM	: Minimalmedium
MMP	: Matrixmetalloproteinase
nm	: Nanometer
PAGE	: Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	: Phosphat gepufferte Saline

PCR	: Polymerasekettenreaktion
PEG	: Polyethylenglycol
PIC	: Proteaseinhibitor Cocktail
RNA	: Ribonukleinsäure
rpm	: Umdrehungen pro Minute
RT	: Raumtemperatur
s	: Sekunden
SDS	: Sodiumdodecylsulfat
TEMED	: N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TIMP	: Gewebeinhibitor von Metalloproteinasen
TNF	: Tumornekrosefaktor
Tris	: Trishydroxymethylaminomethan
u	: Units
v/v	: Volumenprozent
w/v	: Gewichtsprozent

10.Anhang

Tabelle 26: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die in keiner der sieben Zelllinien exprimiert waren.

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
X05360	cell division control protein 2 homolog (EC2.7.1.-) (P34 protein kinase) (Cyclin-dependent kinase 1) (CDK1)	A1a	0	0	0	0	0	0	0
X66357	cell division protein kinase 3 (EC2.7.1.-)	A1c	0	0	0	0	0	0	0
X66365	cell division protein kinase 6 (EC2.7.1.-) (kinase plstire)	A1f	0	0	0	0	0	0	0
L20320	cell division protein kinase 7 (EC2.7.1.-) (CDK-activating kinase) (CAK) (39 KD protein kinase) (P39 MO15) (STK1) (CAK1)	A1g	0	0	0	0	0	0	0
U34051	cyclin-dependent kinase 5 activator isoform P39I precursor (CDK5 activator) (P39I)	A1h	0	0	0	0	0	0	0
X80343	cyclin-dependent kinase 5 activator precursor (CDK5 activator) (TAU protein kinase II 23 KD subunit) (TPKII regulatory subunit) (P23) (P25) (P35)	A1i	0	0	0	0	0	0	0
L29222	CLK-1	A1m	0	0	0	0	0	0	0
X66358	serine/threonine-protein kinase kkiadre	A2b	0	0	0	0	0	0	0
X66362	serine/threonine-protein kinase pctaie-3	A2e	0	0	0	0	0	0	0
M80629	CDC2-related protein kinase ched	A2g	0	0	0	0	0	0	0
D13639	Cyclin D2	A2m	0	0	0	0	0	0	0
U47414	Cyclin G2	A3c	0	0	0	0	0	0	0
U11791	Cyclin H	A3d	0	0	0	0	0	0	0
U17075	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B (P14-INK4B) (P15-INK4B) (multiple tumor suppressor 2) (MTS2) (CDKN2B)	A3h	0	0	0	0	0	0	0
U40343	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor D (P19-INK4D)	A3i	0	0	0	0	0	0	0
S72008	CDC10 protein homolog	A3n	0	0	0	0	0	0	0
U18291	CDC16HS	A4c	0	0	0	0	0	0	0
U77949	CDC6-related protein	A4e	0	0	0	0	0	0	0
X80692	Extracellular signal-regulated kinase 3 (EC 2.7.1.-) (ERK3) (MAP kinase isoform P97) (P97-MAPK)	A4g	0	0	0	0	0	0	0
X59727	extracellular signal-regulated kinase 4 (EC 2.7.1.-) (ERK4) (MAP kinase isoform P63) (P63-MAPK)	A4h	0	0	0	0	0	0	0
L26318	stress-activated protein kinase JNK1 (EC 2.7.1.-) (C-JUN N-terminal kinase 1) (JNK-46)	A4l	0	0	0	0	0	0	0
U34819	stress-activated protein kinase JNK3 (EC 2.7.1.-) (C-JUN N-terminal kinase 3) (JNK3) (MAP kinase P49 3F12)	A4n	0	0	0	0	0	0	0
U78876	MEK kinase 3	A5d	0	0	0	0	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
M96577	RBP1 (retinoblastoma-binding protein)	A5g	0	0	0	0	0	0	0
U15642	E2F-5	A5j	0	0	0	0	0	0	0
L13698	Growth-arrest-specific protein 1 (GAS-1)	A5n	0	0	0	0	0	0	0
U23435	Abi interactor 2 (Abi-2) + Ab1 binding protein 3 (AbiBP3) [ArgBPIB]	A6b	0	0	0	0	0	0	0
M29039	Jun B transactivator	A6g	0	0	0	0	0	0	0
D78367	keratin, type I cytoskeletal 12 (cytokeratin 12) (K12)	A6i	0	0	0	0	0	0	0
X52426									
X07696	keratin, type I cytoskeletal 13 (cytokeratin 13) (K13) (CK13) & keratin, type I cytoskeletal 15 (cytokeratin 15) (K15) (CK15) & keratin, type I cytoskeletal 17 (cytokeratin 17) (K17) (CK17) (39.1)	A6m	0	0	0	0	0	0	0
X62571									
J00124	keratin, type 1 cytoskeletal 14 (cytokeratin 14) (K14) (CK14)	A6n	0	0	0	0	0	0	0
M99061	keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal (cytokeratin 2E) (K2E) (CK2E)	A7f	0	0	0	0	0	0	0
X67683	keratin, type II cytoskeletal 4 (cytokeratin 4) (K4) (CK4)	A7g	0	0	0	0	0	0	0
J00269									
V01516									
L42592									
L00205									
L42601									
L42610									
L42611	keratin, type II cytoskeletal 6 & (CK6A) (K6A keratin) & (CK6B) (K6B keratin) & (K6C keratin) & (CK6D) (K6D keratin) & (CK6E) (K6E keratin) & (CK6F) (K6F keratin)	A7i	0	0	0	0	0	0	0
L42612									
L42592									
L00205	keratin, type II cytoskeletal 6B (cytokeratin 6B) (CK6B) (K6B keratin)	A7j	0	0	0	0	0	0	0
X56134	vimentin	A7m	0	0	0	0	0	0	0
U59167	desmin	A7n	0	0	0	0	0	0	0
M14745	BCL2	B1a	0	0	0	0	0	0	0
U58334	Bc12 and p53 binding protein Bbp/53BP2 (BBP/53BP2)	B1b	0	0	0	0	0	0	0
X89986	BCL-2 interacting killer (apoptosis inducer NBK) (BP4) (BIP1) (BIK)	B1g	0	0	0	0	0	0	0
Y10256	serine/threonine protein kinase, NIK; binds specifically to TRAF2	B1k	0	0	0	0	0	0	0
AF010127	Casper, a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis [CASH--alpha+ CASH-beta] (FLAME-1) (FLICE-like inhibitory protein)	B1l	0	0	0	0	0	0	0
U84388	death domain containing protein CRADD, apoptotic adaptor molecule for caspase-2 and Fasl/TNF receptor-interacting protein RIP	B1m	0	0	0	0	0	0	0
U25994	cell death protein kinase RIP	B2a	0	0	0	0	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
U59863									
U63830	TRAF-interacting protein 1-TRAF & (TRAF family member-associated NF-kB activator TANK)	B2d	0	0	0	0	0	0	0
U69108	TRAF5	B2e	0	0	0	0	0	0	0
U78798	TRAF6	B2f	0	0	0	0	0	0	0
U12597	tumor necrosis factor type 2 receptor associated protein (TRAP3)	B2h	0	0	0	0	0	0	0
U21092	CD40 receptor associated factor 1 (CRAF1)(CAP-1)(LLMP1 associated protein)	B2i	0	0	0	0	0	0	0
U45878	inhibitor of apoptosis protein 1 (IAP1)(HIAP-1)(C-IAP2)(TNFR2-TRAF signalling complex protein 1)(IAP homolog C)(IAP1)(MIHC)	B2j	0	0	0	0	0	0	0
U45879	inhibitor of apoptosis protein 2 (IAP2)(HIAP-2)(C-IAP1)(TNFR2-TRAF signalling complex protein 2)(IAP homolog B)(IAP2)(MIHB)	B2k	0	0	0	0	0	0	0
U45880	X-linked inhibitor of apoptosis protein (X-linked IAP)(IAP-like protein)(HILP)	B2l	0	0	0	0	0	0	0
U90875	cytotoxic ligand TRAIL receptor	B2n	0	0	0	0	0	0	0
U13699	(ICE)(interleukin-1 beta converting enzyme)(P45)(caspase-1)	B3a	0	0	0	0	0	0	0
U13737	apoptain precursor (EC3.4.22.-)(cysteine protease CPP32)(yama protein)(caspase-3)(CPP32)(yama protein) caspase-3, isoform alpha	B3c	0	0	0	0	0	0	0
U20537									
U20536	caspase-6 precursor (EC3.4.22.-)(apoptotic protease MCH-2), isoforms beta & alpha	B3e	0	0	0	0	0	0	0
U37448	caspase-7 precursor (EC3.4.22.-)(ICE-like apoptotic protease 3)(ICE--LAP3)(apoptotic protease MCH-3)(CMH-1)(Lice2)	B3f	0	0	0	0	0	0	0
U60520									
U58143									
X98172									
X98173	caspase-8 precursor (EC3.4.22.-)(ICE-like apoptotic protease 5)(morr1-associated CED-3 homolog)(MACH)(FADD-homologous ICE/CED-3-like protease)(FADD-like ICE)(FLICE)(apoptotic cysteine protease)(apoptotic protease MCH-5)(CAP4)(CASP8)(MCH5), ...								
X98174									
AF00962		B3g	0	0	0	0	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3	
U60520	caspase-8 precursor (EC3.4.22.-) (ICE-like apoptotic protease 5) (MORT1-associated CED-3 homolog) (MACH) (FADD-homologous ICE/CED-3-like protease) (FADD-like ICE) (FLICE) (apoptotic cysteine protease)(apoptotic protease MCH-5) (CAP4) (CASP8) (MCH5)	B3h	0	0	0	0	0	0	0	
U56930		caspase-9 precursor (EC3.4.22.-) (ICE-like apoptotic protease 6) (ICE-LAP6) (apoptotic protease MCH-6)	B3i	0	0	0	0	0	0	0
U60519		ICE-like apoptotic protease 4 precursor (EC3.4.22.-) (apoptotic protease MCH-4) (caspase-10)	B3j	0	0	0	0	0	0	0
Z70519		FAS/APO 1	B4a	0	0	0	0	0	0	0
D38122		FAS antigen ligand (apoptosis antigen ligand) (APTL) (FASL)	B4b	0	0	0	0	0	0	0
Y09392		WSL-LR, WSL-S1, WSL-S2 + TRAMP (Apo-3) (DDR3)	B4c	0	0	0	0	0	0	0
AF012268		death receptor 5 (DR5)	B4g	0	0	0	0	0	0	0
S82185		BRAG-1=brain-related apoptosis gene/Bcl1-2 homolog	B4h	0	0	0	0	0	0	0
U63295		seven in absentia homolog	B4i	0	0	0	0	0	0	0
U37688		RATS1	B4j	0	0	0	0	0	0	0
AF017986		secreted apoptosis related protein 1	B4l	0	0	0	0	0	0	0
AF022385		apoptosis-related protein TFAR15 (TFAR15)	B4n	0	0	0	0	0	0	0
U56976		calmodulin dependent phosphodiesterase PDE1B1	B5a	0	0	0	0	0	0	0
AF010310		p53 induced protein	B5f	0	0	0	0	0	0	0
AF010311			B5i	0	0	0	0	0	0	0
AF010314	Pig10 (PIG10)		B5j	0	0	0	0	0	0	
AF010315	Pig11(PIG11)		B6a	0	0	0	0	0	0	
K00650	C-fos		B6d	0	0	0	0	0	0	0
M19722	proto-oncogene tyrosine-protein kinase FGR (EC 2.7.1.112) (P55-FGR) (C-FGR)	B6e	0	0	0	0	0	0	0	
U04045	DNA mismatch repair protein MSH2	B6f	0	0	0	0	0	0	0	
U54777	DNA mismatch repair protein MSH6 (mutS-alpha 160 KD subunit) (G/T mismatch binding protein) (GTBP) (GTMBP) (P160)	B6g	0	0	0	0	0	0	0	
M54968	K-RAS, oncogene	B6i	0	0	0	0	0	0	0	
M14694	p53									

