

Onkogene und Tumorsuppressorgene in Ovarialkarzinomen unter
besonderer Berücksichtigung des c-erbB-2 Onkogens

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Pathologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der
Medizinischen Fakultät Charité
Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dr. med. Kai Wiechen

geboren am 19. September 1965 in Kiel

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan der Medizinischen Fakultät Charité:

Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen

eingereicht am: 27. Februar 2001

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Dezember 2001

Abstract

Ovarian cancer is the most lethal cancer of the female genital tract due to the notorious lack of early symptoms and rapid initial peritoneal spreading of the disease. The majority of ovarian carcinomas are believed to arise from the ovarian surface epithelium by subsequent genetic alterations of oncogenes and tumor suppressor genes that have an important role in cell growth regulation.

In these studies, the function of the c-erbB-2 oncogene product and the insulin-like growth factor receptor I tyrosine kinases were analyzed in ovarian cancer cell lines. It is shown that these receptors are able to mediate functions in ovarian cancer cell lines that may increase tumor growth and tumor progression in vivo. The relevant functions enhanced are cell proliferation, transformation and tumor cell motility. Therefore, it may be possible to use the inhibition of receptor tyrosine kinases in future therapies of human ovarian cancer.

In addition, the alterations of gene expression between normal ovary and serous ovarian cancer were analyzed using micro-array techniques. In these experiments the caveolin-1 gene (CAV1) was identified as a candidate tumor suppressor gene in the ovary and in soft tissues. The CAV1 gene is probably in-activated in ovarian carcinomas and soft tissue sarcomas by epigenetic mechanisms rather by genetic mutations. As defined by the reversible down-regulation of CAV1, it is likely to be an important class II tumor suppressor gene. It may be possible to up-regulate the expression of class II tumor suppressor genes like CAV1 in ovarian cancer and soft tissue sarcomas to use its growth inhibitory properties for future therapies.

Keywords:

ovarian cancer, oncogene, suppressor gene, tyrosine kinase

Zusammenfassung

Ovarialkarzinome haben aufgrund fehlender Frühsymptomatik und rascher intra-peritonealer Ausbreitung eine sehr schlechte Prognose. Die Ausgangszellen für Ovarialkarzinome sind die Ovaroberflächenepithelien, die wahrscheinlich durch aufeinanderfolgende genetische Alterationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen mit einer zentralen Rolle bei der Wachstumsregulation, in Karzinomzellen transformiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion von zwei Rezeptortyrosinkinasen, des c-erbB-2 Onkogenproduktes und des Rezeptors für den insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor, in Ovarialkarzinomzellen analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, daß über diese Rezeptoren in Ovarialkarzinomzellen Funktionen vermittelt werden, die in vivo Tumorwachstum und Tumorprogression begünstigen können. Dies sind Zellproliferation, Transformation und Zellmotilität. Daher besteht vielleicht zukünftig die Möglichkeit die Hemmung dieser Rezeptortyrosinkinasen für die Therapie des Ovarialkarzinoms zu nutzen.

Weiterhin wurden Änderungen des Genexpressionsprofils zwischen Normalovar und Ovarialkarzinomen durch eine Microarray-basierte Technik untersucht. Aufgrund dieser Daten konnte das Caveolin-1 Gen (CAV1) als wahrscheinliches Tumorsuppressorgen in Ovar und Weichgewebe charakterisiert werden. Das CAV1 Gen ist in Ovarialkarzinomen und Sarkomen wahrscheinlich reversibel durch epigenetische Mechanismen abreguliert und nicht durch genetische Mutationen (sog. Klasse II Tumorsuppressorgen). Es könnte in Zukunft möglich sein, Klasse II Suppressorgene wie CAV1 in Ovarialkarzinomen und Sarkomen wieder zu exprimieren und die Hemmung des Zellwachstums therapeutisch zu nutzen.

Schlagwörter:

Ovarialkarzinom, Onkogen, Suppressorgen, Tyrosinkinase

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Analyse der differentiellen Genexpression zur Identifizierung von Onkogenen und Suppressorgen	3
2	Fragestellung	6
3	Material und Methoden	7
3.1	Normalgewebs- und Tumorproben	7
3.2	Verwendete Zelllinien	7
3.3	Funktionelle Zelluntersuchungen	8
3.4	Zusammenstellung von Protein- und Nukleinsäurenachweismethoden	11
3.5	Gentransfermethoden	15
4	Ergebnisse	17
4.1	c-erbB-2 anti-sense phosphorothioate oligodeoxynucleotides inhibit growth and serum-induced cell spreading of p185 ^{c-erbB-2} -overexpressing ovarian carcinoma cells.	17
4.2	Selection of a high activity c-erbB-2 ribozyme using a fusion gene of c-erbB-2 and the enhanced green fluorescent protein.	21
4.3	Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide down-regulation of the insulin-like growth factor I receptor in ovarian cancer cells.	25
4.4	Suppression of the c-erbB-2 gene product decreases transformation abilities but not the proliferation and secretion of proteases of SK-OV-3 ovarian cancer cells.	29
4.5	Involvement of the c-erbB-2 oncogene product in the EGF-induced cell motility of SK-OV-3 ovarian cancer cells.	32
4.6	Gene expression profiling of human ovarian carcinoma and identification of CAVEOLIN-1 as a tumor suppressor gene.	36
4.7	Down-Regulation of Caveolin-1, a Candidate Tumor Suppressor Gene, in Sarcomas.	37

5	Diskussion	42
5.1	Funktion von Rezeptortyrosinkinasen in Ovarialkarzinomen . . .	42
5.2	Rezeptortyrosinkinasen als therapeutische Zielmoleküle	45
5.3	Identifizierung von Caveolin-1 als Suppressorgen in Ovarialkarzi- nomen und Sarkomen	47
6	Zusammenfassung und Ausblick	50
A	Abkürzungen	63

Abbildungsverzeichnis

- 4.1 Wachstumshemmung von SK-OV-3 Ovarialkarzinomzellen durch ein c-erbB-2-spezifisches Antisense-sODN. Die Zellproliferation wurde mittels XTT-Assay (Firma Roche) bestimmt. Die sODNs (Antisense und Sense-Kontrolle) wurden in den angegebenen Konzentrationen für 5 Tage direkt zum Kulturmedium gegeben. 19
- 4.2 Hemmung der serum-induzierten Ausbreitung von SK-OV-3 Ovarialkarzinomzellen durch Ausschaltung des c-erbB-2 Genproduktes. Die Zellen wurden serumfrei mit c-erbB-2 Antisense-sODN ($5 \mu\text{M}$), einem monoklonalen Antikörper gegen p185^{c-erbB-2} (mAb 9G6, $10 \mu\text{g/ml}$) oder dem Tyrosinkinasehemmstoff Erbstatin ($10 \mu\text{M}$) inkubiert. Die Zellausbreitung wurde durch Zugabe von FKS (1 %) induziert. Die ausgebreiteten Zellen wurden nach 2 h ausgezählt (Auswertung von mindestens 200 Zellen). Als Kontrollen wurde unbehandelte Zellen oder mit Sense-sODN und unspezifischem IgG vorbehandelte Zellen mitgeführt. 20
- 4.3 Sequenz und Sekundärstruktur des c-erbB-2 Hammerhead-Ribozyms RZ631 mit Darstellung der Basenpaarung mit der c-erbB-2 mRNA. Die Spaltungsposition der c-erbB-2 mRNA ist durch einen Pfeil markiert. 22
- 4.4 Stimulation des Zellwachstums von NIH:OVCA-3 Ovarialkarzinomzellen durch den Wachstumsfaktor IGF-I und FKS. 26
- 4.5 Spezifität der Ausschaltung des IGF-IR in NIH:OVCA-3 Ovarialkarzinomzellen durch das IGF-IR Antisense-sODN und Effizienz der Lipofektin-verstärkten zellulären sODN-Aufnahme. Die Zellen wurden mit Antisense- oder Mismatch-Kontroll-sODN (100 nM) zusammen mit einem FITC-markierten Tracer-sODN (50 nM) co-transfiziert und durchflußzytometrisch analysiert (X-Achse: FITC-Signal des Tracer-sODNs, Y-Achse: Expression des IGF-IR, Markierung mit dem mAb $\alpha\text{IR-3}$ und R-Phycoerythrin). In den transfizierten Zellen ist das FITC-markierte Tracer-sODN in der Mehrzahl der Zellen nachweisbar, wobei die intrazelluläre Konzentration um mehr als den Faktor 100 variiert (Log-Skala!). Das IGF-IR Antisense-sODN vermindert die Menge des Rezeptorproteins auf 53 % der unbehandelten bzw. Mismatch-behandelten Zellen. 27