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
U43746	breast cancer type 2 susceptibility protein	B6j	0	0	0	0	0	0	0
U76638	BRCA1-associated ring domain protein	B6k	0	0	0	0	0	0	0
Z12020	MDM2 protein (P53-associated protein) + MDM2-A (GB: U33199) + MDM2-C (GB: U33210)	B6l	0	0	0	0	0	0	0
AF007111	MDM2-like p53-binding protein (MDMX)	B6m	0	0	0	0	0	0	0
Y11416	p73, a monoallelically expressed p53-related protein	B6n	0	0	0	0	0	0	0
X74594	RB2/p130	B7a	0	0	0	0	0	0	0
S66431	RBP2 retinoblastoma binding protein	B7c	0	0	0	0	0	0	0
M31213	proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor RET precursor (EC 2.7.1.112) (C-RET). [papillary thyroid carcinoma-associated protein]	B7e	0	0	0	0	0	0	0
M15400	retinoblastoma susceptibility (RB1 retinoblastoma-assoc)	B7f	0	0	0	0	0	0	0
U10087	tyrosine-protein kinase BTK (EC 2.7.1.112) (Brutons tyrosine kinase) (agammaglobulinaemia tyrosine kinase) (ATK) (B cell progenitor kinase) (BPK) (BTK) (AGMX1)	B7i	0	0	0	0	0	0	0
X58957	tyrosine-protein kinase ZAP-70 (EC 2.7.1.112) (70 KD zeta-associated protein) (ZAP70)	B7k	0	0	0	0	0	0	0
L05148	signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta (transcription factor ISGF-3 components P91/P84) (STAT1)	B7l	0	0	0	0	0	0	0
M97935	DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) & DNA dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) (XRCC7)	C1a	0	0	0	0	0	0	0
U35835	Ataxia telangiectasia (ATM)	C1b	0	0	0	0	0	0	0
U33841	FKBP-rapamycin associated protein (FRAP)	C1c	0	0	0	0	0	0	0
L34075	ATP-dependent DNA helicase II, 86 KD subunit (lupus KU autoantigen protein P86) (86 KD subunit of KU antigen) (thyroid-lupus autoantigen) (TLAA) (CTC box binding factor 85 KD subunit) (CTCBF) (CTC85) (nu7clear factor IV) (KU80) (XRCC5)	C1e	0	0	0	0	0	0	0
M30938	DNA ligase III (polydeoxyribonucleotide synthase (ATP)) (DNL3)	C1g	0	0	0	0	0	0	0
X84740	DNA ligase IV (polydeoxyribonucleotide synthase (ATP)) (DNL4)	C1h	0	0	0	0	0	0	0
X83441	DNA polymerase alpha	C1i	0	0	0	0	0	0	0
X06745	DNA repair protein RAD50	C1j	0	0	0	0	0	0	0
U63139	DNA repair protein RAD52 homolog	C1l	0	0	0	0	0	0	0
U12134	DNA topoisomerase I	C1m	0	0	0	0	0	0	0
J03250	DNA topoisomerase II alpha isozyme	C1n	0	0	0	0	0	0	0
J04088	DNA-repair protein complementing XP-G cells (xeroderma pigmentosum group G complementing protein) (DNA excision repair protein ERCC-5)	C2d	0	0	0	0	0	0	0
L20046	RAD	C2j	0	0	0	0	0	0	0
L24564	activator 1 38 KD subunit (replication factor C 38 KD subunit) (RFC38)	C2m	0	0	0	0	0	0	0
L07541	transcriptional activator protein PUR-alpha	C3c	0	0	0	0	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
AF028593	Jagged 1	C3j	0	0	0	0	0	0	0
AF003521	Jagged 2	C3k	0	0	0	0	0	0	0
U15979	Delta-like protein precursor (contains: fetal antigen 1) (FA1) (DLK) & adrenal specific 30 kDa protein	C3l	0	0	0	0	0	0	0
U94352	manic fringe	C3m	0	0	0	0	0	0	0
U94354	lunatic fringe	C3n	0	0	0	0	0	0	0
X07876	WNT2 OR IRP	C4a	0	0	0	0	0	0	0
L20861	Wnnt-5a	C4b	0	0	0	0	0	0	0
X91940	WNT-8B	C4c	0	0	0	0	0	0	0
X97057	WNT-10B	C4d	0	0	0	0	0	0	0
Z71621	Wnt-13	C4e	0	0	0	0	0	0	0
U24163	frizzled-related FrzB (Fritz) (frezzled (fre))	C4g	0	0	0	0	0	0	0
U82169	frizzled homolog (FZD3)	C4i	0	0	0	0	0	0	0
L38518	sonic hedgehog (SHH)	C4l	0	0	0	0	0	0	0
U43148	patched homolog (PTC)	C4m	0	0	0	0	0	0	0
Z29083	5T4 oncofetal antigen	C5a	0	0	0	0	0	0	0
M76125	AXL (tyrosine-protein kinase receptor UFO)	C5b	0	0	0	0	0	0	0
X60592	CDW40; nerve growth factor receptor-related B-lymphocyte activation molecule	C5d	0	0	0	0	0	0	0
U07707	EPS 15 (AF-1P protein)	C5f	0	0	0	0	0	0	0
U12535	EPS8	C5g	0	0	0	0	0	0	0
L07868	ERBB4	C5h	0	0	0	0	0	0	0
D14012	HGF activator	C5n	0	0	0	0	0	0	0
D49742	HGF activator like	C6a	0	0	0	0	0	0	0
D25216	IGFBP complex acid labile chain	C6b	0	0	0	0	0	0	0
M35410	IGFBP2	C6c	0	0	0	0	0	0	0
M31159	IGFBP3 (growth hormone-dependent insulin-like growth factor-binding protein)	C6d	0	0	0	0	0	0	0
M62403	IGFBP4	C6e	0	0	0	0	0	0	0
M65062	IGFBP5	C6f	0	0	0	0	0	0	0
M62402	IGFBP6	C6g	0	0	0	0	0	0	0
X04434	insulin-like growth factor I receptor	C6h	0	0	0	0	0	0	0
M21574	PDGFR-alpha	C6k	0	0	0	0	0	0	0
M21616	PDGFR-beta	C6l	0	0	0	0	0	0	0
U12140	trk-B	C7e	0	0	0	0	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
U05012	trk-C	C7f	0	0	0	0	0	0	0
X07282	retinoic acid receptor epsilon [retinoic acid receptor beta-2 (RAR-beta-2) (RAR-epsilon)]	C7k	0	0	0	0	0	0	0
U68162	thrombopoietin receptor	C7n	0	0	0	0	0	0	0
M55172	cartilage-specific proteoglycan core protein (CSPCP) (aggrecan 1) (chondroitin sulfate proteoglycan core protein 1)	D1a	0	0	0	0	0	0	0
J04599	byglycan	D1b	0	0	0	0	0	0	0
M81104	CD34	D1c	0	0	0	0	0	0	0
M14219	chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan core protein (decorin) (PG-S2) (PG40)	D1e	0	0	0	0	0	0	0
D21337	collagen	D1f	0	0	0	0	0	0	0
X55525	collagen type I	D1g	0	0	0	0	0	0	0
X16468	collagen type II alpha-1	D1h	0	0	0	0	0	0	0
X14420	collagen type III pro-alpha-1	D1i	0	0	0	0	0	0	0
M92993	collagen type IV alpha-3	D1k	0	0	0	0	0	0	0
X15879	collagen type VI alpha-1	D1l	0	0	0	0	0	0	0
M34570	collagen type VI alpha-2	D1m	0	0	0	0	0	0	0
X52022	collagen type VI alpha-3	D1n	0	0	0	0	0	0	0
X57527	collagen type VIII alpha-1	D2a	0	0	0	0	0	0	0
J04177	collagen type XI alpha-1	D2b	0	0	0	0	0	0	0
U32169	collagen type XI pro-alpha-2	D2c	0	0	0	0	0	0	0
M92642	collagen type XVI alpha-1	D2d	0	0	0	0	0	0	0
L22548	collagen type XVIII alpha	D2e	0	0	0	0	0	0	0
S77512	LAMB2 (LAMININ)	D2g	0	0	0	0	0	0	0
X78565	tenascin-C	D2m	0	0	0	0	0	0	0
X98085	tenascin-R	D2n	0	0	0	0	0	0	0
U16306	versican, isoforms V1, V2 & V3	D3a	0	0	0	0	0	0	0
U12431	RNA-binding protein HeI-N2; ELAV-like neuronal protein 1	D3g	0	0	0	0	0	0	0
X68742	integrin alpha	D3i	0	0	0	0	0	0	0
M28249	integrin alpha2 [very late antigen-2 (via-2)/collagen receptor alpha-2 subunit]	D3j	0	0	0	0	0	0	0
L12002	integrin alpha4	D3l	0	0	0	0	0	0	0
X74295	integrin alpha7B	D4a	0	0	0	0	0	0	0
L36531	integrin alpha8	D4b	0	0	0	0	0	0	0
D25303	integrin alpha9	D4c	0	0	0	0	0	0	0
L25851	integrin alphaE	D4d	0	0	0	0	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
M34189	integrin beta1	D4e	0	0	0	0	0	0	0
M35198	integrin beta6	D4i	0	0	0	0	0	0	0
M73780	integrin beta8	D4k	0	0	0	0	0	0	0
L13616	Focal adhesion kinase	D4l	0	0	0	0	0	0	0
U37139	beta 3-endonexin	D5d	0	0	0	0	0	0	0
L11353									
Z22664									
X72657									
L27133	merlin (schwannomin) (moesin-ezrin-radixin-like protein) (neurofibromatosis 2)	D5h	0	0	0	0	0	0	0
M74387	L1CAM	D5i	0	0	0	0	0	0	0
X16841	N-CAM [neural cell adhesion molecule, phosphatidylinositol-linked isoform; CD56]	D5j	0	0	0	0	0	0	0
L34774	oploid binding cell adhesion molecule	D5l	0	0	0	0	0	0	0
X76132	DCC	D5m	0	0	0	0	0	0	0
U52111	plexin	D6a	0	0	0	0	0	0	0
AB000220	semaphorin E	D6c	0	0	0	0	0	0	0
L26081	semaphorin III	D6d	0	0	0	0	0	0	0
U33920	semaphorin V	D6e	0	0	0	0	0	0	0
U38276	semaphorin-1	D6f	0	0	0	0	0	0	0
X85978	TAX1, axonin-1/TAQ1	D6g	0	0	0	0	0	0	0
M24795	platelet glycoprotein IV (GPIV) (GPIIB) (CD36 antigen) (PAS IV) (PAS-4 protein)	D6j	0	0	0	0	0	0	0
AF035752									
U32114	caveolin-2	D6k	0	0	0	0	0	0	0
U02687	FL cytokine receptor precursor (EC 2.7.1.112) (tyrosine-protein kinase receptor FLT3) (stem cell tyrosine kinase 1) (STK-1) (CD135 antigen)	D7a	0	0	0	0	0	0	0
X60957	tyrosine-protein kinase receptor TIE-1 precursor (EC 2.7.1.112)	D7b	0	0	0	0	0	0	0
L06139	tyrosine-protein kinase receptor TIE-2 precursor (EC 2.7.1.112) (tyrosine-protein kinase receptor TEK) (P140 TEK) (tunica interna endothelial cell kinase)	D7c	0	0	0	0	0	0	0
U83508	angiopoietin-1	D7h	0	0	0	0	0	0	0
M58051	FGFR3 (FLG-2)	D7j	0	0	0	0	0	0	0
U01134	vascular endothelial growth factor receptor 1 precursor (EC 2.7.1.112) (VEGFR-1) (tyrosine-protein kinase receptor FLT) (FLT-1) (SFLT)	D7m	0	0	0	0	0	0	0
D11117	homeobox protein HOX-D3 [HOX 4A]	D7n	0	0	0	0	0	0	0
X05231	MMP-1 (collagenase-1)	E1a	0	0	0	0	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
X05232	MMP-3 (stromelysin-1)	E1c	0	0	0	0	0	0	0
X07819	MMP-7 (matrilysin)	E1d	0	0	0	0	0	0	0
J05556	MMP-8 (collagenase-2)	E1e	0	0	0	0	0	0	0
X07820	MMP-10 (stromelysin-2)	E1g	0	0	0	0	0	0	0
X57766	MMP-11 (stromelysin-3)	E1h	0	0	0	0	0	0	0
L23808	MMP-12 (matrilysin)	E1i	0	0	0	0	0	0	0
Z48482	MMP-15 (MT2-MMP)	E1l	0	0	0	0	0	0	0
D50477	MMP-16 (MT3-MMP)	E1m	0	0	0	0	0	0	0
X89576	MMP-17 (MT4-MMP)	E1n	0	0	0	0	0	0	0
U76456	TIMP-4	E2e	0	0	0	0	0	0	0
X05199	plasminogen precursor (EC 3.4.21.7)	E2i	0	0	0	0	0	0	0
X04429	plasminogen activator inhibitor-1 precursor, endothelial (PAI-1)	E2j	0	0	0	0	0	0	0
M18082	plasminogen activator inhibitor-2, placental (PAI-2) (monocyte ARG-serpin) (urokinase inhibitor)E2k	E2k	0	0	0	0	0	0	0
M68516	plasma serine protease inhibitor precursor (PCI) (protein C inhibitor) (plasminogen activator inhibitor-3) (PAI3)	E2l	0	0	0	0	0	0	0
U08839	urokinase plasminogen activator surface receptor, GPI-anchored form precursor (U- PAR) (monocyte activation antigen MO3) (CD87 antigen)	E2m	0	0	0	0	0	0	0
M11313	alpha-2-macroglobulin precursor (alpha-2-M)	E3b	0	0	0	0	0	0	0
M54995	platelet basic protein precursor (PBP) (contains: connective-tissue activating peptide II (CTAP-II), low-affinity platelet factor IV (LA-PF4), beta-thromboglobulin (Beta-TG), neutrophil-activating peptide 2 (NAP-2))	E3c	0	0	0	0	0	0	0
M38441		E3h	0	0	0	0	0	0	0
U43527	malignant melanoma metastasis-suppressor (KISS-1) gene	E3j	0	0	0	0	0	0	0
M99487	prostate-specific membrane antigen (PSM)	E3k	0	0	0	0	0	0	0
U41766	metalloprotease/disintegrin/cysteine-rich protein precursor (MDC9)	E4a	0	0	0	0	0	0	0
Y07923	Rho6 protein	E4b	0	0	0	0	0	0	0
X95456	Rho7 protein	E4c	0	0	0	0	0	0	0
X95282	Rho8 protein	E4f	0	0	0	0	0	0	0
M31470	ras-like protein TC10	E4g	0	0	0	0	0	0	0
Z35227	ras-like small GTPase TIF	E4i	0	0	0	0	0	0	0
U43195	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase p160ROCK	E4n	0	0	0	0	0	0	0
X78817	RHO-GAP hematopoietic protein C1 (P115) (KIAA0131)	E5a	0	0	0	0	0	0	0
L20688	rho GDP-dissociation inhibitor protein 2 (Ly-GDI)	E5e	0	0	0	0	0	0	0
M34064	cadherin-2 (N-cadherin)	E5h	0	0	0	0	0	0	0
X79981	cadherin-5 vascular endothelial-cadherin precursor (VE-cadherin) (7B4 antigen) (CD144 antigen)		0	0	0	0	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
D31784	cadherin-6	E5i	0	0	0	0	0	0	0
L34060	cadherin-8	E5j	0	0	0	0	0	0	0
L34056	cadherin-11 (osteoblast-cadherin) (OB-cadherin)	E5k	0	0	0	0	0	0	0
L34057	cadherin-12 (BR-cadherin) (N-cadherin 2) (cadherin, neural type, 2)	E5l	0	0	0	0	0	0	0
L34058	cadherin-13 T-cadherin precursor (truncated-cadherin) (H-cadherin) (heart-cadherin)	E5m	0	0	0	0	0	0	0
D83542	cadherin-14 muscle-cadherin precursor (M-cadherin) (cadherin-14) (cadherin-15)	E5n	0	0	0	0	0	0	0
M94151	alpha-catenin related protein (catenin alpha-2)	E6b	0	0	0	0	0	0	0
L11370	protocadherin 42	E6h	0	0	0	0	0	0	0
L11373	protocadherin 43	E6i	0	0	0	0	0	0	0
U53786	envoplakin (EVPL)	E6k	0	0	0	0	0	0	0
M63618	bullous pemphigoid antigen	E6l	0	0	0	0	0	0	0
Z26317	desmoglein 2	E6m	0	0	0	0	0	0	0
X56654	desmoglein type 1	E6n	0	0	0	0	0	0	0
X72925	desmocollin type 1	E7a	0	0	0	0	0	0	0
X83929	desmocollin type 3 & desmocollin type 4	E7b	0	0	0	0	0	0	0
U09304	Ephrin-B1 precursor (EPH-related receptor tyrosine kinase ligand 2) (LERK-2) (ELK ligand precursor) (ELK-L)	E7f	0	0	0	0	0	0	0
L38734	Ephrin-B2 precursor (EPH-related receptor tyrosine kinase ligand 5) (LERK-5) (HTK ligand) (HTK-L)	E7g	0	0	0	0	0	0	0
U66406	Ephrin-B3 precursor (EPH-related receptor tyrosine kinase ligand 8) (LERK-8) (EPH-related receptor transmembrane ligand ELK-L3)	E7h	0	0	0	0	0	0	0
M59371	Ephrin type-A receptor 2 precursor (EC 2.7.1.112) (tyrosine-protein kinase receptor ECK) (epithelial cell kinase)	E7i	0	0	0	0	0	0	0
M36395									
X95425	Ephrin type-A receptor 5 precursor (EC 2.7.1.112) (tyrosine-protein kinase receptor EKH-1) (EPH homology kinase-1) (receptor protein-tyrosine kinase HEK7)E7j	E7j	0	0	0	0	0	0	0
L40636	Ephrin type-B receptor 1 precursor (EC 2.7.1.112) (tyrosine-protein kinase receptor EPH-2) (NET)	E7k	0	0	0	0	0	0	0
L41939	Ephrin type-B receptor 2 precursor (EC 2.7.1.112) (tyrosine-protein kinase receptor EPH-3) (DRT)	E7l	0	0	0	0	0	0	0
M16591	tyrosine-protein kinase HCK (EC 2.7.1.112) (P59-HCK and P60-HCK) (hemopoietic cell kinase)	E7n	0	0	0	0	0	0	0
M30704	Amphiregulin	F1a	0	0	0	0	0	0	0
M15530	BCDGF1 (B-cell growth factor)	F1b	0	0	0	0	0	0	0
M61176	BDNF	F1c	0	0	0	0	0	0	0
X52599	BETA NGF	F1d	0	0	0	0	0	0	0
M77349	BIGH3	F1f	0	0	0	0	0	0	0
M22489	bone morphogenetic protein 2A	F1h	0	0	0	0	0	0	0
M22491	bone morphogenetic protein 3	F1i	0	0	0	0	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
D49493	bone morphogenetic protein 3B	F1j	0	0	0	0	0	0	0
M60314	bone morphogenetic protein 5	F1l	0	0	0	0	0	0	0
M60315	bone morphogenetic protein 6	F1m	0	0	0	0	0	0	0
M60316	bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)	F1n	0	0	0	0	0	0	0
M97016	bone morphogenetic protein 8 (osteogenic protein 2)	F2a	0	0	0	0	0	0	0
L42379	BPGF-1	F2b	0	0	0	0	0	0	0
A26792	CNTF, isoform B and C	F2c	0	0	0	0	0	0	0
M92934	connective tissue growth factor	F2d	0	0	0	0	0	0	0
X04571	EGF (kidney)	F2e	0	0	0	0	0	0	0
M60278	EGF-like growth factor	F2f	0	0	0	0	0	0	0
M65199	endothelin 2	F2g	0	0	0	0	0	0	0
J05081	endothelin 3	F2h	0	0	0	0	0	0	0
X51943	heparin-binding growth factor 1 precursor (HBGF-1) (acidic fibroblast growth factor) (AFGF) (beta-endothelial cell growth factor) (ECGF-BETA)	F2i	0	0	0	0	0	0	0
M27968	FGF2; heparin-binding growth factor 2 precursor (prostatropin). (HBGF-2) (basic fibroblast growth factor) (BFGF) (prostatropin)	F2j	0	0	0	0	0	0	0
X14445	FGF-3; INT-2 proto-oncogene protein precursor (fibroblast growth factor-3) (HBGF-3)	F2k	0	0	0	0	0	0	0
M37825	FGF-5; fibroblast growth factor-5 precursor (HBGF-5)	F2l	0	0	0	0	0	0	0
X63454	FGF-6; fibroblast growth factor-6 precursor (HBGF-6) (HST-2)	F2m	0	0	0	0	0	0	0
M60828	FGF-7; keratinocyte growth factor precursor (KGF) (fibroblast growth factor-7) (HBGF-7)	F2n	0	0	0	0	0	0	0
U36223	FGF-8; androgen-induced growth factor precursor (AIGF) (HBGF-8) (fibroblast growth factor-8)	F3a	0	0	0	0	0	0	0
D14838	FGF-9; Glia-activating factor precursor (GAF) (fibroblast growth factor-9) (HBGF-9)	F3b	0	0	0	0	0	0	0
U66197	FHF-1	F3c	0	0	0	0	0	0	0
L19063	GDNF	F3d	0	0	0	0	0	0	0
M86492	glia maturation factor beta	F3e	0	0	0	0	0	0	0
L12260									
U02326									
M94165	recombinant glial growth factor, neu differentiation factor & heregulin	F3f	0	0	0	0	0	0	0
M19154	transforming growth factor-beta-2 (glioblastoma-derived t-cell suppressor factor)	F3g	0	0	0	0	0	0	0
M62829	early growth response protein 1 (EGR-1) (KROX24) (transcription factor ETR103) (zinc finger protein 225) (AT225)	F3j	0	0	0	0	0	0	0
M74178	hepatocyte growth factor-like (macrophage-stimulating protein (MST1))	F3k	0	0	0	0	0	0	0
U46010	HGF agonist/antagonist	F3n	0	0	0	0	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
M77227	competitive hepatocyte growth factor antagonist. an alternative transcript of the hepatocyte growth factor precursor (scatter factor) (SF) (hepatopoietin A)	F4a	0	0	0	0	0	0	0
M63099	interleukin 1 receptor antagonist	F4d	0	0	0	0	0	0	0
M20566	interleukin 6 receptor	F4e	0	0	0	0	0	0	0
X02851	interleukin IL-1 alpha	F4f	0	0	0	0	0	0	0
K02770	interleukin IL-1 beta	F4g	0	0	0	0	0	0	0
M14743	interleukin-3 precursor (IL-3) (multipotential colony-stimulating factor) (hematopoietic growth factor) (P-cell stimulating factor) (mast-cell growth factor) (MCGF) (IL3)	F4i	0	0	0	0	0	0	0
M13982	interleukin IL-4	F4j	0	0	0	0	0	0	0
X04602	interleukin-6 precursor (IL-6) (B-cell stimulatory factor 2) (BSF-2) (interferon beta-2) (hybridoma growth factor)	F4l	0	0	0	0	0	0	0
X17543	interleukin IL-9 (P40)	F4n	0	0	0	0	0	0	0
M57627	interleukin 10	F5a	0	0	0	0	0	0	0
M57765	interleukin 11 [adipogenesis inhibitory factor]	F5b	0	0	0	0	0	0	0
M65291	interleukin 12 (NKSF, P35)	F5c	0	0	0	0	0	0	0
M65290	interleukin 12 (NKSF, P40)	F5d	0	0	0	0	0	0	0
L06801	interleukin IL-13	F5e	0	0	0	0	0	0	0
L15344	interleukin IL-14	F5f	0	0	0	0	0	0	0
J00209	leukocyte interferon alpha	F5i	0	0	0	0	0	0	0
X01992	leukocyte interferon gamma	F5k	0	0	0	0	0	0	0
A03911	neurite promoting factor (NEXIN), glia derived	F6a	0	0	0	0	0	0	0
X53655	NT-3 (neurotrophin-3 precursor) (neurotrophic factor) (HDNF) (nerve growth factor 2) (NGF-2)	F6b	0	0	0	0	0	0	0
M86528									
S41541	NT-4 (NT-5) & NT-6	F6c	0	0	0	0	0	0	0
X02811	platelet-derived growth factor, B chain precursor (PDGF B-chain) (PDGF-2) (bacaplermin) (C-SIS)	F6f	0	0	0	0	0	0	0
L36034	SDF1A (pre-B cell stimulating factor homologue)	F6g	0	0	0	0	0	0	0
U16752	SDF1B	F6h	0	0	0	0	0	0	0
M59964	stem cell factor (C-kit ligand)	F6i	0	0	0	0	0	0	0
M21626	T cell receptor variable region	F6j	0	0	0	0	0	0	0
L17075	TGF-b superfamily receptor type I (ALK-1) (SRK3)	F6l	0	0	0	0	0	0	0
L36052	thrombopoietin precursor (megakaryocyte colony stimulating factor) (C-MPL ligand) (ML)	F6n	0	0	0	0	0	0	0
K03222	(megakaryocyte growth and development factor) (MGDF) (THPO)	F7a	0	0	0	0	0	0	0
L08096	transforming growth factor-alpha CD27 (CD70 antigen)	F7c	0	0	0	0	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
L09753	CD30	F7d	0	0	0	0	0	0	0
M91196	interferon consensus sequence binding protein [DNA-binding protein]	F7h	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 27: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die in allen sieben Zelllinien gleich stark exprimiert waren.

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
X66364	cell division protein kinase 5 (EC2.7.1.-) (tau protein kinase II catalytic subunit) (TPKII catalytic subunit) (kinase pssalre)	A1e	0,824	0,886	0,734	0,844	0,774	0,538	0,853
X66363	serine/threonine-protein kinase pctaire-1	A2c	1,585	1,517	1,377	0,923	1,169	1,175	1,198
M73812	Cycline E	A3a	2,014	1,684	1,759	0,852	1,366	1,159	0,994
U09479	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (melanoma differentiation associated protein 6) (MDA-6) (P21) (CDK-interacting protein 1) (CIP1) (WAF1) (CDKN1A) (CDKN1) (SDI1) (PIC1) (CAP20)	A3e	1,883	1,316	2,516	1,32	1,573	1,043	1,054
U01038	serine/threonine-protein kinase PLK (EC2.7.1.-) (PLK-1) (STPK13)	A3k	1,068	1,106	1,158	1,006	1,186	0,702	0,964
L22005	ubiquitin-conjugating enzyme E2-CDC34	A4b	0,994	1,157	1,303	1,027	1,539	0,78	0,881
U63131	CDC37 homolog	A4d	0,845	1,003	0,698	0,85	0,968	0,55	0,682
X60188	extracellular signal-regulated kinase 1 (EC2.7.1.-) (ERK1) (insulin-stimulated MAP2 kinase) (MAP kinase 1) (MAPK 1) (P44-ERK1) (ERT2) (P44-MAPK) (microtubule-associated protein-2 kinase)	A4f	1,243	1,093	1,159	0,782	1,386	1,024	0,999
S57153	PIN1	A5f	1,477	1,091	1,239	0,995	1,511	1,039	0,735
L29511	growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2 adaptor protein) (ASH protein)	A6c	1,81	2,008	1,468	0,941	1,22	1,18	1,597
M13228	N-myc	A6h	1,652	1,804	1,782	1,051	1,903	1,309	1,444
D89667	C-myc binding proteintd valign=top	A6i	3,15	1,965	3,98	1,669	2,324	1,908	2,286
M26326	keratine, type I cytoskeletal 18 (cytokeratin 18) (K18) (CK18)	A7b	3,494	2,656	4,371	2,729	3,743	2,308	3,215
X03212	keratin, type II cytoskeletal 7 (cytokeratin 7) (K7) (CK7)	A7k	1,608	0,984	1,268	1,212	1,079	1,478	0,999
M34225	keratin, type II cytoskeletal 8 (cytokeratin 8) (K8) (CK8)	A7l	1,315	1,197	2,163	1,352	2,141	2,035	1,313
L22474	BAX	B1c	1,299	1,059	1,478	0,832	1,201	1,296	0,978
L41690	TNF receptor-1 associated protein (TRADD)	B1n	1,056	0,612	0,881	1,077	1,097	0,544	0,657
X76104	death-associated protein kinase 1 (EC2.7.1.-) (DAP kinase 1)	B3l	0,755	0,724	0,655	0,479	0,456	0,466	0,62
X86779	Fas-activated serine/threonine kinase (FAS) phosphorylates TIA-1	B3m	1,225	0,557	0,779	0,745	0,772	0,557	0,69
S78085	PDCD2	B3n	1,101	0,909	0,926	1,145	1,172	0,958	0,834
M63167	AKT1 (rac protein kinase alpha, protein kinase B, c-Akt)	B4d	1,101	1,2	1,173	0,968	1,295	0,941	0,981
M77198	AKT2 (rac protein kinase beta)	B4e	0,591	0,553	0,774	0,764	0,886	0,741	0,763
U91985	DNA fragmentation factor-45	B4k	1,147	0,829	1,106	0,532	0,673	0,928	0,602
U82938	CD27BP (Siva)	B5c	1,308	1,156	1,351	0,816	0,88	1,246	1,022