4.6	A, Mäßige Hemmung der basalen Wachstumsrate von NIH:OVCAR-3 Zellen durch ein IGF-IR Antisense-sODN ($3 \mu\text{M}$) und einen monoklonalen Antikörper gegen den IGF-IR ($\alpha\text{IR-3}$, $2 \mu\text{g/ml}$). B, ausgeprägte Wachstumshemmung durch das IGF-IR Antisense-sODN ($3 \mu\text{M}$) bei maximal durch IGF-I wachstumsstimulierten Zellen.	28
4.7	Spezifität der Ausschaltung von $\text{p185}^{\text{c-erbB-2}}$ durch den 'single chain' Antikörper scFv-5R. (Rechtes Panel) Starke Expression von $\text{p185}^{\text{c-erbB-2}}$ in SK-OV-3 Zellen und der Neo-Kontrolle. Starke Verminderung von $\text{p185}^{\text{c-erbB-2}}$ in Zellklonen mit einer Expression des scFv-5R. (Linkes Panel) Keine Beeinflussung der Expression des EGF-Rezeptors durch scFv-5R (Leere Peaks mit Kontrolle durch unspezifisches IgG).	31
4.8	A, Kein Einfluß von $\text{p185}^{\text{c-erbB-2}}$ auf die Zellproliferation in Gegenwart von 10% FKS. B und C, Starke Verminderung der Zellproliferation durch Ausschaltung des c-erbB-2 Onkogenproduktes bei Verminderung des Serumgehaltes auf 1% (B) bzw. bei Hemmung der Zellanheftung durch polyHEMA (C). Die Zellproliferation wurde mittels XTT-Assay (Firma Roche) bestimmt. . . .	33
4.9	Vermittlung der EGF-induzierten Zellmotilität durch $\text{p185}^{\text{c-erbB-2}}$ in SK-OV-3 Ovarialkarzinomzellen. Die Zugabe von EGF (100 ng/ml) führt bei SK-OV-3 Zellen bzw. bei Neo-Kontrollzellen (linkes Panel) nach 6 h zur Ausbildung von Pseudopodien und zu einer deutlichen Zelldissoziation (Scatter-Effekt). Die Ausschaltung von $\text{p185}^{\text{c-erbB-2}}$ in 2 scFv-5R-exprimierenden Zellklonen führt zu einer starken Hemmung der EGF-Induzierten Zellmotilität (mittleres und rechtes Panel).	35

- 4.10 Immunhistologische Analyse der Caveolin-1 Expression in Ovargewebe und Ovarialtumoren. (A), starke Expression von Caveolin-1 im Oberflächenepithel und Stroma von Normalovargewebe. (B), Erhaltene Caveolin-1-Expression im Epithel von serösen Adenomen. (C), Verminderung der Expression in hochdifferenzierten serös-papillären Karzinomen. D, Expressionsverlust in niedrigdifferenzierten serösen Karzinomen. Caveolin-1 ist in benignen Ovar epithelien (A und B) vorwiegend an der basalen und lateralen Zellmembran lokalisiert. In hochdifferenzierten Karzinomen findet sich eine schwache zytoplasmatische Expression von Caveolin-1 (C). Mesenchymale Zellen wie Endothelien, glatte Muskelzellen und Adipozyten zeigen eine starke Expression von Caveolin-1 (Caveolin-1-positive Kapillare in D als endogene Positivkontrolle). 38
- 4.11 Expression von Caveolin-1 in mesenchymalem Gewebe, benignen mesenchymalen Tumoren und Sarkomen. A-C, Benigne mesenchymale Tumoren (A Fibromatose, B Leiomyom, C Lipom). D-G, Expressionsverlust in Sarkomen (D Fibrosarkom, E Leiomyosarkom, F Myxoides Liposarkom, G MFH). H, Erhaltene Caveolin-1-Expression in einzelnen Sarkomen (hier MFH). I, Mesenchymales Normalgewebe (Endothelien und glatte Muskulatur des Magens). 40
- 4.12 Hemmung der Koloniebildung von HT-1080 Fibrosarkomzellen durch heterologe Expression von Caveolin-1 in zwei unabhängigen Experimenten. Die HT-1080 Zellen wurden mit einem Caveolin-1-Expressionsvektor oder dem leeren Vektor (pLNHX) als Kontrolle transfiziert und anschließend mit G418 selektiert. G418-resistente Kolonien wurden nach 10 Tagen fixiert, angefärbt und ausgezählt. 41

Tabellenverzeichnis

- 3.1 Antikörper und Verdünnungen für die verschiedenen Anwendungen. Abkürzungen; poly, polyklonales Antiserum, IHC, Immunhistochemie, WB, Western Blot, CYT, Durchflußzytometrie. . . . 12
- 4.1 Zielsequenzen der in-vitro untersuchten c-erbB-2-Hammerhead-Ribozyme. Die Nummerierung der Ribozyme erfolgte nach der Genbank Nr. X03363. Die Nummer bezeichnet die Position der ersten Base des NUX Motivs (unterstrichen). Das Ribozym RZ631 zeigte die stärkste Spaltungsaktivität im zellfreien System und wurde in den pol III RNA-Expressionsvektor pCVA inkloniert. . . 23

1 Einleitung

Ovarialkarzinome haben aufgrund fehlender Frühsymptomatik und rascher intra-peritonealer Ausbreitung eine sehr ungünstige Prognose und sind die führende Todesursache durch gynäkologische Tumoren in Westeuropa [37]. Ausgangspunkt der Ovarialkarzinome ist letztlich das flache Oberflächenepithel des Ovars. Ovarialkarzinome entstehen wahrscheinlich durch aufeinanderfolgende genetische Alterationen einer Vielzahl von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, die eine wichtige Rolle bei der normalen Wachstumsregulation der Oberflächenepithelzellen spielen.

Für Ovarialkarzinome existieren nur relativ wenige Daten über die beteiligten Onkogene und Tumorsuppressorgene. In einem Teil der Ovarialkarzinome ist eine Überexpression der Genprodukte des c-erbB-2 (HER-2/neu) und des c-MET Onkogens nachgewiesen worden [26], [21]. Diese Onkogene kodieren für Wachstumsfaktorrezeptor-ähnliche Tyrosinkinasen. Häufig sind weiterhin Mutationen des K-RAS Onkogens in Ovarialkarzinomen nachgewiesen worden [46]. Zusätzlich ist die Überexpression oder Genamplifikation von Effektoren von Signalwegen stromabwärts von RAS wie Phosphatidyl-inositol 3-Kinase (PI3K) und der PI3K-regulierten Kinase AKT2 in einem Teil der Ovarialkarzinome nachgewiesen worden [39], [7]. Das p53 Tumorsuppressorgen ist bei ungefähr der Hälfte der fortgeschrittenen Ovarialkarzinome mutiert oder deletiert [46].

Die Mutationen der genannten Onkogene führt zu einer konstitutiven Aktivierung von Signalwegen, die über eine Aktivierung von nukleären Transkriptionsfakto-

ren letztlich die Tumorpheriferation und das Tumorzellüberleben (Apoptoseinhibition) fördern. Weiterhin werden durch die verstärkte Expression von Proteasen, die die Extrazellulärmatrux auflösen und eine verstärkte Neovaskularisation durch angiogenese-fördernde Proteine, Invasion und und Tumorpherwachstum im Gesamtorganismus erst ermöglicht [33], [49].

[27]. Klinische Studien ergaben, daß die Überexpression von c-erbB-2 bei Ovarialkarzinomen einen unabhängigen und prognostisch ungünstigen Faktor darstellt [27]. Das c-erbB-2 Genprodukt (p185^{c-erbB-2}) ist ein Tyrosinkinaserzeptor mit einer hohen Strukturhomologie zum Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF Rezeptor) und den Genprodukten der c-erbB-3 und c-erbB-4 Gene [16]. Die heterologe Überexpression von c-erbB-2 in NIH:3T3 Mausfibroblasten führt zu einer zellulären Transformation mit Veränderungen der Zellmorphologie, anheftungsunabhängigem Wachstum in Weichagar und Tumorpherinduktion in der Nacktmaus [20]. In Mammakarzinomzellen erhöht eine Überexpression von c-erbB-2 die Expression von 72 kDa und 92 kDa Matrixmetalloproteasen und konsekutiv die Metastasierung im Mausmodell [45]; nicht jedoch die zelluläre Transformation wie in Mausfibroblasten. Weiterhin ist p185^{c-erbB-2} in Mammakarzinomzellen der Ratte in Mikrovilli und Pseudopodien lokalisiert [6]. Diesen Strukturen wird eine wichtige Bedeutung für die zelluläre Morphologie und Motilität zugeschrieben. In Übereinstimmung mit diesen morphologischen Befunden zeigen Mammakarzinomzellen in der Gewebekultur eine über p185^{c-erbB-2} vermittelte rasche Ausbreitung und Bewegung auf einen chemotaktischen Stimulus hin [10]. Zusammengefaßt sprechen die aufgeführten klinischen und experimen-

tellen Daten dafür, daß tumorprogressionsfördernde zelluläre Funktionen über p185^{c-erbB-2} vermittelt werden. Diese Funktionen sind jedoch wahrscheinlich zell- oder speziesspezifisch [62], [45], so daß die genannten Ergebnisse nicht direkt auf humane Ovarialepithelzellen übertragbar sind.