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
U75285	apoptosis inhibitor survivin	B5e	0,625	0,933	0,816	0,546	0,648	0,733	0,675
AF010316	Pig12 (PIG12)	B5k	1,983	1,263	1,668	1,015	0,856	1,537	1,294
L25080	GTP-binding protein (rhoA)	B5l	3,431	2,628	3,743	3,115	3,282	2,03	2,527
M35543	cdc42 homolog (G25K) [brain isoform + placental isoform]	B5m	0,621	1,119	1,061	0,672	1,053	0,784	0,806
X03663	C-FMS proto oncogene	B5n	1,004	0,838	0,995	0,652	1,049	1,073	1,018
X06182	C-kit	B6b	0,878	0,753	0,876	0,93	1,318	0,876	0,787
D17517	SKY (DTK) (TYRO3) (RSE)	B7g	2,77	1,847	2,385	1,251	1,355	1,52	1,929
M32865	ATP-dependent DNA helicase II, 70 KD subunit (lupus KU autoantigen protein P70) (70 KD subunit of KU antigen) (thyroid-lupus auto-antigen) (TLAA) (KU70) (CTC box binding factor 75 KD subunit) (CTCBF) (CTC75) (XRCC6)	C1d	1,179	0,745	1,163	1,001	1,151	1,053	1,038
M13194	DNA excision repair protein ERCC1	C1f	1,368	0,777	1,192	1,35	1,224	0,852	1,286
S40706	growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD153 (DNA-damage inducible protein) (CHOP)	C2e	1,929	1,356	1,955	1,003	1,002	1,058	1,564
M60974	growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD45 (DNA-damage inducible transcript 1) (DDIT1) C2f		1,713	1,119	1,127	1,052	1,014	0,784	0,91
M29971	methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase (6-O-methylguanine-DNA methyltransferase) (MGMT)	C2g	1,343	0,73	1,037	0,921	0,682	1,073	1,218
HT13218	superoxide dismutase [Superoxide dismutase 1 (Cu/Zn)]	C3b	2,498	2,209	1,939	1,785	1,819	1,28	1,606
D21235	UV excision repair protein protein RAD23 [xeroderma pigmentosum group C repair complementing protein HHR23A]	C3e	0,859	1,152	1,491	0,821	1,349	1,219	1,179
M73980	Notch1	C3f	1,369	1,12	1,568	1,302	1,153	1,16	1,145
U49262	dishevelled (DVL) & dishevelled 3 (DVL3)	C4j	1,118	0,899	1,313	0,894	1,299	0,995	0,976
U46461	dishevelled homolog (DVL)	C4k	1,25	0,858	1,317	0,91	0,529	0,782	0,912
X65923	FAU	C5j	4,816	2,496	5,052	3,707	3,997	3,063	3,957
M29366	HER3 (ERB-B3)	C5m	1,001	0,912	1,155	0,922	0,709	0,84	0,979
X03541	high affinity nerve growth factor receptor precursor (EC 2.7.1.112) (TRK1 transforming tyrosine kinase protein) (P140-TRKA) & trk-T3 (P68 TRK-T3 oncoprotein)	C7c	0,611	1,07	1,002	1,067	0,962	0,798	1,05
X85960	trk-T3 (P68 TRK-T3 oncoprotein)	C7d	0,852	1,27	1,037	0,907	1,023	0,951	1,627
M34671	CD59	D1d	1,182	0,893	1,093	1,115	0,929	0,955	0,821
J03202	laminin B2	D2i	0,845	0,84	1,066	1,07	0,848	0,664	0,966
X06256	integrin alpha5 [fibronectin receptor alpha subunit]	D3m	1,612	1,567	2,402	1,956	2,262	1,199	1,231
X53587	integrin beta4	D4g	1,874	1,286	1,844	1,772	1,83	1,508	1,413
U14588	Paxillin	D5a	2,449	1,842	3,035	1,97	2,718	1,687	1,687
AF000974	Zyxin related protein ZRP-1	D5c	3,317	2,315	3,894	2,972	3,237	2,025	1,948

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
U59752	cytohesin-1; Sec7p-like protein	D5e	1,003	0,771	1,095	1,073	1,021	0,86	0,688
M38690	CD9	D5f	1,399	1,351	1,339	0,861	0,849	0,959	0,774
X51521	Ezrin (cytovillin 2)	D5g	1,063	0,759	1,192	1,045	1,235	0,933	0,914
U72661	ninjurin-1	D5k	2,437	2,083	3,079	2,154	2,941	2,059	1,683
Z18951	caveolin-1	D6l	0,77	1,277	1,001	0,802	0,661	1,133	1,004
S49856	placenta growth factors 1 and 2 precursor (PLGF-1 / PLGF-2)	D7f	3,345	2,723	3,107	1,568	2,065	2,876	1,859
X54936	cysteine-rich fibroblast growth factor receptor [Golgi membrane sialoglycoprotein MG160 (GLG1)]	D7i	0,96	0,936	1,218	1,149	1,134	0,907	0,678
U28811	MMP-14 (MT1-MMP)	E1k	2,636	2,255	3,136	2,31	2,689	2,38	1,766
D26512	MMP-19	E2a	1,099	0,743	0,841	1,273	1,183	0,765	0,765
X92521	TIMP-2 (MI)	E2c	0,834	0,632	0,853	1,079	1,283	0,609	0,581
J055	extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMIPRIN	E2f	2,75	2,723	4,481	2,226	2,228	3,227	2,544
L20471	nucleoside diphosphate kinase A (EC 2.7.4.6) (NDK A) (NDP kinase A) (tumor metastatic process-associated protein) (metastasis inhibition factor NM23) (NM23-H1)	E3e	1,35	0,956	1,776	1,748	1,941	1,275	1,089
X17620	nucleoside diphosphate kinase B (EC 2.7.4.6) (NDK B) (NDP kinaseB) (NM23-H2) (C-MYC purine-binding transcription factor PUF)	E3f	4,464	3,484	4,609	3,788	2,528	3,173	3,039
L16785	metastasis-associated MTA1	E3i	0,841	1,033	1,127	0,845	0,979	0,834	0,881
U35113	rhoC (H9); small GTPase (rhoC)	E3m	0,795	0,592	0,953	0,905	0,744	0,737	0,666
L25081	RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1 (P21-RAC1) (RAS-like protein TC25)	E4d	2,025	1,789	2,514	1,317	1,691	1,58	1,347
M29870	rhoHP1	E4h	1,499	0,932	1,297	0,865	0,624	1,47	0,833
D85815	CDC42 GTPase-activating protein	E4j	0,73	0,49	1,071	0,69	0,704	0,863	0,649
U02570	rho GDP-dissociation inhibitor 1	E5b	1,978	1,55	2,014	1,216	1,388	1,613	1,495
X69550	serine/threonine-protein kinase PAK-alpha (EC 2.7.1.-) (P65-PAK) (P21-activated kinase) (alpha-PAK)	E5c	0,57	0,645	0,821	0,754	0,88	0,682	0,525
U24152	alpha-catenin (cadherin-associated protein) (alpha E-catenin)	E6a	1,543	1,589	1,189	1,112	1,527	1,423	1,08
D13866	plakoglobin (desmoplakin III)	E6d	1,315	1,264	1,628	1,155	1,565	1,521	1,253
M23410	EB1, a protein that binds to APC	E6g	1,066	1,401	1,304	1,012	1,077	0,848	0,972
U24166	Ephrin type-B receptor 4 precursor (EC 2.7.1.112) (tyrosine-protein kinase receptor (HTK))	E7m	0,958	0,812	1,72	1,548	1,502	1,509	1,191
U07695	vascular endothelial growth factor precursor (VEGF) (vascular permeability factor) (VPF)	F1e	1,324	0,845	1,172	1,482	1,19	0,997	0,941
M32977	heptoma-derived growth factor	F3l	1,179	0,816	1,331	1,17	0,773	1,141	1,251
D16431	PDGF assoc. protein	F6d	1,605	1,294	1,439	0,754	0,801	1,031	1,171
U41745	platelet-derived growth factor a chain	F6e	1,356	1,232	1,812	1,535	1,6	1,134	1,239

Tabelle 28: Genbanknummer, Name und Array-Position der 186 Gene, die als differentiell exprimierte Gene weiter untersucht wurden.

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
M68520	cell division protein kinase 2 (EC2.7.1.-) (P33 protein kinase)	A1b	0	0	0	0	0,742	0	0
M14505	cell division protein kinase 4 (EC2.7.1.-) (PSK-J3)	A1d	1,949	1,513	2,187	1,031	2,743	1,358	1,637
M81933	cdc25A; M-phase inducer phosphatase 1 (EC 3.1.3.48)	A1j	0	0	0,733	0	1,102	0,516	0
M81934	cdc25B; M-phase inducer phosphatase 2 (EC 3.1.3.48) (CDC25Hu2)	A1k	1,502	0,824	0,957	0,582	0,836	0,492	0,789
M34065	cdc25C; M-phase inducer phosphatase 3 (EC 3.1.3.48)	A1l	0	0,591	0,778	0	0	0	0,595
L29216	CLK-2	A1n	0	0	0,949	0	0,851	0	0
L29220	CLK-3	A2a	0	0	0,595	0	0,667	0	0
X66360	serine/threonine-protein kinase pctaie-2	A2d	0	0	0,611	0	0	0	0
L25676	Name unklar	A2f	0,556	0,5	0,782	0	1,018	0,578	0
L33264	CDC2-related kinase pisslire	A2h	0	0	0	0	0,819	0	0
X51688	Cyclin A	A2i	0,965	0,68	0,863	0	0	0	0
M25753	Cyclin B1 G2/mitotic-specific	A2j	1,676	1,786	1,118	1,61	1,483	0,669	1,103
X59798	Cyclin D1 (Cyclin Prad1) (BCL-1 oncogene)	A2l	0,669	0,823	0,677	0	0,782	0,559	0
M92287	Cyclin D3	A2h	0	0	0,778	0	0,866	0	0
U47413	Cyclin G1	A3b	0	0,757	1,026	0	0	0	0
U22398	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (Cyclin-dependent kinase inhibitor P57) (P57KIP2)	A3f	0	0	0,77	1,912	1,788	0	0
L27211	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor A (CDK4I) (P16-INK4) (multiple tumor suppressor 1) (MTS1) (CDKN2A)	A3g	1,079	0,882	0,848	0	0,644	0,64	0,427
U10564	WEE1-like protein kinase (EC2.7.1.12) (Wee1Hu)	A3j	0,766	1,224	0,96	1,021	0,975	0	0,75
U38545	Phospholipase D1	A3l	0	0	0,492	0	0	0	0
D63878	NEDD5 protein homolog	A3m	0	0,733	0,439	0	0,43	0	0
U00001	CDC27HS protein	A4a	0	0	0,271	0	0	0	0
U25278	extracellular signal-regulated kinase 5 (EC 2.7.1.-) (ERK5) (BMK1 kinase)	A4i	0	0	0,487	0	0	0	0
X79483	extracellular signal-regulated kinase 6 (EC 2.7.1.-) (ERK6) (ERK5)	A4j	0,634	0	0	0	0,553	0	0
L35253	mitogen-activated protein kinase P38 (EC 2.7.1.-) (MAP kinase P38) (catokine suppressive anti-inflammatory drug binding protein) (CSAID binding protein) (CSBP) (MAX-interacting protein 2) (MAP kinase MX12)	A4k	0,975	0	0,552	0	0,613	0	0
L31951	stress-activated protein kinase JNK2 (EC 2.7.1.-) (C-JUN N-terminal kinase 2) (JNK-55)	A4m	0,946	0,41	0,643	0	0	0	0
U25265	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 5 (EC 2.7.1.-) (MAP kinase kinase 5) (MAPKK5) (MAPK/ERK kinase 5)	A5a	0,97	0	0,781	0,471	0,876	0	0,632
L05624	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1 (EC 2.7.1.-) (MAP kinase kinase 1) (MAPKK 1) (ERK activator kinase 1) (MAPK/ERK kinase 1) (MEK1)	A5b	0,789	0,553	0,768	0	1,057	0	0,589