Um die Funktion von Onkogenen aus der Familie der Rezeptortyrosinkinasen in Ovarialkarzinomzellen zu analysieren, wurden diese Onkogene in Zellkultursystemen supprimiert und der Effekt auf Zellproliferation, Transformation und Zellmotilität gemessen. Näher untersucht wurde das c-erbB-2 Onkogenprodukt und der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-I Rezeptor (IGF-IR). Zur Ausschaltung dieser Rezeptoren wurden gegen die mRNA gerichtete Antisense- und Ribozymstrategien und im Fall des c-erbB-2 Onkogens ein intrazellulär exprimierter 'single chain' Antikörper eingesetzt um das Rezeptorprotein intrazellulär zu retinieren.

1.1 Analyse der differentiellen Genexpression zur Identifizierung von Onkogenen und Suppressorgenen

Die Überexpression des c-erbB-2 Onkogens ist bei Ovarialkarzinomen zwar grundsätzlich häufig zu beobachten [27]. Die Frequenz der c-erbB-2 Überexpression ist bei den verschiedenen histologischen Subtypen von Ovarialkarzinomen jedoch deutlich unterschiedlich. Das c-erbB-2 Onkogen ist am häufigsten bei serösen Ovarialkarzinomen überexprimiert [27]. Andere histologische Subtypen des Ovarialkarzinoms haben hingegen oft Alterationen anderer Onkogene. So finden sich häufig bei muzinösen Ovarialkarzinomen Mutationen des K-RAS On-

kogens [46]. Bei den bekannten Onkogenen im Ovarialkarzinom handelt es sich um Wachstumsfaktorrezeptoren wie das c-erbB-2 Onkogenprodukt oder um zentrale Schaltmoleküle von Signalwegen wie K-RAS. Daher werden möglicherweise durch Mutationen unterschiedlicher Onkogene bei verschiedenen Ovarialkarzinomtypen die gleichen Signalwege permanent aktiviert und Zielgene auf- und abreguliert, die für die tumorzell-spezifischen Veränderungen wie erhöhte Proliferation, Apoptosehemmung, Metastasierungsfähigkeit und Angiogenese verantwortlich sind.

Daher ist zum genaueren Verständnis der Entstehung und Progression von Ovarialkarzinomen eine Erfassung der tumor-spezifischen Alterationen der Genexpression notwendig. Zu diesem Zweck wurden in den letzten Jahren Techniken für eine massiv-parallele Analyse der Genexpression entwickelt. Diese umfassen die serielle Analyse der Genexpression [50], die 'Differential display PCR' [25], PCR-basierte cDNA Subtraktionstechniken [11] und die Hybridisierung auf Microarrays [5]. Bei der PCR-basierten cDNA Subtraktion werden grundsätzlich zwei zu vergleichende mRNA/cDNA Populationen (zum Beispiel aus zwei Zelllinien oder zwei Geweben) aufeinander hybridisiert. Dabei werden differentiell exprimierte mRNAs/cDNAs angereichert. Mit dieser Technik ist die Identifizierung bisher unbekannter differentiell exprimierter Gene möglich. Microarray-basierte Techniken beruhen auf der Hybridisierung von mRNA/cDNA-Populationen auf einen Träger (Nylonmembran oder Glas) auf dem cDNA-Fragmente immobilisiert sind. Durch einen Vergleich der Hybridisierungsmuster von zwei mRNA/cDNA-Populationen können grundsätzlich bereits bekannte Gene bzw. cDNAs identifi-

ziert werden.

Um Alterationen der Genexpression bei Ovarialkarzinomen zu erfassen wurde die Genexpression in Normalovargewebe mit der von serösen Ovarialkarzinomen durch eine Kombination von subtraktiver Hybridisierung und Microarray-Hybridisierung verglichen. Dieser Teil der Studie wurde in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Schäfer und Dr. C. Sers (Institut für Pathologie der Charité) und der Arbeitsgruppe von L. Diatchenko (Clontech Laboratories, Palo Alto) durchgeführt. Die Arrayhybridisierungen und die Auswahl der Zielgene wurde hierbei von Dr. C. Sers durchgeführt. Zur Validierung der differentiellen Expressionsdaten wurde die Genexpression im Rahmen eigener Projekte mittels Immunhistologie in zahlreichen Proben von Normalovar, benignen Ovarialtumoren und Ovarialkarzinomen bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression in Zelllinien durch Western Blot gemessen. Im Karzinom gegenüber dem Normalgewebe aufregulierte Gene fördern möglicherweise das Tumorwachstum (z.B. als Onkogene, Angiogenesefaktoren oder Proteasen). Gene die im Karzinom abreguliert sind, stellen mögliche Suppressorgene dar. Um eine mögliche tumorfördernde oder suppressive Funktion zu beweisen, wurde daher die Funktion eines differentiell exprimierten Genes abschliessend im Zellkulturmodell analysiert.

2 Fragestellung

1. Im Rahmen des Projektes sollte die Funktion von Onkogenen aus der Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen, unter besonderer Berücksichtigung des c-erbB-2 Onkogenproduktes, in Ovarialkarzinomzellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Rezeptortyrosinkinasen transient durch spezifische Antisense- und Ribozymstrategien gegen die mRNA und im Falle des c-erbB-2 Onkogens stabil durch intrazelluläre Expression eines 'single-chain'-Antikörpers gegen p185^{c-erbB-2} ausgeschaltet. In Zellkulturexperimenten wurde der Einfluß der Rezeptortyrosinkinasen auf das anheftungsabhängige und -unabhängige Wachstum, die Expression von Proteasen und die Zellmotilität untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluß der Expression von c-erbB-2 auf die Funktion des nahe verwandten EGF-Rezeptors analysiert.
2. Zur Identifizierung bisher unbekannter Onkogene und Tumorsuppressorgene in Ovarialkarzinomen wurde die Genexpression zwischen Normalovar- und Karzinomgewebe verglichen. Die differentiellen Expressionsdaten wurden sowohl auf der mRNA-Ebene durch Blothybridisierungen als auch auf der Proteinebene durch immunhistologische Untersuchungen an Tumor- und Normalgewebeproben verifiziert. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde ein Expressionsverlust von Caveolin-1 in Ovarialkarzinomen und zusätzlich in Sarkomen nachgewiesen. Daher wurde in zwei Studien analysiert, ob Caveolin-1 in Ovarialkarzinomen und Sarkomen ein Tumorsuppressor ist.

3 Material und Methoden

3.1 Normalgewebs- und Tumorproben

Die Gewebsproben wurden für die histopathologische Routinediagnostik in 10% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Bei den Ovarproben handelt es sich um Resektate, die an der Charité am Campus Mitte und Wedding operiert wurden. Die Sarkome wurden an der Robert-Rössle Klinik (Campus Berlin-Buch) operiert. Zur Klassifikation der Ovarial- und Weichgewebstumoren wurde die aktuelle WHO-Klassifikation benutzt.

Die molekularpathologischen Untersuchungen und Western Blot Analysen erfolgten an tiefgefrorenem Tumor- und Normalgewebe. Dazu wurde Gewebe von Ovar- und Weichgewebstumoren unmittelbar nach der Operation oder während der Schnellschnittuntersuchung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2 Verwendete Zelllinien

Die Untersuchungen wurden zunächst an den gut charakterisierten Ovarialkarzinomzelllinien SK-OV-3 und NIH:OVCAR-3 durchgeführt. Die SK-OV-3 Zelllinie zeichnet sich durch eine starke Überexpression des c-erbB-2 Onkogens aus [62], während NIH:OVCAR-3 Zellen (freundlicherweise von C. Marth, Innsbruck zur

Verfügung gestellt) keine c-erbB-2 Überexpression aufweisen. Die Zellen wurden routinemäßig in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) und 2 mM Glutamin propagiert.