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
U39657	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 6 (EC 2.7.1.-) (MAP kinase kinase 6) (MAPKK 6) (MAP/ERK kinase 6) (SAPKK3)	A5c	0	0,59	0	0	0	0,388	0,548
M15796	PCNA (cyclin)	A5e	1,017	1,461	1,104	0,796	1,073	0,476	0,683
	E2F-1pRB-binding protein	A5h	1,228	0	0,943	1,301	1,626	0,625	0
Y10479	E2F-3	A5i	0,542	0	0	0	0	0	0
L23959	E2F-related transcription factor (DP-1)	A5k	0,703	0	0,694	0	0	0	0
U18422	DP2 (Humdp2), dimerization partner of E2F	A5l	1,006	0,953	0,919	1,252	1,813	0,481	0,762
X85134	RFBQ-3	A5m	0,704	0	0	0	0	0	0
AF001954	growth inhibitor p33ING1 (ING1)	A6a	0	0	0	0	0,681	0	0,623
U69276	GRB-IR / GRB10	A6d	1,031	0,916	0,809	0,94	1,618	0,94	0,529
X03484	RAF oncogene	A6e	0,934	0,954	0,98	0,637	0,869	0	0
M95712	raf.b-	A6f	0,635	0	0	0	0	0	0
Z29074	keratin, type I cytoskeletal 9 (cytokeratin 9) (K9) (CK 9)	A6j	0	0	1,026	0	0	0	0,45
M19156	keratin, type I cytoskeletal 10 (cytokeratin 10) K10) (CK 10)	A6k	0,81	0	0,791	0	0	0	0,526
M21772									
M20336	keratin, type I cytoskeletal 16 (cytokeratin 16) (K16) (CK16) & pseudo-keratin K16 type I	A7a	0,91	0	1,055	0	0	0	0,694
Y00503	keratin, type I cytoskeletal 19 (cytokeratin 19) (K19) (CK19)	A7c	2,035	1,16	3,05	1,378	1,757	1,295	1,215
M98776	keratin, type II cytoskeletal 1 (cytokeratin 1) (K1) (CK1) (67KD cytokeratin) (hair alpha protein)	A7d	0	0	1,176	0	0	0	0
M99063	keratin, type II cytoskeletal 2 oral (cytokeratin 2P) (K2P) (CK2P)	A7e	1,311	0	0	0	0	0	0
M21389	keratin, type II cytoskeletal 5 keratin, type II cytoskeletal 5 (cytokeratin 5) (K5) (CK5) (58 KD cytokeratin)	A7h	0	0	0	1,333	1,145	0	0
U59747	apoptosis regulator BCL-W	B1d	0	0	0,919	0	0	0	0
L08246	induced myeloid leukemia cell differentiation protein MCL-1 (ORF is at nt. 61-1053;ML)	B1e	0,797	1,242	0,65	0,649	0,594	0	0,583
U29680	BCL2-related protein A1 (BFL-1 protein) (hemopoietic-specific early response protein) (GRS protein)	B1f	0,858	0	0	0	0	0	0
U23765	BCL-2 homologous antagonist/killer (apoptosis regulator BAK)	B1h	0,967	0	0,649	0,845	0	0	0
U66879	BAD protein (BCL-1 binding component 6)	B1i	0,456	0	0,859	0,604	0,57	0,634	0,5
S83171	BCL-2 binding athanogene-1 (BAG-1) (glucocorticoid receptor-associated protein RAP46)	B1j	1,156	0,7	1,227	1,795	1,542	0,509	0,779
AF015956	DAXX, a FAS-binding protein that activates JNK and apoptosis	B2b	0	0	0	0,616	0	0	0,831
U77845	TRAF-interacting protein (TRIP)	B2g	0,709	0,674	0,696	0,434	0,735	0	0,494
U66469	p53-dependent cell growth regulator CGR19	B2m	0,648	0	0	0	0	0	0
U13021	(caspase-2) (ICH-1L) (ICH-1S)	B3b	0,764	0,776	0,853	0,81	0	0,487	0,675
U28014	ICH2-protease precursor (EC3.4.22.-) (TX protease) (icerel-II) (caspase-4) & caspase-5 precursor								
U28015	(EC3.4.22.-) (ICH-3 protease) (TY protease icerel-III)	B3d	1,205	0,994	0	0	0	0,57	0,679

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
U18321	death-associated protein 3 (DAP-3) (ionizing radiation resistance conferring protein)	B3k	0,878	0,486	0,782	0,442	0,331	0,563	0,556
U69611	TNF-alpha converting enzyme	B4f	0,665	1,153	0	0	0	0	0
AF017988	secreted apoptosis related protein 3 (SARP3)	B4m	1,628	0	0	0	0	0	0
U90313	glutathione-S-transferase homolog	B5b	0,657	0,729	1,086	0,829	1,311	0,698	0
U33286	chromosome segregation gene homolog CAS	B5d	0,704	0,768	0	0	0	0	0
AF010309	Pig3 (PIG3)	B5g	0,61	0	0	0	0	0	0
AF010312	Pig7 (PIG7)	B5h	0,707	0	0,761	0,813	0,885	0	0
HT2291	proto-oncogene tyrosine-protein kinase SRC (EC 2.7.1.112) (P60-SRC) (C-SRC)	B6c	0	0	0	0	0	0,741	0
J02958	MET	B6h	1,208	1,117	1,106	0,98	1,345	0	1,017
X74262	RBA/p48	B7b	1,16	1,042	0,783	0,44	0,868	0,693	0,727
X85133	RBQ1 retinoblastoma binding protein	B7d	0,657	0	0	0,56	0,754	0	0
M15990	YES	B7h	1,031	0	0,907	0	0	0	0
M35296	tyrosine-protein kinase ABL2 (EC 2.7.1.112) (tyrosine kinase ARG) (ABL)	B7j	0,455	0	0	0	0	0	0
U18671									
M97934	signal transducer and activator of transcription 2 (P113) (STAT2)	B7m	0,606	0	0,804	0	0	0	0
U47686	signal transducer and transcription activator 5B (STAT5B)	B7n	0,816	0	0	0	0	0,539	0
D13804	DNA repair protein RAD51 homolog [replication protein A (E coli RecA homolog, RAD51 homolog)]	C1k	1,174	0,766	0,898	0	0,563	0,652	0,927
M31899	DNA-repair protein complementing XP-B cells (Xeroderma pigmentosum group B complementing protein) (DNA excision repair protein ERCC3) (basal transcription factor 2 89 KD subunit) (BTF-2-p89) (TFIIH 89 KD subunit)	C2a	0,822	0,981	0,791	0	0,671	0,591	0,759
X52221	DNA-repair protein complementing XP-D cells (xeroderma pigmentosum group D complementing protein) (DNA excision repair protein ERCC-2)	C2b	0,724	0	0,734	0	0,905	0	0
M36089	DNA-repair protein XRCC1	C2c	1,001	0	0,816	0	0,616	0,798	0,926
X90392	muscle-specific Dnase I-like [DNase X] (XIB)	C2h	0	0	0,855	0,903	0	0	0
U07418	DNA mismatch repair protein MLH1 (mutL homolog)	C2i	1,15	0,774	0,725	1,004	0,456	0	0,834
L007540	activator 1 36KD subunit (replication factor C 36 KD subunit) (RFC36)	C2k	0	0	0	0	0,497	0	0
M87339	activator 1 37 KD subunit (replication factor C 37 KD subunit) (RFC37)	C2l	0	0,629	0	0	0	0	0
M87338	activator 40 KD subunit (replication factor C 40 KD subunit) (RFC40)	C2n	1,183	0	1,185	1,376	1,435	1,177	0,795
M63488	replication protein A 70 KD DNA-binding subunit (RP-A) (replication factor-A protein 1) (single stranded DNA-binding protein)	C3a	1,111	0,997	1,11	0	0,812	0,488	0,87
M74524	HHR6A (yeast RAD6 homolog) (ubiquitin-conjugating enzyme) (UBCA)	C3d	0,821	0,718	0,906	0,776	1,292	0,466	0,942
U77493	Notch2	C3g	0,84	1,095	1,011	0	0,765	0,865	0,721
M99437	notch group protein (N)	C3h	1,082	1,237	0,724	0	0,764	0,692	0,75
U95299	Notch4	C3i	1,011	0	0,675	0	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
L37882	frizzled	C4f	0	0	0	0	0,703	0	0
U43318	frizzled 5	C4h	0	0	0,992	0	0,843	0,981	0
U84401	smoothed	C4n	0,975	0,505	0	0	0	0,656	0
Y00285	cation-independent mannose-6-phosphate receptor [insuline-like growth factor receptor II, IGFR-2]	C5c	1,026	0,972	0,925	1,438	0,493	0,739	1,084
K03193	epidermal growth factor receptor precursor (EC 2.7.1.112). (EGFR) (ERBB1)	C5e	0,712	0	0	0	0	0	0
M60459	aerthyroprotein receptor	C5i	0	0	0,978	0	0	0	0
Z24680	GARP	C5k	0	0	0,929	0	0,543	0	0
M11730	HER2 (ERB-B2)	C5l	0	0	1,112	0,883	1,045	0,744	0
M37722	basic fibroblast growth factor receptor 1 precursor (BFGF-R) (EC 2.7.1.112) (FMS-like tyrosine kinase-2) (C-FGR) (FGFR1) (FLG) (FGFR) (FLT2). (HBGR-R-alpha-A1) (HBGF-R-alpha-A2) (HBGR-R-alpha-A3) + FGFR secreted form (M34188)	C6i	1,023	0,675	1,016	0	0,737	0	0,802
M14764	nerve growth factor receptor	C6j	0	0	0	0	0,786	0	0
U33635	transmembrane receptor precursor (PTK7); colon carcinoma kinase-4 (CCK4)	C6m	0,419	0	1,339	0,742	0,82	1,153	0
X87852	sex gene	C6n	0,404	0	1,022	0	0	0	0
X97442	transmembrane protein TMP21	C7b	1,192	0,944	1,044	0	1,194	0,943	1,044
M33294	tumor necrosis factor receptor 1	C7g	1,034	0	1,095	0	0,602	0,986	0,844
M32315	tumor necrosis factor receptor 2 precursor (tumor necrosis factor binding protein 2) (TBPII) (P80) (TNF-R2) (P75) (CD120B) (TNFR2) (TNFR)	C7h	0	0	0,744	0	0	0	0
M73779	retinoic acid receptor alpha1 (RAR-alpha1) + PML-RAR protein	C7i	0	0	1,409	0,881	0,772	0,779	0,902
X52773	retinoic acid receptor alpha [retinoic acid receptor RXR.alpha (RXRA)]	C7j	1,177	0	0,964	0	0	0,66	0
M24857	retinoic acid receptor gamma [retinoic acid receptor gamma]	C7l	0,906	0	0	0	0	0	0
M84820	retinoic acid receptor rxr-beta [retinoic acid receptor RXR-beta]	C7m	0,955	0	0	0	0	0	0
X05610	collagen type IV alpha	D1j	0	0	0	0,777	0,733	0,916	0,824
X70904	LAM3AH (LAMA4)	D2f	0,559	0	0	0	0	0	0
M61916	laminin B1	D2h	0,405	0,592	1,014	0,794	0,857	0,727	0,599
U43901	laminin, 37KD receptor	D2j	4,554	1,495	4,415	3,362	3,099	2,893	3,082
U86759	netrin-2	D2k	1,175	0,543	2,543	0	0	1,013	0,947
M30269	nidogen	D2l	0,488	0	0	0	0,778	0	0
J03040	sparc precursor (secreted protein acidic and rich in cysteine) (osteonectin) (ON) (basement membrane protein BM-40)	D3b	2,038	1,935	1,746	0	1,442	0,99	0,754
X14787	thrombospondin 1 precursor	D3c	0	0	1,248	0	0	0	0
L12350	thrombospondin 2 precursor	D3d	0,5	0	0	0	0	0	0
X03168	vitronectin precursor (serum spreading factor) (S-protein) (contains: somatomedin B)	D3e	0,769	0,63	1,335	0,996	0,966	0,691	0,517
X02761	fibronectin	D3f	0,628	1,013	1,548	0,812	0,915	0,612	0,74

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
M85289	heparan sulfate proteoglycan (HSPG2)	D3h	0,76	0	1,011	0	0	0,756	0
M59911	integrin alpha3	D3k	0	0	0	0,95	0	0,635	0
X53586	integrin alpha6	D3n	0,569	0,604	0	0	0	0,643	0,686
J02703	integrin beta3 [platelet membrane glycoprotein IIIa]	D4f	0,634	0	1,488	0	0	0	0
J05633	integrin beta5	D4h	0	0	1,038	0	0,679	0,555	0
M62880	integrin beta7	D4j	0,642	0	0	0	0	0	0
U40282	Integrin-linked kinase (ILK)	D4m	0,718	0	1,438	1,26	1,139	0	0,685
U43522	Protein tyrosine kinase Pyk2 (Cell adhesion kinase-beta, CAK-beta) (FAK2)	D4n	0	0	0	0	0	0,508	0,577
X94991	Zyxin & Zyxin-2	D5b	0	0	0,852	0,735	0	0	0
U32907	P37NB	D5n	0,663	0	0	0	0	0	0
U60800	semaphorin (CD100)	D6b	0	0	0,837	0,584	0	0	0,558
Y00815	LAR	D6h	1,022	1,186	1,743	0,602	1,103	1,665	0,913
U29343	hyaluronan receptor (RHAMM)	D6i	0	0	0,627	0	0	0	0
L04947	vascular endothelial growth factor receptor 2 precursor (EC 2.7.1.112) (VEGFR-2) (KDR) (kinase insert domain receptor) (fragment)	D6m	0	0	0,904	0	0	0	0
X68203	vascular endothelial growth factor receptor 3 precursor (EC 2.7.1.112) (VEGFR-3) (tyrosine-protein kinase receptor FLT4, class III)	D6n	0	0,663	0	0	0	0,727	0
U48801	vascular endothelial growth factor B precursor (VEGF-B) + VEGF related factor isoform VRF186 precursor	D7d	0	0	0	0,756	0	0	0,626
U43142	vascular endothelial growth factor C precursor (VEGF-C) (vascular endothelial growth factor related protein) (VRP) (FLT4 ligand)	D7e	0	0	0	0,902	0	0	0
U04806	SL cytokine precursor (FLT3/FLK2 ligand)	D7g	0	0	0,969	0	0	0	0
L03840	FRFR4	D7k	0,661	0	0,797	0	0,686	0	0,616
U11814	fibroblast growth factor receptor 2 precursor (FGFR-2) (EC 2.7.1.112) (keratinocyte growth factor receptor) (FGFR2) (BFR-1) (KSAM-1) & K-SAM; K-SAM-III; K-SAM-IV	D7l	0,58	0	0	0	0	0	0
J03210	MMP-2 (gelatinase A)	E1b	0,882	0,88	0,684	0	0	0,627	0
J05070	MMP-9 (gelatinase B)	E1f	1,111	0	0	0	0	0	0
X75308	MMP-13 (collagenase-3)	E1j	0	0	0,934	0	0	0	0
X03124	TIMP-1 (erythroid potentiating activity, EPA)	E2b	0	0,35	0	0	0,964	0,538	0
Z30183	TIMP-3 (mitogen-inducible gene 5, mig-5)	E2d	1,095	0	1,271	1,044	0,63	1,089	0,736
M15476	urokinase-type plasminogen activator precursor (EC 3.4.21.73) (UPA) (U-plasminogen activator)	E2g	0,9	0	1,429	0	0	0	0
M15518	tissue-type plasminogen activator precursor (EC 3.4.21.68) (T-PA) (T-plasminogen activator)	E2h	3,314	0	0	0	0	0	0
X13916	low-density lipoprotein receptor-related protein 1 precursor (LRP)	E2n	1,696	1,771	3,134	1,233	1,96	2,224	2,187
U04441	low-density lipoprotein receptor-related protein 2 (megalin) (glycoprotein 330) (fragment)	E3a	0,827	0	0,624	0	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
M63959	alpha-2 macroglobulin receptor-associated protein precursor (alpha-2-MRAP) (low density lipoprotein receptor-related protein-associated protein 1) (RAP)d valign=top>	E3d	0	0,668	0,948	0	0,691	0	0
Y07604	nm23-H4; nucleoside-diphosphate kinase (EC 2.7.4.6) (nucleoside 5'-diphosphate phosphotransferase) (NDK)	E3g	0,911	0	1,069	0	0	0,835	0
X06820	rhoB	E3l	0,899	0,42	1,248	0,926	0,688	0,756	0,568
X61587	rhoG	E3n	0,647	0	1,488	0,786	1,031	0,813	1,037
M64595	RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1 (P21-RAC2)	E4e	0	0	1,346	0	0	0	0
U82532	GDI-dissociation inhibitor RhoGDIgamma	E4k	0	0	0,783	0	0	0	0
U16296	T-lymphoma invasion and metastasis inducing TIAM1	E4l	0	0,403	0	0	0	0	0
U11690	putative RHO/RAC guanine nucleotide exchange factor (RHO/RAC GEF) (faciogenital dysplasia protein)	E4m	0,941	0	0,998	0	0	0,682	0
U24153	p21-activated protein kinase (Pak2)	E5d	0	0,647	0	0	0	0	0
X63629	cadherin-3 placental-cadherin precursor (P-cadherin)	E5f	0,923	0,498	0	0,69	0	0,754	0,619
L34059	cadherin-4 retinal-cadherin precursor (R-cadherin) (R-CAD)	E5g	0	0	0	0,832	0	0	0
X87838	beta-catenin	E6c	1,269	0,992	0,909	0	1,383	0,778	0,811
M74088	APC (DP2.5)	E6e	0,711	0	1,37	0	0	0	0
U49089	neuroendocrine-dlg (NE-dlg) a novel human homolog of the Drosophila discs large (dlg) tumor suppressor protein interacting with the APC protein	E6f	0,466	0,487	0,993	0	0	0	0,577
M77830	desmoplakin I	E6j	0,546	0,488	0,88	0	0	0	0,718
X56807	DSC2 mRNA for desmocollins type 2a and 2b	E7c	0,611	0,45	0	0	0	0	0
M57730	Ephrin-A1 precursor (EPH-related receptor tyrosine kinase ligand 1) (LERK-1) (immediate early response protein B61) (tumor necrosis factor, alpha induced protein)	E7d	0,861	0,545	0,939	0	0,679	0,835	0,551
M37476	Ephrin-A5 precursor (EPH-related receptor tyrosine kinase ligand 7) 8lerk-7) (AL-1)	E7e	0,885	0,41	0	0	0	0	0
U26403	bone morphogenetic protein 1 (procollagen C-proteinase) (pCP-2)	F1g	0,841	0	1,4	0	0,829	0,798	0
M22488	bone morphogenetic protein 4 (BMP-2B)	F1k	0	0	1,863	0	0,575	0	0
D30751	growth inhibitory factor (metallothionein-II) (MT-II)	F3h	0,434	0	0,876	0	0	0	0
D13365	pleiotrophin precursor (PTN) (heparin-binding growth-associated molecule) (HB-GAM) (heparin-binding growth factor 8) (HBGF-8)) (osteoblast specific factor 1) (OSF-1) (heparin-binding neurite outgrowth promoting factor 1) (HBNF-1)	F3i	1,22	0,981	1,105	0	0,714	0,796	0,723
M57399	hepatocyte growth factor precursor (scatter factor) (SF) (hepatopoietin A)	F3m	0,43	0	1,036	0	0	0	0
A25270	IFN-gamma antagonist cytokine	F4b	0,843	0,734	0,895	1,019	0,502	0	0
M27544	IGF-1	F4c	0,599	0	0	0	0	0	0
A14844	interleukin IL-2	F4h	0	0	0,937	0	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
X04688	interleukin IL-5 (B cell differentiation factor 1) (T-cell replacing factor) (eosinophil differentiation factor)	F4k	0,491	0	0	0	0	0	0
J04156	interleukin IL-7	F4m	0,625	0	0	0	0	0	0
U14407	interleukin IL-15	F5g	0	0	0,793	0,805	0,482	0	0
U32659	interleukin IL-17	F5h	0	0	0	0,759	0,784	0	0
M28622	leukocyte interferon beta 1	F5j	1,188	0	1,058	2,563	3,038	0	0
X02492	leukocyte interferon-inducible peptide	F5l	0	0	0	1,18	1,449	0,989	0
X13967	LIF	F5m	0,787	0	0	0	0	0	0
M25639	MIF	F5n	7,967	2,074	4,22	3,487	3,465	3,82	3,511
M96956	TDGF1 (teratocarcinoma-derived growth factor 1) (epidermal growth factor-like cripto protein CR1) (cripto-1 growth factor) (CRGF) + TDGF (teratocarcinoma-derived growth factor 2) (epidermal growth factor-like cripto protein CR3) (cripto-3 GF) (CRGF) ...	F6k	0,459	0	0	0	0	0	0
J03241	TGF-beta3	F6m	0,772	0	0	0	0	0	0
X02812	transforming growth factor-beta	F7b	0,296	0	0	0	0	0	0
L07414	CD40	F7e	0,48	0	0	0,959	0,706	0	0
U05875	interferon-gamma receptor beta chain [interferon gamma receptor accessory factor-1 (AF-1)]	F7f	0,595	0,552	0,942	0	0,379	0,726	0
X14454	interferon regulatory factor [interferon regulatory factor 1]	F7g	0,826	0,459	1,229	0	0,745	0,988	0
J03143	interferon-gamma receptor alpha chain	F7k	0,757	0	0	0	0	0	0
X72755	gamma interferon induced monokine [humig]	F7m	0,736	0	0	0	0	0	0

Tabelle 29: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die nicht auswertbar waren.

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
M74091	Cyclin C G1/S-specific	A2k	0	0	0	0	0	0	0
U57059	Apo-2 ligand (TNF-related apoptosis inducing ligand TRAIL)	B2c	0	0	0	0	0	0	0
L07594	transforming growth factor-beta type III receptor	C7a	0	0	0	0	0	0	0
J03171	HuIFN-alpha-rec [interferon alpha-beta receptor alpha chain]	F7i	0	0	0	0	0	0	0
X77722	interferon alpha-beta receptor beta chain	F7j	0	0	0	0	0	0	0
A09781	interferon-gamma receptor	F7l	0	0	0	0	0	0	0
X02530	interferon-gamma induced protein	F7n	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 30: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die von extravillösem Trophoblast in die Fusion eingbracht worden sind (AC1-1 und JEG-3=0; Mindestens ein Hybrid>0).