Für die Experimente zur Überprüfung differentiell exprimierter Gene in Ovarialkarzinomen wurden ergänzend die etablierten Ovarialkarzinomzelllinien OAW-42, MDAH 2774, ES-2 und CaOV-3 wie oben beschrieben propagiert. Zusätzlich wurde bei diesen Experimenten eine immortale Ovariepithelzelllinie ('human ovarian surface epithelium', HOSE) in einem 1:1 Gemisch von Medium 199 und MCDB105-Medium kultiviert. Diese Zelllinie ist im Tiermodell im Gegensatz zu den oben genannten Ovarialkarzinomzelllinien nicht tumorbildend und diente als Zelläquivalent zum normalen Ovaroberflächenepithel. Als Zellkulturmodell für normale mesenchymale Zellen diente die humane SV40-immortalisierte Fibroblastenzelllinie IMR-90; als Sarkomäquivalent die Fibrosarkomzelllinie HT-1080.

Gentechnisch veränderte Zelllinien (Abschnitt 3.5) wurden in DMEM mit dem entsprechenden Selektiv-Antibiotikum propagiert (meistens Geneticin, G418), um einem Expressionsverlust der eingebrachten cDNA vorzubeugen.

3.3 Funktionelle Zelluntersuchungen

Proliferationsassays

Zur Messung der Zellproliferation wurden zum Teil ein Verfahren mit Auszählung der absoluten Zellzahl [28] angewendet. Diese Technik eignet sich beson-

ders für die Messung der Zellproliferation in größeren Zellkulturschalen (12-Well Schalen) und unter serumfreien Zellkulturbedingungen bei denen die Zellen gegenüber Manipulationen wie dem Zufügen von Substanzen sehr empfindlich sind. Nachteilig an dieser Technik ist der sehr hohe Aufwand der Auszählung mit einem Hämocytometer. Daher wurden ansonsten colorimetrische Techniken im Mikrotiterplattenformat (96-Well) eingesetzt. Bei dieser Technik wird ein Farbreagenz (XTT, Firma Roche) durch mitochondriale Dehydrogenasen der Zellen in einen Formazanfarbstoff umgesetzt und die Extinktion im Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Die Extinktion des Formazanfarbstoffs ist innerhalb eines bestimmten Extinktionsbereiches proportional zur Zellzahl.

Gemessen wurde die Proliferation im Zellmonolayer auf unbeschichteten Zellkulturschalen. Zusätzlich wurde die anheftungsunabhängige Zellproliferation als Ausdruck der onkogenen Transformation gemessen. Zu diesem Zweck wurden Mikrotiterplatten mit der Substanz Poly(2-hydroxyethyl methacrylat) (polyHEMA) beschichtet [15]. Diese Beschichtung verhindert die Anheftung und Ausbreitung der Zellen. Ausschließlich transformierte Zellen und somit Tumorzellen wachsen auf dieser Oberfläche in Kolonien. Die Auswertung erfolgte wie oben beschrieben mittels XTT-Reagenz. In sämtlichen Experimenten wurden entsprechende Leerwert- und Lösungsmittelkontrollen mitgeführt. In einigen Studien wurde die Bildung stabil exprimierender Zellkolonien nach Transfektion eines Expressionsvektors und Antibiotikaselektion als Ausdruck der Zelltransformation gemessen (Abschnitt 3.5).

Messung der Zellmotilität

Die Steuerung der Zellmotilität über das c-erbB-2 Onkogenprodukt in Ovarialkarzinomzellen wurde mit qualitativen und quantitativen Assays nachgewiesen. Die qualitativen Techniken beruhen auf der photographischen morphologischen Analyse der ausplattierten und behandelten bzw. gentechnisch veränderten Ovarialkarzinomzellen. Hinweise für eine erhöhte Zellmotilität in der Zellkultur sind eine beschleunigte Zellausbreitung mit Ausbildung pseudopodienähnlicher Zellorganellen [53] und eine rasche wachstumsfaktor-induzierte Zelldissoziation [54]. Diese wachstumsfaktor-induzierte Zelldissoziation wurde für den Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) als Scatter-Effekt beschrieben [18]. Zur quantitativen Messung der Beeinflussung der Zellmotilität durch Rezeptortyrosinkinasen und Wachstumsfaktoren wurden modifizierte Boydenkammerassays durchgeführt. Hierbei handelt es sich um Einsätze für Zellkulturschalen mit einer Membran definierter Porengröße. In diesen Einsatz werden die Zellen plattiert. In das untere Reservoir wurde ein Wachstumsfaktor als chemotaktischer Stimulus zugegeben. Die durchgewanderten Zellen wurden fixiert, mit Kristallviolett gefärbt und ausgezählt.

3.4 Zusammenstellung von Protein- und Nukleinsäurenachweismethoden

Immunhistologie

2 μ m dicke Schnitte von formalin-fixierten und paraffin-eingebetteten Tumorproben wurden mit Xylol entparaffiniert, rehydriert und zur Antigendemaskierung in einem handelsüblichen Schnellkochtopf in 10 mM Na-citratpuffer, pH 6,0, für 5 min gekocht und für 20 min abgekühlt. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Antigendetektion mit einem kommerziell erhältlichen Kit (Vectastain ABC-AP Kit der Firma Vector Laboratories) durchgeführt. Die Schnitte wurden in Mayers Hämalaun gegengefärbt und eingedeckt. Zur Dokumentation wurden die immunhistologischen Präparate mit einer digitalen Olympus DP-10 Mikroskopkamera aufgenommen.

Als primärer Antikörper zur Detektion von Caveolin-1 in Ovar- und Weichgeweben wurde der monoklonale Antikörper Klon 2297 (Transduction Laboratories) eingesetzt [35]. Dieser Antikörper detektiert ein Epitop im N-terminalen Bereich des Caveolin-1 Proteins. In der Spezifitätskontrolle im Western Blot (Abschnitt 3.4) erkannte dieser Antikörper ausschließlich die 24 kDa α - und die 22 kDa β -Isoformen von Caveolin-1. In jedem Färbeexperiment wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt und ausgewertet. Als Positivkontrollen für Caveolin-1 wurden normale mesenchymale Zellen, die eine starke endogene Expression aufweisen (Endothelien, glatte Muskelzellen und Adipozyten) bewertet. Der Caveolin-1 Primärantikörper wurde so titriert (Verdünnung 1:500), daß bei regelhafter Sen-

Antikörper			Verdünnung		
Spezifität	Klon	Hersteller	IHC	WB	CYT
c-erbB-2	A 0485 (poly)	Dako		1:750	
c-erbB-2	TA-1	Oncogene Science			1:500
EGF-Rezeptor	R.1	Oncogene Science			1:10
IGF-I Rezeptor	α IR-3	Oncogene Science			1:20
Caveolin-1	2297	Transduction Laboratories	1:500	1:1000	
Actin	C4	Roche		1:5000	
IgG1	X 0931	Dako	1:500		
	Isotypkontrolle für Caveolin-1 Klon 2297				

Tabelle 3.1: Antikörper und Verdünnungen für die verschiedenen Anwendungen. Abkürzungen; poly, polyklonales Antiserum, IHC, Immunhistochemie, WB, Western Blot, CYT, Durchflußzytometrie.

sitivität ein mittelstarkes Färbesignal bei normalen mesenchymalen Zellen nachweisbar war. Als Negativkontrolle wurden Gewebeschnitte mitgeführt in denen Caveolin-1-negative Epithelien enthalten waren (Darmepithel, Gangepithel der Brustdrüse). Das immunhistologische Detektionssystem wurde zusätzlich mit einem nicht-immunen Kontrollantikörper derselben Spezies und desselben Isotyps (Maus IgG1, Klon X 0931, Firma Dako) überprüft. Eine Liste aller eingesetzten Antikörper mit den Verdünnungen für die verschiedenen Anwendungen zeigt Tabelle 3.1.

Western Blot

Der sensitive Proteinnachweis mittels Western Blot-Analyse wurde prinzipiell wie bereits früher beschrieben [56] an Lysaten von Zellkulturen und lysiertem Tumorgewebe durchgeführt. Die Lyse-Reaktion von Zellen und Geweben wurde

in allen Fällen mit Zugabe von Proteaseinhibitoren durchgeführt, um eine unspezifische Degradation des Zielproteins zu vermeiden. Die Proteine wurden auf einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden ausschließlich polyklonale und monoklonale Antikörper eingesetzt (p185^{c-erbB-2}, Caveolin-1, Actin zur Beladungskontrolle), die das Zielprotein hochspezifisch mit dem korrekten Molekulargewicht detektierten. Als Primärantikörper für p185^{c-erbB-2} wurde ein polyklonales Antiserum gegen den C-terminalen cytosolischen Anteils des Rezeptors benutzt (Verdünnung 1:750, A 0485, Firma Dako). Zur Detektion von Caveolin-1 wurde wie in der Immunhistologie (Abschnitt 3.4) der monoklonale Antikörper Klon 2297 (Verdünnung 1:1000) verwendet. Zur Kontrolle der Beladung von Western Blots wurde nach Entfernen des ersten Primärantikörpers in einem sauren SDS-Puffer ein monoklonaler Antikörper gegen Actin (Klon C4, Firma Roche) in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt.

Durchflußzytometrie

Durchflußzytometrische Techniken wurden zum einen zum Nachweis von Oberflächenrezeptoren, zweitens zur Kontrolle der zellulären Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Antisense-Oligodeoxynukleotiden und zum intrazellulären Nachweis von fluoreszierenden Proteinen ('Enhanced green fluorescent protein', EGFP) eingesetzt. Zum Nachweis von Wachstumsfaktorezeptoren wurden die adhäsiv wachsenden Karzinomzellen durch Trypsin abgelöst und vital mit den spezifischen Antikörpern markiert. Dadurch wurde eine unspezifische Diffusion der Antikörper

in das Zellinnere verhindert. Eingesetzt wurden monoklonale Antikörper gegen die Extrazellulärdomänen des IGF-I-Rezeptors (Klon α IR-3), des EGF-Rezeptors (Klon R.1) und des c-erbB-2 Onkogenproduktes (Klon TA-1, alle Antikörper für die Durchflußzytometrie von der Firma Oncogene Science).

Von besonderer Bedeutung war die Anwendung dieser Technik bei der selektiven Ausschaltung der Funktion der c-erbB-2 Onkogenproduktes durch einen intrazellulär exprimierten 'Single chain' Antikörper [55], [54]. Bei dieser Technik wurde das c-erbB-2 Genprodukt im Zytosol der Zelle retiniert und nicht mehr in die Zellmembran integriert. Da die so veränderten Zellen weiterhin die c-erbB-2 mRNA und das Protein bilden, war ein Nachweis der Effizienz der c-erbB-2 Ausschaltung durch eine Blottechnik hier nicht möglich.

Northern Blot

Gesamt-RNA aus lysierten Zellen wurde auf denaturierenden Agarose- oder Polyacrylamidgelen nach der Größe aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Als spezifische Sonden zur Detektion der mRNA des IGF-I Rezeptors und von heterolog exprimierter Ribozym-RNA wurden komplementäre ^{32}P -markierte cDNA-Sonden auf die Blotmembranen hybridisiert und diese autoradiographisch ausgewertet. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen RNA-Beladung wurden die Gele mit Ethidiumbromid angefärbt oder nach Ablösung der ersten Sonde mit einer cDNA-Sonde eines ubiquitär exprimierten Genes (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, GAPDH) hybridisiert.

3.5 Gentransfermethoden

Transfektion

Methoden zur Transfektion von Nukleinsäuren wurden eingesetzt, um eine transiente Genexpression oder eine verstärkte Aufnahme von Antisense-Oligodeoxynukleotiden im Zellkulturmodell zu erzielen. Dazu wurden die Nukleinsäuren (auf Quiagen-Säulen gereinigte Expressionsplasmide oder HPLC-gereinigte Oligodeoxynukleotide) mit Kalziumphosphat oder kationischen Lipiden (LipofektinTM von der Firma Gibco oder in späteren Experimenten FugeneTM der Firma Roche) komplexiert und zu den Zellen gegeben. Die transiente Genexpression bzw. die Nukleinsäureaufnahme wurde durchflußzytometrisch (Abschnitt 3.4) anhand eines co-transfizierten fluoreszierenden Reportergens (EGFP) oder anhand von FITC-markierten Oligonukleotiden überprüft.

Retroviraler Gentransfer

Das in SK-OV-3 Ovarialkarzinomzellen stark überexprimierte c-erbB-2 Onkogenprodukt wurde durch intrazelluläre Expression eines c-erbB-2-spezifischen 'single chain' Antikörpers (scFv-5R) ausgeschaltet [55], [54]. Die cDNA des scFv-5R wurde von der Arbeitsgruppe von N. Hynes (Friedrich Miescher Institut, Basel) konstruiert und uns zur Verfügung gestellt. Um eine effiziente und stabile Expression des c-erbB-2-spezifischen scFv-5R in SK-OV-3 Zellen zu erreichen, wurden diese mit einem entsprechenden rekombinanten Retrovirus infiziert.

Retrovirale Expressionsvektoren enthalten das zu exprimierende Gen, einen selektierbaren Marker, den retroviralen Promoter (im 5'-'long terminal repeat', 5'-LTR), das retrovirale Verpackungssignal (ψ -site) und das zu exprimierende Gen. Aus dem retroviralen Vektor sind die retroviralen Proteine *env* ('envelope' kodiert für die Wirtsspezifität) und *gag-pol* (kodiert u.a. für die Reverse Transkriptase) entfernt. Zur Bildung von infektiösen Viruspartikeln aus dem Expressionsvektor wird der Plasmidvektor daher zunächst in eine sogenannte Verpackerzelllinie wie in Abschnitt 3.5 beschrieben transfiziert. Diese Verpackerzelllinie exprimiert die Proteine *env* und *gag-pol*. Dadurch werden aus dem Expressionsvektor infektiöse Retroviruspartikel gebildet und in den Mediumüberstand abgegeben. In den vorliegenden Studien wurde die Verpackerzelllinie ϕ NX-ampho eingesetzt, die von der Arbeitsgruppe von G.P. Nolan (Stanford University School of Medicine) konstruiert und uns zur Verfügung gestellt wurden. Die ϕ NX-ampho Verpackerzelllinie eignet sich zur Erzeugung von amphotropen Retroviren, die humane SK-OV-3 Ovarialkarzinomzellen infizieren können. Die gebildeten Retroviruspartikel enthalten jedoch selbst keine Gene für *env* oder *gag-pol* und werden somit von den infizierten SK-OV-3 Zellen nicht gebildet oder weiter verbreitet (replikationsinkompetente Retroviren).

4 Ergebnisse

4.1 c-erbB-2 anti-sense phosphorothioate oligodeoxynucleotides inhibit growth and serum-induced cell spreading of p185^{c-erbB-2}-overexpressing ovarian carcinoma cells.

K. Wiechen and M. Dietel

Publiziert in: Int. J. Cancer 63; 1995: 604-608

Ziel der Studie war die transiente Ausschaltung des c-erbB-2 Onkogenproduktes in SK-OV-3 Ovarialkarzinomzellen durch Antisense-Oligodeoxynukleotide. Kurze Oligonukleotide mit einer Länge bis ungefähr 30 Basen werden von Zellen aktiv aufgenommen. Antisense-Oligonukleotide hybridisieren dann spezifisch mit der komplementären RNA. Die RNA bzw. das translatierte Protein werden durch direkte Störung der Translation ausgeschaltet. Zusätzlich aktivieren RNA/Phosphorothioat-DNA-Hybride endogene RNase H, wodurch die gebundene RNA des Hybrids degradiert wird [52].

Eingesetzt wurden nuklease-resistente Phosphorothioat-Oligodeoxynukleotide (sODNs), die direkt zum Zellkulturmedium in Konzentrationen bis zu 5 μM gegeben wurden. Die maximale Konzentration von 5 μM für sODNs in der Zellkultur ist durch unspezifische Wachstumshemmung bei höheren Konzentrationen bedingt, die durch Wechselwirkungen mit DNA- und RNA-Polymerasen zustande kommt

[51]. Zur spezifischen Ausschaltung der *c-erbB-2* mRNA wurde ein 18 Nukleotide langes Antisense-sODN gegen eine Region der mRNA 33 Basenpaare stromabwärts des AUG-Startcodons konstruiert. Die Region in der Nähe des Startcodons wurde gewählt, da dieser Bereich einer mRNA als Insertionspunkt für den Translationskomplex wahrscheinlich frei von RNA-Sekundärstrukturen und somit für eine sODN-Hybridisierung verfügbar ist. Als Kontrolle wurde das komplementäre Sense-sODN eingesetzt.

Die Zugabe des *c-erbB-2* Antisense-sODNs supprimierte in SK-OV-3 Zellen die Menge des Genproduktes $p185^{c-erbB-2}$ in der Western Blot Analyse deutlich. Diese Verminderung von $p185^{c-erbB-2}$ ging mit einer geringen Wachstumshemmung der SK-OV-3 Zellen von 60% gegenüber der Sense-sODN-Kontrolle bei 5 μ M einher (Abbildung 4.1).