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
M68520	cell division protein kinase 2 (EC 2.7.1.-) (P33 protein kinase)	A1b	0	0	0	0	0,742	0	0
L29216	CLK-2	A1n	0	0	0,949	0	0,851	0	0
L29220	CLK-3	A2a	0	0	0,595	0	0,667	0	0
X66360	serine/threonine-protein kinase pctaire-2	A2d	0	0	0,611	0	0	0	0
L33264	CDC2-related kinase pisslire	A2h	0	0	0	0	0,819	0	0
X51688	Cyclin A	A2i	0,965	0,68	0,863	0	0	0	0
M92287	Cyclin D3	A2n	0	0	0,778	0	0,866	0	0
U47413	Cyclin G1	A3b	0	0,757	1,026	0	0	0	0
U22398	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (Cyclin-dependent kinase inhibitor P57) (P57KIP2)	A3f	0	0	0,77	1,912	1,788	0	0
U38545	Phospholipase D1	A3i	0	0	0,492	0	0	0	0
D63878	NEDD5 protein homolog	A3m	0	0,733	0,439	0	0,43	0	0
U00001	CDC27HS protein	A4a	0	0	0,271	0	0	0	0
U25278	extracellular signal-regulated kinase 5 (EC 2.7.1.-) (ERK5) (BMK1 kinase)	A4i	0	0	0,487	0	0	0	0
X79483	extracellular signal-regulated kinase 6 (EC 2.7.1.-) (ERK6) (ERK5)	A4j	0,634	0	0	0	0,553	0	0
L35253	mitogen-activated protein kinase P38 (EC 2.7.1.-) (MAP kinase P38) (catokine suppressive anti-inflammatory drug binding protein) (CSAID binding protein) (CSBP) (MAX-interacting protein 2) (MAP kinase MX12)	A4k	0,975	0	0,552	0	0,613	0	0
L31951	stress-activated protein kinase JNK2 (EC 2.7.1.-) (C-JUN N-terminal kinase 2) (JNK-55)	A4m	0,946	0,41	0,643	0	0	0	0
Y10479	E2F-3	A5i	0,542	0	0	0	0	0	0
L23959	E2F-related transcription factor (DP-1)	A5k	0,703	0	0,694	0	0	0	0
X85134	RFBQ-3	A5m	0,704	0	0	0	0	0	0
X03484	RAF oncogene	A6e	0,934	0,954	0,98	0,637	0,869	0	0
M95712	raf,b-	A6f	0,635	0	0	0	0	0	0
M98776	keratin, type II cytoskeletal 1 (cytokeratin 1) (K1) (CK1) (67KD cytokeratin) (hair alpha protein)	A7d	0	0	1,176	0	0	0	0
M99063	keratin, type II cytoskeletal 2 oral (cytokeratin 2P) (K2P) (CK2P)	A7e	1,311	0	0	0	0	0	0
M21389	keratin, type II cytoskeletal 5 keratin, type II cytoskeletal 5 (cytokeratin 5) (K5) (CK5) (58 KD cytokeratin)	A7h	0	0	0	1,333	1,145	0	0
U59747	apoptosis regulator BCL-W	B1d	0	0	0,919	0	0	0	0
U29680	BCL2-related protein A1 (BFL-1 protein) (hemopoietic-specific early response protein) (GRS protein)	B1f	0,858	0	0	0	0	0	0
U23765	BCL-2 homologous antagonist/killer (apoptosis regulator BAK)	B1h	0,967	0	0,649	0,845	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
U66469	p53-dependent cell growth regulator CGR19	B2m	0,648	0	0	0	0	0	0
U69611	TNF-alpha converting enzyme	B4f	0,665	1,153	0	0	0	0	0
AF017988	secreted apoptosis related protein 3 (SARP3)	B4m	1,628	0	0	0	0	0	0
U33286	chromosome segregation gene homolog CAS	B5d	0,704	0,768	0	0	0	0	0
AF010309	Pig3 (PIG3)	B5g	0,61	0	0	0	0	0	0
AF010312	Pig7 (PIG7)	B5h	0,707	0	0,761	0,813	0,885	0	0
X85133	RBQ1 retinoblastoma binding protein	B7d	0,657	0	0	0,56	0,754	0	0
M15990	YES	B7h	1,031	0	0,907	0	0	0	0
M35296	tyrosine-protein kinase ABL2 (EC 2.7.1.112) (tyrosine kinase ARG) (ABLL)	B7j	0,455	0	0	0	0	0	0
U18671									
M97934	signal transducer and activator of transcription 2 (P113) (STAT2)	B7m	0,606	0	0,804	0	0	0	0
X52221	DNA-repair protein complementing XP-D cells (xeroderma pigmentosum group D complementing protein) (DNA excision repair protein ERCC-2)	C2b	0,724	0	0,734	0	0,905	0	0
X90392	muscle-specific Dnase I-like [DNase X] (XIB)	C2h	0	0	0,855	0,903	0	0	0
L007540	activator 1 36KD subunit (replication factor C 36 KD subunit) (RFC36)	C2k	0	0	0	0	0,497	0	0
M87339	activator 1 37 KD subunit (replication factor C 37 KD subunit) (RFC37)	C2l	0	0,629	0	0	0	0	0
U95299	Notch4	C3i	1,011	0	0,675	0	0	0	0
L37882	frizzled	C4f	0	0	0	0	0,703	0	0
K03193	epidermal growth factor receptor precursor (EC 2.7.1.112). (EGFR) (ERBB1)	C5e	0,712	0	0	0	0	0	0
M60459	aerythroprotein receptor	C5i	0	0	0,978	0	0	0	0
Z24680	GARP	C5k	0	0	0,929	0	0,543	0	0
M14764	nerve growth factor receptor	C6j	0	0	0	0	0,786	0	0
X87852	sex gene	C6n	0,404	0	1,022	0	0	0	0
M32315	tumor necrosis factor receptor 2 precursor (tumor necrosis factor binding protein 2) (TNF-R2) (P75) (CD120B) (TNFR2) (TNFR)	C7h	0	0	0,744	0	0	0	0
M24857	retinoic acid receptor gamma [retinoic acid receptor gamma]	C7i	0,906	0	0	0	0	0	0
M84820	retinoic acid receptor rxr-beta [retinoic acid receptor RXR-beta]	C7m	0,955	0	0	0	0	0	0
X70904	LAM3AH (LAMA4)	D2f	0,559	0	0	0	0	0	0
M30269	nidogen	D2l	0,488	0	0	0	0,778	0	0
X14787	thrombospondin 1 precursor	D3c	0	0	1,248	0	0	0	0
L12350	thrombospondin 2 precursor	D3d	0,5	0	0	0	0	0	0
J02703	integrin beta3 [platelet membrane glycoprotein IIIa]	D4f	0,634	0	1,488	0	0	0	0
M62880	integrin beta7	D4j	0,642	0	0	0	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
X94991	Zyxin & Zyxin-2	D5b	0	0	0,852	0,735	0	0	0
U32907	P37NB	D5n	0,663	0	0	0	0	0	0
U29343	hyaluronan receptor (RHAMM)	D6i	0	0	0,627	0	0	0	0
L04947	vascular endothelial growth factor receptor 2 precursor (EC 2.7.1.112) (VEGFR-2) (KDR) (kinase insert domain receptor) (fragment)	D6m	0	0	0,904	0	0	0	0
U43142	vascular endothelial growth factor C precursor (VEGF-C) (vascular endothelial growth factor related protein) (VRP) (FLT4 ligand)	D7e	0	0	0	0,902	0	0	0
U04806	SL cytokine precursor (FLT3/FLK2 ligand)	D7g	0	0	0,969	0	0	0	0
U11814	fibroblast growth factor receptor 2 precursor (FGFR-2) (EC 2.7.1.112) (keratinocyte growth factor receptor) (FGFR2) (BFR-1) (KSAM-1) & K-SAM; K-SAM-III; K-SAM-IV	D7i	0,58	0	0	0	0	0	0
J05070	MMP-9 (gelatinase B)	E1f	1,111	0	0	0	0	0	0
X75308	MMP-13 (collagenase-3)	E1j	0	0	0,934	0	0	0	0
M15476	urokinase-type plasminogen activator precursor (EC 3.4.21.73) (UPA) (U-plasminogen activator)	E2g	0,9	0	1,429	0	0	0	0
M15518	tissue-type plasminogen activator precursor (EC 3.4.21.68) (T-PA) (T-plasminogen activator)	E2h	3,314	0	0	0	0	0	0
U04441	low-density lipoprotein receptor-related protein 2 (megalin) (glycoprotein 330) (fragment)	E3a	0,827	0	0,624	0	0	0	0
M63959	alpha-2 macroglobulin receptor-associated protein precursor (alpha-2-MRAP) (low density lipoprotein receptor-related protein-associated protein 1) (RAP) ^{d valign=top>}	E3d	0	0,668	0,948	0	0,691	0	0
M64595	RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1 (P21-RAC2)	E4e	0	0	1,346	0	0	0	0
U82532	GDI-dissociation inhibitor RhoGDIgamma	E4k	0	0	0,783	0	0	0	0
U16296	T-lymphoma invasion and metastasis inducing TIAM1	E4i	0	0,403	0	0	0	0	0
U24153	p21-activated protein kinase (Pak2)	E5d	0	0,647	0	0	0	0	0
L34059	cadherin-4 retinal-cadherin precursor (R-cadherin) (R-CAD)	E5g	0	0	0	0,832	0	0	0
M74088	APC (DP2.5)	E6e	0,711	0	1,37	0	0	0	0
X56807	DSC2 mRNA for desmocolins type 2a and 2b	E7c	0,611	0,45	0	0	0	0	0
U26403	Ephrin-A5 precursor (EPH-related receptor tyrosine kinase ligand 7) 8lerk-7) (AL-1)	E7e	0,885	0,41	0	0	0	0	0
D30751	bone morphogenetic protein 4 (BMP-2B)	F1k	0	0	1,863	0	0,575	0	0
D13365	growth inhibitory factor (metallothionein-II) (MT-II)	F3h	0,434	0	0,876	0	0	0	0
M60718	hepatocyte growth factor precursor (scatter factor) (SF) (hepatopoietin A)	F3m	0,43	0	1,036	0	0	0	0
A25270	IFN-gamma antagonist cytokine	F4b	0,843	0,734	0,895	1,019	0,502	0	0
M27544	IGF-1	F4c	0,599	0	0	0	0	0	0
A14844	interleukin IL-2	F4h	0	0	0,937	0	0	0	0
X04688	interleukin IL-5 (B cell differentiation factor I) (T-cell replacing factor) (eosinophil differentiation factor)	F4k	0,491	0	0	0	0	0	0
J04156	interleukin IL-7	F4m	0,625	0	0	0	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
U14407	interleukin IL-15	F5g	0	0	0,793	0,805	0,482	0	0
U32659	interleukin IL-17	F5h	0	0	0	0,759	0,784	0	0
M28622	leukocyte interferon beta 1	F5j	1,188	0	1,058	2,563	3,038	0	0
X13967	LIF	F5m	0,787	0	0	0	0	0	0
	TDGF1 (teratocarcinoma-derived growth factor 1) (epidermal growth factor-like cripto protein CR1) (cripto-1 growth factor) (CRGF) + TDGF (teratocarcinoma-derived growth factor 2) (epidermal growth factor-like cripto protein CR3) (cripto-3 GF) (CRGF) ...								
M96956	factor-like cripto protein CR3) (cripto-3 GF) (CRGF) ...	F6k	0,459	0	0	0	0	0	0
J03241	TGF-beta3	F6m	0,772	0	0	0	0	0	0
X02812	transforming growth factor-beta	F7b	0,296	0	0	0	0	0	0
L07414	CD40	F7e	0,48	0	0	0,959	0,706	0	0
J03143	interferon-gamma receptor alpha chain	F7k	0,757	0	0	0	0	0	0
X72755	gamma interferon induced monokine [humig]	F7m	0,736	0	0	0	0	0	0

Tabelle 31: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die in allen fünf Hybriden, aber nicht in AC1-1 oder JEG-3 exprimiert werden.

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
X03484	RAF oncogene	A6e	0,934	0,954	0,98	0,637	0,869	0	0
A25270	IFN-gamma antagonist cytokine	F4b	0,843	0,734	0,895	1,019	0,502	0	0

Tabelle 32: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die durch die Fusion in die Zelllinien eingebracht worden sind (mindesten ein Hybrid>0, AC1-1=0).