Die Überexpression von $p185^{c-erbB-2}$ verstärkt die Motilität von Mammakarzinomzellen, wobei dieser Effekt durch ein nicht genau charakterisiertes sezerniertes Protein vermittelt wird [10]. Um einen möglichen Einfluß von $p185^{c-erbB-2}$ auch auf die Motilität von Ovarialkarzinomzellen zu erfassen wurden SK-OV-3 Zellen serumfrei ausplattiert. Die Zellmotilität, die Zellanheftung und -ausbreitung ist von Wachstumsfaktoren abhängig. SK-OV-3 Zellen bleiben unter serumfreien Bedingungen sphärisch und nicht-angeheftet auf den Zellkulturoberflächen liegen. Die Zugabe von fetalem Kälberserum (FKS) führt dosisabhängig zu einer raschen Zellanheftung, der Ausbildung von pseudopodienartigen Zellfortsätzen und zur Zellausbreitung (Abbildung 4.2). Die Suppression von $p185^{c-erbB-2}$ durch das Antisense-sODN führt zu einer kompletten Hemmung der Zellaus-

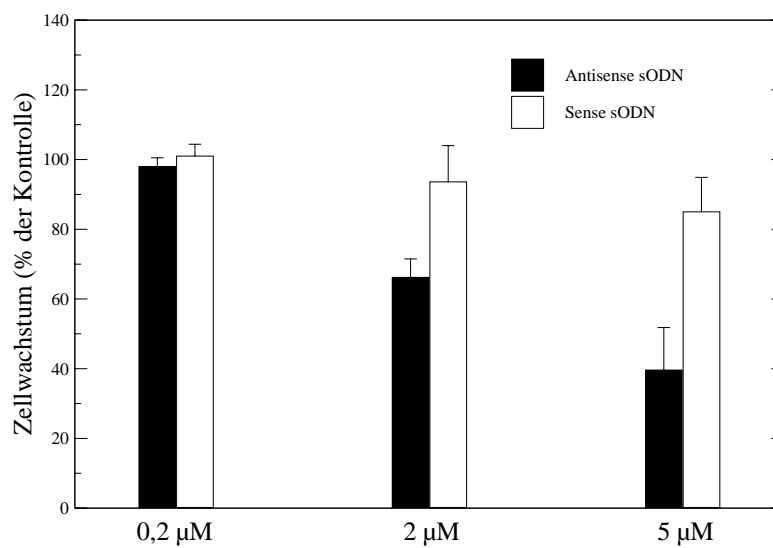


Abbildung 4.1: Wachstumshemmung von SK-OV-3 Ovarialkarzinomzellen durch ein c-erbB-2-spezifisches Antisense-sODN. Die Zellproliferation wurde mittels XTT-Assay (Firma Roche) bestimmt. Die sODNs (Antisense und Sense-Kontrolle) wurden in den angegebenen Konzentrationen für 5 Tage direkt zum Kulturmedium gegeben.

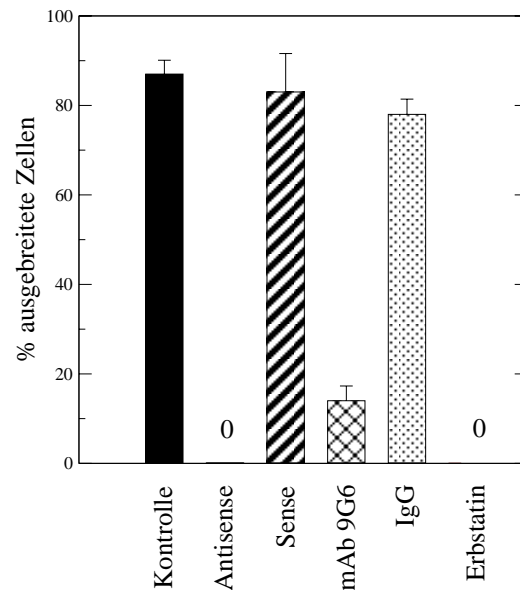


Abbildung 4.2: Hemmung der serum-induzierten Ausbreitung von SK-OV-3 Ovarialkarzinomzellen durch Ausschaltung des c-erbB-2 Genproduktes. Die Zellen wurden serumfrei mit c-erbB-2 Antisense-sODN ($5 \mu\text{M}$), einem monoklonalen Antikörper gegen p185^{c-erbB-2} (mAb 9G6, $10 \mu\text{g/ml}$) oder dem Tyrosinkinasehemmstoff Erbstatin ($10 \mu\text{M}$) inkubiert. Die Zellausbreitung wurde durch Zugabe von FKS (1 %) induziert. Die ausgebreiteten Zellen wurden nach 2 h ausgezählt (Auswertung von mindestens 200 Zellen). Als Kontrollen wurde unbehandelte Zellen oder mit Sense-sODN und unspezifischem IgG vorbehandelte Zellen mitgeführt.

breitung, während das Kontroll-Sense-sODN die FKS-induzierte Zellausbreitung nicht hemmt. In Übereinstimmung mit der Erklärung, daß in SK-OV-3 Ovarialkarzinomzellen die Zellausbreitung über $p185^{c-erbB-2}$ reguliert wird, hemmt eine Inkubation der Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von $p185^{c-erbB-2}$ (Klon 9G6) die Zellausbreitung ebenfalls deutlich. Weiterhin wird die Zellausbreitung von SK-OV-3 Zellen durch den Tyrosinkinaseinhibitor Erbstatin gehemmt. Die Zellausbreitung von SK-OV-3 Ovarialkarzinomzellen ist somit zusätzlich wahrscheinlich von der Tyrosinkinaseaktivität von $p185^{c-erbB-2}$ abhängig.

4.2 Selection of a high activity c-erbB-2 ribozyme using a fusion gene of c-erbB-2 and the enhanced green fluorescent protein.

K. Wiechen, C. Zimmer and M. Dietel

Publiziert in: Cancer Gene Therapy 5; 1998: 45-51

Im Rahmen dieser Studie wurde die Möglichkeit einer spezifischen Ausschaltung der c-erbB-2 mRNA durch ein Hammerhead-Ribozym analysiert. Hammerhead-Ribozyme sind kurze RNA-Fragmente, die aus einer Kernsequenz mit charakteristischer Sekundärstruktur und Antisenseflanken aufgebaut sind (Abbildung 4.3). Die charakteristische Sekundärstruktur wurde ursprünglich aus pflanzlichen Viroiden isoliert [19]. Hammerhead-Ribozyme hybridisieren mit einer komplementären spezifischen RNA und können diese an einem NUX-Motiv (N = jedes Nukleo-

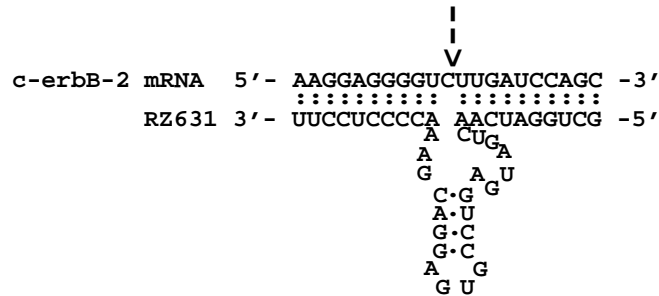


Abbildung 4.3: Sequenz und Sekundärstruktur des c-erbB-2 Hammerhead-Ribozyms RZ631 mit Darstellung der Basenpaarung mit der c-erbB-2 mRNA. Die Spaltungsposition der c-erbB-2 mRNA ist durch einen Pfeil markiert.

tid, X = A, U oder C) schneiden und somit die Degradation einer mRNA initiieren. Zusätzlich sind Ribozyme wie Enzyme zu multiplen Spaltungsvorgängen in der Lage.

Zunächst wurden Ribozyme gegen verschiedene Zielpositionen der c-erbB-2 mRNA konstruiert (Tabelle 4.1). Diese Vorgehensweise war erforderlich, da zahlreiche Positionen einer mRNA durch Sekundärstrukturbildung für eine Ribozym-spaltung wahrscheinlich nicht zugänglich sind. Die DNA-Matrizen für die Ribozyme wurden als Oligodeoxynukleotide mit einem flankierenden T7-Promoter synthetisiert. Um Matrizen für das Substrat zu generieren wurden Fragmente der c-erbB-2 cDNA in den Plasmidvektor pGEM3-Zf- (Firma Promega) einkloniert und dieser durch Restriktionsverdau linearisiert. Dieser Vektor verfügt ebenfalls über einen T7-Promoter. Von beiden Matrizen wurde in vitro im zellfreien System mit T7 RNA-Polymerase Ribozym-RNA und Substrat-RNA hergestellt. Ribozym und Substrat wurden in unterschiedlichen Mengenverhältnissen in einem zellfrei-

Zielsequenzen der c-erbB-2 Ribozyme

Ribozym	Zielsequenz 5' → 3'	Spaltungsaktivität
RZ211	GGCUCCU <u>CCUC</u> GCCCUCUUGC	+
RZ287	CCCUGCCAG <u>UC</u> CCGAGACCCA	(+)
RZ387	GCCAGCCU <u>GUC</u> CUUCCUGCAG	-
RZ631	AAGGAGGGG <u>GUC</u> UUGAUCCAGC	+
RZ1014	ACGUUUGA <u>GUC</u> CAUGCCCAAU	-

Tabelle 4.1: Zielsequenzen der in-vitro untersuchten c-erbB-2-Hammerhead-Ribozyme. Die Nummerierung der Ribozyme erfolgte nach der Genbank Nr. X03363. Die Nummer bezeichnet die Position der ersten Base des NUX Motivs (unterstrichen). Das Ribozym RZ631 zeigte die stärkste Spaltungsaktivität im zellfreien System und wurde in den pol III RNA-Expressionsvektor pCVA inkloniert.

en Assay inkubiert. Substrate und Spaltprodukte wurden nach der Inkubation auf denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Das am stärksten aktive c-erbB-2 Ribozym RZ631 (Tabelle 4.1) spaltete ein 169 Basen langes Fragment der c-erbB-2 mRNA nach 30 min bei 37 °C nahezu vollständig bei einem 50-fachen molaren Überschuß des Ribozyms.

Um das RZ631-Ribozym in Ovarialkarzinomzellen zu exprimieren wurde ein Expressionsvektor eingesetzt, der über einen RNA-Polymerase III Promoter (pol III) verfügt. Dieser Expressionsvektor (pCVA) wurde uns von V.N. Lazarev (Institute of Agricultural Biotechnology, Moskau) zur Verfügung gestellt. Pol III Promotoren sind z.B. integrale Bestandteile von stark konstitutiv exprimierten Genen für tRNA's und einige kleine adenovirale RNA's. Im Gegensatz zu langen mRNA's, die von RNA-Polymerase II Promotoren transkribiert und zur Stabilisierung polyadenyliert werden, werden von pol III Promotoren kurze RNA's transkribiert, die durch starke Sekundärstrukturen intrazellulär stabilisiert werden. Daher wurden

pol III Promotoren bereits von anderen Arbeitsgruppen zur Expression von Ribozymen eingesetzt [64], [47]. Die RZ631 cDNA wurde als Oligodeoxynukleotid synthetisiert und in die einzelne Kpn2I Restriktionsstelle des pCVA Vektors einkloniert. Als Kontrolle für die Ribozymwirkung wurde zusätzlich ein reiner Antisense-RNA-Expressionsvektor konstruiert.

Die Experimente wurde in NIH:OVCAR-3 Ovarialkarzinomzellen durchgeführt, da sich diese mit der Lipofektionstechnik, die zu diesem Zeitpunkt verfügbar war (Lipofektin der Firma Gibco), gut transfizieren ließen. Da die NIH:OVCAR-3 Zelllinie nur sehr geringe Mengen von endogenem $p185^{c-erbB-2}$ exprimiert, wurde der Ribozymexpressionsvektor mit einem c-erbB-2-Expressionsvektor cotransfiziert. Die c-erbB-2 cDNA wurde zusätzlich mit der cDNA des fluoreszierenden Proteins EGFP fusioniert, sodaß dieser Vektor ein grün fluoreszierendes c-erbB-2 Fusionsprotein bildet.

Der Ribozymexpressionsvektor wurde im 4-fachen Überschuß gegenüber dem c-erbB-2-EGFP Expressionsvektor in die NIH:OVCAR-3 Zellen transfiziert. Die zelluläre sehr starke Ribozymexpression wurde mittels Northern Blot nachgewiesen. Das Ribozym RZ631 reduzierte die Menge des gebildeten c-erbB-2-Fusionsproteins um ca. 70%, die Antisense-RNA führte nur zu einer Verminderung um ca. 40%. Somit wurde die Überlegenheit des Ribozymansatzes gegenüber der reinen Antisense-RNA zur Ausschaltung einer mRNA bewiesen. Allerdings war zur Suppression einer mRNA ein sehr hoher molarer Überschuß des Ribozyms gegenüber der Ziel-RNA notwendig. Dies ist insbesondere bei Onkogenen, wie c-erbB-2, die auf mRNA-Ebene stark überexprimiert werden eine

Einschränkung für eine mögliche therapeutische Anwendung von Ribozymstrategien.

4.3 Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide down-regulation of the insulin-like growth factor I receptor in ovarian cancer cells.

M. Müller, M. Dietel, A. Turzynski and K. Wiechen

Publiziert in: *Int J. Cancer* 77; 1998: 567-571

In dieser Studie wurde die Funktion des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor I Rezeptors (IGF-IR) in Ovarialkarzinomzellen untersucht. Der IGF-IR ist wie das c-erbB-2 Onkogenprodukt ein Tyrosinkinase-Rezeptor, dessen Expression für das Überleben transformierter Zellen, und somit auch von Tumorzellen, essentiell ist [4], [3]. Deshalb ist der IGF-IR ein mögliches therapeutisches Zielmolekül für neue Ansätze einer Tumorthherapie. Im Unterschied zum c-erbB-2 Onkogenprodukt sind für den IGF-IR mit IGF-I und IGF-II direkt bindende Polypeptidliganden charakterisiert.

Die Expression von IGF-I Rezeptoren in NIH:OVCAR-3 Zellen wurde durch Northern Blot und Durchflußzytometrie nachgewiesen. Die Zugabe von rekombinantem IGF-I (5 nM) steigert die Proliferation von NIH:OVCAR-3 Ovarialkarzinomzellen kräftig (Abbildung 4.4). Der wachstumssteigernde Effekt von 5 nM IGF-I entspricht am ersten Tag nach der Zugabe dem von 10% FKS; erst nach länge-

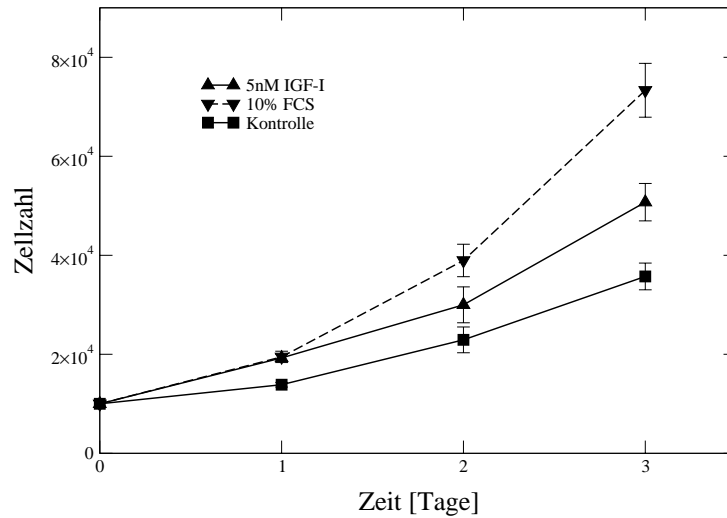


Abbildung 4.4: Stimulation des Zellwachstums von NIH:OVCAR-3 Ovarialkarzinomzellen durch den Wachstumsfaktor IGF-I und FKS.

rer Inkubation wirkt FKS, in dem zahlreiche Wachstumsfaktoren vorhanden sind, stärker wachstumsfördernd als IGF-I alleine. NIH:OVCAR-3 Zellen proliferieren in geringerem Ausmaß auch in serumfreien Medium ohne Wachstumsfaktorzusatz. Daher liegen hier wahrscheinlich autokrine Stimulationsmechanismen vor, bei denen Rezeptoren der Tumorzellen durch selbst sezernierte Wachstumsfaktoren stimuliert werden. Tatsächlich ist eine Co-expression des IGF-IR und des Liganden IGF-I in NIH:OVACR-3 Zellen beschrieben worden [60].