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
M68520	cell division protein kinase 2 (EC2.7.1.-) (P33 protein kinase)	A1b	0	0	0	0	0,742	0	0
M34065	cdc25C; M-phase inducer phosphatase 3 (EC 3.1.3.48)	A1l	0	0,591	0,778	0	0	0	0,595
L29216	CLK-2	A1n	0	0	0,949	0	0,851	0	0
L29220	CLK-3	A2a	0	0	0,595	0	0,667	0	0
X66360	serine/threonine-protein kinase pctaire-2	A2d	0	0	0,611	0	0	0	0
L33264	CDC2-related kinase pisslire	A2h	0	0	0	0	0,819	0	0
X51688	Cyclin A	A2i	0,965	0,68	0,863	0	0	0	0
M92287	Cyclin D3	A2n	0	0	0,778	0	0,866	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
U47413	Cyclin G1	A3b	0	0,757	1,026	0	0	0	0
U22398	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (Cyclin-dependent kinase inhibitor P57) (P57KIP2)	A3f	0	0	0,77	1,912	1,788	0	0
U10564	WEE1-like protein kinase (EC2.7.1.112) (Wee1Hu)	A3j	0,766	1,224	0,96	1,021	0,975	0	0,75
U38545	Phospholipase D1	A3i	0	0	0,492	0	0	0	0
D63878	NEDD5 protein homolog	A3m	0	0,733	0,439	0	0,43	0	0
U00001	CDC27HS protein	A4a	0	0	0,271	0	0	0	0
U25278	extracellular signal-regulated kinase 5 (EC 2.7.1.-) (ERK5) (BMK1 kinase)	A4i	0	0	0,487	0	0	0	0
X79483	extracellular signal-regulated kinase 6 (EC 2.7.1.-) (ERK6) (ERK5)	A4j	0,634	0	0	0	0,553	0	0
L35253	mitogen-activated protein kinase P38 (EC 2.7.1.-) (MAP kinase P38) (catokine suppressive anti-inflammatory drug binding protein) (CSAID binding protein) (CSBP) (MAX-interacting protein 2) (MAP kinase MX12)	A4k	0,975	0	0,552	0	0,613	0	0
L31951	stress-activated protein kinase JNK2 (EC 2.7.1.-) (C-JUN N-terminal kinase 2) (JNK-55)	A4m	0,946	0,41	0,643	0	0	0	0
U25265	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 5 (EC 2.7.1.-) (MAP kinase kinase 5) (MAPKK5) (MAPK/ERK kinase 5)	A5a	0,97	0	0,781	0,471	0,876	0	0,632
L05624	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1 (EC 2.7.1.-) (MAP kinase kinase 1) (MAPKK 1) (ERK activator kinase 1) (MAPK/ERK kinase 1) (MEK1)	A5b	0,789	0,553	0,768	0	1,057	0	0,589
Y10479	E2F-3	A5i	0,542	0	0	0	0	0	0
L23959	E2F-related transcription factor (DP-1)	A5k	0,703	0	0,694	0	0	0	0
X85134	RFBQ-3	A5m	0,704	0	0	0	0	0	0
AF001954	growth inhibitor p33ING1 (ING1)	A6a	0	0	0	0	0,681	0	0,623
X03484	RAF oncogene	A6e	0,934	0,954	0,98	0,637	0,869	0	0
M95712	raf,b-	A6f	0,635	0	0	0	0	0	0
Z29074	keratin, type I cytoskeletal 9 (cytokeratin 9) (K9) (CK 9)	A6j	0	0	1,026	0	0	0	0,45
M19156	keratin, type I cytoskeletal 10 (cytokeratin 10) K10) (CK 10)	A6k	0,81	0	0,791	0	0	0	0,526
M21772	keratin, type I cytoskeletal 16 (cytokeratin 16) (K16) (CK16) & pseudo-keratin K16 type I	A7a	0,91	0	1,055	0	0	0	0,694
M20336	keratin, type II cytoskeletal 1 (cytokeratin 1) (K1) (CK1) (67KD cytokeratin) (hair alpha protein)	A7d	0	0	1,176	0	0	0	0
M99063	keratin, type II cytoskeletal 2 oral (cytokeratin 2P) (K2P) (CK2P)	A7e	1,311	0	0	0	0	0	0
M21389	keratin, type II cytoskeletal 5 keratin, type II cytoskeletal 5 (cytokeratin 5) (K5) (CK5) (58 KD cytokeratin)	A7h	0	0	0	1,333	1,145	0	0
U59747	apoptosis regulator BCL-W	B1d	0	0	0,919	0	0	0	0
L08246	induced myeloid leukemia cell differentiation protein MCL-1 (ORF is at nt. 61-1053;ML)	B1e	0,797	1,242	0,65	0,649	0,594	0	0,583
U29680	BCL2-related protein A1 (BFL-1 protein) (hemopoietic-specific early response protein) (GRS protein)	B1f	0,858	0	0	0	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
U23765	BCL-2 homologous antagonist/killer (apoptosis regulator BAK)	B1h	0,967	0	0,649	0,845	0	0	0
AF015956	DAXX, a FAS-binding protein that activates JNK and apoptosis	B2b	0	0	0	0,616	0	0	0,831
U77845	TRAF-interacting protein (TRIP)	B2g	0,709	0,674	0,696	0,434	0,735	0	0,494
U66469	p53-dependent cell growth regulator CGR19	B2m	0,648	0	0	0	0	0	0
U69611	TNF-alpha converting enzyme	B4f	0,665	1,153	0	0	0	0	0
AF017988	secreted apoptosis related protein 3 (SARP3)	B4m	1,628	0	0	0	0	0	0
U33286	chromosome segregation gene homolog CAS	B5d	0,704	0,768	0	0	0	0	0
AF010309	Pig3 (PIG3)	B5g	0,61	0	0	0	0	0	0
AF010312	Pig7 (PIG7)	B5h	0,707	0	0,761	0,813	0,885	0	0
J02958	MET	B6h	1,208	1,117	1,106	0,98	1,345	0	1,017
X85133	RBQ1 retinoblastoma binding protein	B7d	0,657	0	0	0,56	0,754	0	0
M15990	YES	B7h	1,031	0	0,907	0	0	0	0
M35296	tyrosine-protein kinase ABL2 (EC 2.7.1.112) (tyrosine kinase ARG) (ABLL)	B7j	0,455	0	0	0	0	0	0
U18671									
M97934	signal transducer and activator of transcription 2 (P113) (STAT2)	B7m	0,606	0	0,804	0	0	0	0
X52221	DNA-repair protein complementing XP-D cells (xeroderma pigmentosum group D complementing protein) (DNA excision repair protein ERCC-2)	C2b	0,724	0	0,734	0	0,905	0	0
X90392	muscle-specific Dnase I-like [DNase XI] (XIB)	C2h	0	0	0,855	0,903	0	0	0
U07418	DNA mismatch repair protein MLH1 (mutL homolog)	C2i	1,15	0,774	0,725	1,004	0,456	0	0,834
L007540	activator 1 36KD subunit (replication factor C 36 KD subunit) (RFC36)	C2k	0	0	0	0	0,497	0	0
M87339	activator 1 37 KD subunit (replication factor C 37 KD subunit) (RFC37)	C2l	0	0,629	0	0	0	0	0
U95299	Notch4	C3i	1,011	0	0,675	0	0	0	0
L37882	frizzled	C4f	0	0	0	0	0,703	0	0
K03193	epidermal growth factor receptor precursor (EC 2.7.1.112). (EGFR) (ERBB1)	C5e	0,712	0	0	0	0	0	0
M60459	aerythroprotein receptor	C5i	0	0	0,978	0	0	0	0
Z24680	GARP	C5k	0	0	0,929	0	0,543	0	0
M37722	basic fibroblast growth factor receptor 1 precursor (BFGF-R) (EC 2.7.1.112) (FMS-like tyrosine kinase-2) (C-FGR) (FGFR1) (FLG) (FGFR) (FLT2). (HBGR-R-alpha-A1) (HBGF-R-alpha-A2) (HBGR-R-alpha-A3) + FGFR secreted form (M34188)	C6i	1,023	0,675	1,016	0	0,737	0	0,802
M14764	nerve growth factor receptor	C6j	0	0	0	0	0,786	0	0
X87852	sex gene	C6n	0,404	0	1,022	0	0	0	0
M32315	tumor necrosis factor receptor 2 precursor (tumor necrosis factor binding protein 2) (TBP1) (P80) (TNF-R2) (P75) (CD120B) (TNFR2) (TNFR)	C7h	0	0	0,744	0	0	0	0
M24857	retinoic acid receptor gamma [retinoic acid receptor gamma]	C7i	0,906	0	0	0	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
M84820	retinoic acid receptor rxr-beta [retinoic acid receptor RXR-beta]	C7m	0,955	0	0	0	0	0	0
X70904	LAM3AH (LAMA4)	D2f	0,559	0	0	0	0	0	0
M30269	nidogen	D2l	0,488	0	0	0	0,778	0	0
X14787	thrombospondin 1 precursor	D3c	0	0	1,248	0	0	0	0
L12350	thrombospondin 2 precursor	D3d	0,5	0	0	0	0	0	0
J02703	integrin beta3 [platelet membrane glycoprotein IIIA]	D4f	0,634	0	1,488	0	0	0	0
M62880	integrin beta7	D4j	0,642	0	0	0	0	0	0
U40282	Integrin-linked kinase (ILK)	D4m	0,718	0	1,438	1,26	1,139	0	0,685
X94991	Zyxin & Zyxin-2	D5b	0	0	0,852	0,735	0	0	0
U32907	P37NB	D5n	0,663	0	0	0	0	0	0
U60800	semaphorin (CD100)	D6b	0	0	0,837	0,584	0	0	0,558
U29343	hyaluronan receptor (RHAMM)	D6i	0	0	0,627	0	0	0	0
L04947	vascular endothelial growth factor receptor 2 precursor (EC 2.7.1.112) (VEGFR-2) (KDR) (kinase insert domain receptor) (fragment)	D6m	0	0	0,904	0	0	0	0
U48801	vascular endothelial growth factor B precursor (VEGF-B) + VEGF related factor isoform VRF-186 precursor	D7d	0	0	0	0,756	0	0	0,626
U43142	vascular endothelial growth factor C precursor (VEGF-C) (vascular endothelial growth factor related protein) (VRP) (FLT4 ligand)	D7e	0	0	0	0,902	0	0	0
U04806	SL cytokine precursor (FLT3/FLK2 ligand)	D7g	0	0	0,969	0	0	0	0
L03840	FRFR4	D7k	0,661	0	0,797	0	0,686	0	0,616
U11814	fibroblast growth factor receptor 2 precursor (FGFR-2) (EC 2.7.1.112) (keratinocyte growth factor receptor) (FGFR2) (BFR-1) (KSAM-1) & K-SAM; K-SAM-III; K-SAM-IV	D7l	0,58	0	0	0	0	0	0
J05070	MMP-9 (gelatinase B)	E1f	1,111	0	0	0	0	0	0
X75308	MMP-13 (collagenase-3)	E1j	0	0	0,934	0	0	0	0
M15476	urokinase-type plasminogen activator precursor (EC 3.4.21.73) (UPA) (U-plasminogen activator)	E2g	0,9	0	1,429	0	0	0	0
M15518	tissue-type plasminogen activator precursor (EC 3.4.21.68) (T-PA) (T-plasminogen activator)	E2h	3,314	0	0	0	0	0	0
U04441	low-density lipoprotein receptor-related protein 2 (megalin) (glycoprotein 330) (fragment)	E3a	0,827	0	0,624	0	0	0	0
M63959	alpha-2 macroglobulin receptor-associated protein precursor (alpha-2-MRAP) (low density lipoprotein receptor-related protein-associated protein 1) (RAP) (valign=top>	E3d	0	0,668	0,948	0	0,691	0	0
M64595	RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1 (P21-RAC2)	E4e	0	0	1,346	0	0	0	0
U82532	GDI-dissociation inhibitor RhoGDIgamma	E4k	0	0	0,783	0	0	0	0
U16296	T-lymphoma invasion and metastasis inducing TIAM1	E4l	0	0,403	0	0	0	0	0
U24153	p21-activated protein kinase (Pak2)	E5d	0	0,647	0	0	0	0	0
L34059	cadherin-4 retinal-cadherin precursor (R-cadherin) (R-CAD)	E5g	0	0	0	0,832	0	0	0

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
M74088	APC (DP2.5)	E6e	0,711	0	1,37	0	0	0	0
U49089	neuroendocrine-dlg (NE-dlg) a novel human homolog of the Drosophila discs large (dlg) tumor suppressor protein interacting with the APC protein	E6f	0,466	0,487	0,993	0	0	0	0,577
M77830	desmoplakin I	E6j	0,546	0,488	0,88	0	0	0	0,718
X56807	DSC2 mRNA for desmocollins type 2a and 2b	E7c	0,611	0,45	0	0	0	0	0
U26403	Ephrin-A5 precursor (EPH-related receptor tyrosine kinase ligand 7) 8lerk-7) (AL-1)	E7e	0,885	0,41	0	0	0	0	0
D30751	bone morphogenetic protein 4 (BMP-2B)	F1k	0	0	1,863	0	0,575	0	0
D13365	growth inhibitory factor (metallothionein-II) (MT-II)	F3h	0,434	0	0,876	0	0	0	0
M60718	hepatocyte growth factor precursor (scatter factor) (SF) (hepatopoeitin A)	F3m	0,43	0	1,036	0	0	0	0
A25270	IFN-gamma antagonist cytokine	F4b	0,843	0,734	0,895	1,019	0,502	0	0
M27544	IGF-1	F4c	0,599	0	0	0	0	0	0
A14844	interleukin IL-2	F4h	0	0	0,937	0	0	0	0
X04688	interleukin IL-5 (B cell differentiation factor 1) (T-cell replacing factor) (eosinophil differentiation factor)	F4k	0,491	0	0	0	0	0	0
J04156	interleukin IL-7	F4m	0,625	0	0	0	0	0	0
U14407	interleukin IL-15	F5g	0	0	0,793	0,805	0,482	0	0
U32659	interleukin IL-17	F5h	0	0	0	0,759	0,784	0	0
M28622	leukocyte interferon beta 1	F5j	1,188	0	1,058	2,563	3,038	0	0
X13967	LIF	F5m	0,787	0	0	0	0	0	0
M96956	TDGF1 (teratocarcinoma-derived growth factor 1) (epidermal growth factor-like cripto protein CR1) (cripto-1 growth factor) (CRGF) + TDGF (teratocarcinoma-derived growth factor 2) (epidermal growth factor-like cripto protein CR3) (cripto-3 GF) (CRGF) ...	F6k	0,459	0	0	0	0	0	0
J03241	TGF-beta3	F6m	0,772	0	0	0	0	0	0
X02812	transforming growth factor-beta	F7b	0,296	0	0	0	0	0	0
L07414	CD40	F7e	0,48	0	0	0,959	0,706	0	0
J03143	interferon-gamma receptor alpha chain	F7k	0,757	0	0	0	0	0	0
X72755	gamma interferon induced monokine [humig]	F7m	0,736	0	0	0	0	0	0

Tabelle 33: Genbanknummer, Name und Array-Position der Gene, die in allen Hybriden, aber nicht in AC1-1 exprimiert werden.

Genbank#	Name	Position	1M32	1M46	1M59	1M81	1M88	AC1-1	Jeg-3
U10564	WEE1-like protein kinase (EC2.7.1.112) (Wee1Hu)	A3j	0,766	1,224	0,96	1,021	0,975	0	0,75
X03484	RAF oncogene	A6e	0,934	0,954	0,98	0,637	0,869	0	0
L08246	induced myeloid leukemia cell differentiation protein MCL-1 (ORF is at nt. 61-1053;ML)	B1e	0,797	1,242	0,65	0,649	0,594	0	0,583
U77845	TRAF-interacting protein (TRIP)	B2g	0,709	0,674	0,696	0,434	0,735	0	0,494
J02958	MET	B6h	1,208	1,117	1,106	0,98	1,345	0	1,017
U07418	DNA mismatch repair protein MLH1 (mutL homolog)	C2i	1,15	0,774	0,725	1,004	0,456	0	0,834
A25270	IFN-gamma antagonist cytokine	F4b	0,843	0,734	0,895	1,019	0,502	0	0

Lebenslauf

Persönliche Daten :

Name: Ulrike Schmitz geb. Backes
Geburtsdatum: 15.03.1971
Geburtsort: Würselen
Eltern: Gerd Manfred Backes
Anna Maria Backes geb. Claßen
Familienstand: verheiratet, ein Kind
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1977 bis 1981 Besuch der katholischen Grundschule in Würselen/Broichweiden
1981 bis 1990 Besuch des städtischen Gymnasium Würselen

Hochschulstudium:

WS 1990/91 Studium der Musikwissenschaft an der Universität zu Köln
SS 1991 Chemiestudium an der RWTH Aachen
1991-1997 Biologiestudium an der RWTH Aachen
April 97 Diplom in Biologie

Berufstätigkeit:

Mai 97-Juli 97 Stipendiatin im Institut für Neurologie der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
August 97-
September 98 Wissenschaftliche Angestellte im Institut für Anatomie II der RWTH
Aachen im Rahmen eines von der DFG geförderten
Forschungsprojektes (Fr1245/3-1)
ab Oktober 98 Wissenschaftliche Angestellte im Institut für Anatomie II der RWTH
Aachen.