Um zu untersuchen inwieweit der IGF-IR in einen solchen autokrinen Regulationsmechanismus involviert ist wurde der Rezeptor durch ein Antisense-sODN, welches gegen eine Region der IGF-IR mRNA nahe des AUG-Startcodons gerichtet war, ausgeschaltet. Die Spezifität der Antisensewirkung auf die IGF-IR mRNA wurde mittels durchflußzytometrischer Analyse (Abbildung 4.5) auf der Proteine-

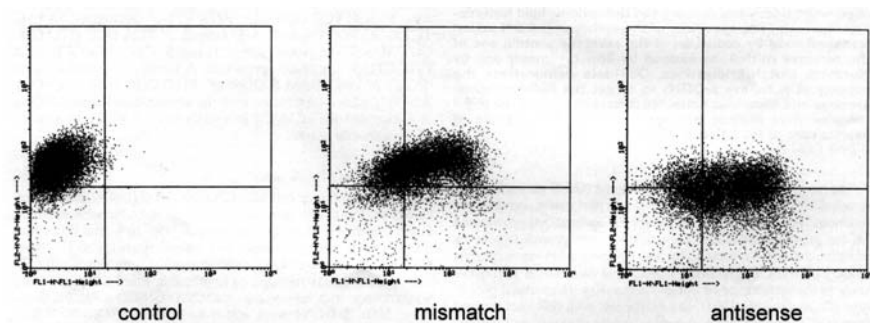


Abbildung 4.5: Spezifität der Ausschaltung des IGF-IR in NIH:OVCAR-3 Ovarialkarzinomzellen durch das IGF-IR Antisense-sODN und Effizienz der Lipofektin-verstärkten zellulären sODN-Aufnahme. Die Zellen wurden mit Antisense- oder Mismatch-Kontroll-sODN (100 nM) zusammen mit einem FITC-markierten Tracer-sODN (50 nM) co-transfiziert und durchflußzytometrisch analysiert (X-Achse: FITC-Signal des Tracer-sODNs, Y-Achse: Expression des IGF-IR, Markierung mit dem mAb α IR-3 und R-Phycoerythrin). In den transfizierten Zellen ist das FITC-markierte Tracer-sODN in der Mehrzahl der Zellen nachweisbar, wobei die intrazelluläre Konzentration um mehr als den Faktor 100 variiert (Log-Skala!). Das IGF-IR Antisense-sODN vermindert die Menge des Rezeptorproteins auf 53 % der unbehandelten bzw. Mismatch-behandelten Zellen.

bene und mittels Northern Blot auf der mRNA-Ebene bewiesen. Als Kontrollen wurden neben dem komplementären Sense-sODN zwei Mismatch-Kontroll-sODNs mitgeführt, bei denen gegenüber dem Antisense-sODN lediglich Basen vertauscht waren. Diese stringenten Kontrollen wurden durchgeführt, um sicherzustellen, daß die Effekte auf eine spezifische Antisenswirkung und nicht auf eine unspezifische Wachstumshemmung zurückzuführen sind .

Unter serumfreien Kulturbedingungen wurde die Proliferation von NIH:OVCAR-3 Zellen durch das IGF-IR Antisense-sODN oder einen inhibitorischen monoklonalen Antikörper gegen den Rezeptor (Klon α IR-3) um ungefähr 40% vermindert (Abbildung 4.6 A). Eine deutlich stärkere Wirkung des Antisense-sODNs zeigt

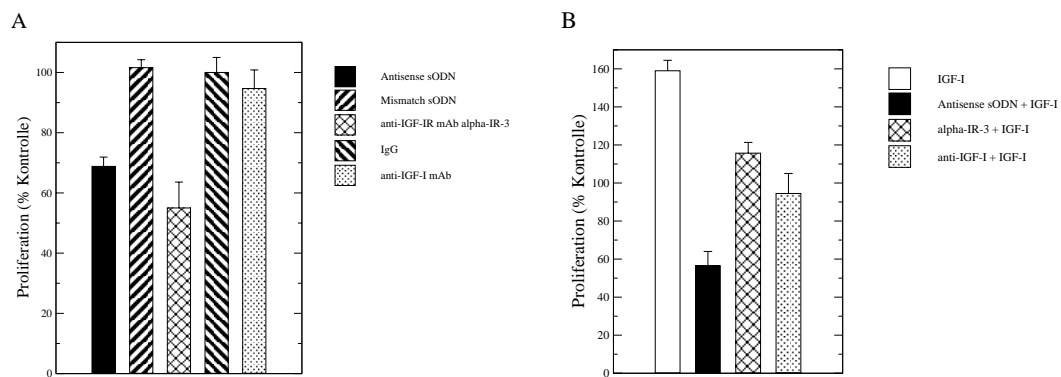


Abbildung 4.6: A, Mäßige Hemmung der basalen Wachstumsrate von NIH:OVCAR-3 Zellen durch ein IGF-IR Antisense-sODN ($3 \mu\text{M}$) und einen monoklonalen Antikörper gegen den IGF-IR ($\alpha\text{IR-3}$, $2 \mu\text{g/ml}$). B, ausgeprägte Wachstumshemmung durch das IGF-IR Antisense-sODN ($3 \mu\text{M}$) bei maximal durch IGF-I wachstumsstimulierten Zellen.

te sich bei NIH:OVCAR-3 Zellen, die maximal mit IGF-I wachstumsstimuliert waren (Abbildung 4.6 B): Der Antikörper hemmte unter diesen Bedingungen das Zellwachstum bis auf Werte entsprechend der basalen Proliferationsrate unter serumfreien Kulturbedingungen, während das Antisense-sODN die Zellproliferation deutlich stärker verminderte. In vivo sind im Serum und der Interzellularflüssigkeit IGF-Liganden nachweisbar, sodaß der IGF-IR in vivo wahrscheinlich aktiviert ist. Daher entsprechen die von uns untersuchten Zellkulturbedingungen mit einer Stimulation der Zellen durch IGF-I der in vivo Situation besser als die Untersuchung nicht stimulierter Zellen. Als Erklärung für die deutlich bessere Effizienz des IGF-IR Antisense-sODN ist eine kompetitive Verdrängung des Antikörpers vom Rezeptor durch das zugesetzte IGF-I oder durch autokrin sezernierte IGF-Liganden am wahrscheinlichsten.

Ein Hauptproblem für den möglichen therapeutischen Einsatz von Antisense-sODNs liegt in der schlechten Permeation durch Zellmembranen. Daher wurde zusätzlich versucht die zelluläre Aufnahme des IGF-IR Antisense-sODN durch das Lipidgemisch Lipofektin zu verstärken. Kontrollexperimente mit einem Fluoreszeinmarkierten sODN zeigten eine Aufnahme der sODNs in nahezu alle Zellen (Abbildung 4.5). Im Komplex mit Lipofektin erreichte das IGF-IR Antisense-sODN bei einer Konzentration von 50 nM eine Hemmung des Zellwachstums wie bei einer sODN-Konzentration von 3 μ M ohne Lipide. Die zelluläre Aufnahme der Antisense-sODNs mit der zu diesem Zeitpunkt zur Verfügung stehenden Lipofektionstechnik war jedoch sehr unregelmäßig. Daraus erklären sich auch unspezifische toxische Effekte bei der Applikation von Lipofektin-komplexierten sODNs bei Konzentrationen über 100 nM.

4.4 Suppression of the c-erbB-2 gene product decreases transformation abilities but not the proliferation and secretion of proteases of SK-OV-3 ovarian cancer cells.

K. Wiechen, S. Karaaslan, A. Turzynski and M. Dietel

Publiziert in: Br. J. Cancer 81; 1999: 790-795

Um die Funktion des c-erbB-2 Onkogens in Ovarialkarzinomzellen näher zu analysieren wurde das Genprodukt p185^{c-erbB-2} in den SK-OV-3 Zellen mit einem intrazellulär exprimierten c-erbB-2-spezifischen 'single chain' Antikörper stabil

supprimiert. Dieser 'single chain' Antikörper (scFv-5R) wurde von der Arbeitsgruppe von N. Hynes (Friedrich Miescher Institut, Basel) konstruiert und uns für das Projekt zur Verfügung gestellt [16]. Die scFv-5R cDNA wurde in den retroviralen Expressionsvektor pLXIN (Firma Clontech) umkloniert. Dieser Vektor verfügt über eine 'internal ribosome entry site' (IRES) und transkribiert eine bi-cistronische RNA von einem Promoter. Von dieser bi-cistronischen RNA werden dann die Proteine für den scFv-5R und eine selektierbare Resistenz (hier Neomycin-Resistenz, Selektion mit G418) translatiert. Dadurch ist die Expression des scFv-5R eng an die G418-Resistenz gekoppelt. Diese Strategie wurde gewählt, da die SK-OV-3 Zellen durch die Expression des c-erbB-2 Onkogens wahrscheinlich einen Wachstumsvorteil haben und somit Zellen mit einer c-erbB-2 Suppression in der Zellkultur rasch überwachsen werden können.

Der retrovirale Expressionsvektor (pL5R) wurde in retrovirale ϕ NX-ampho Verpackerzellen transfiziert [59]. Mit dem Mediumüberstand der Verpackerzellen wurden SK-OV-3 Ovarialkarzinomzellen infiziert und anschließend mit G418 selektiert. Insgesamt 8 stabile Zellklone mit einer starken Expression der RNA des 'single chain' Antikörpers scFv-5R wurden isoliert. Da die Expression des scFv-5R zu einer intrazellulären Retention des c-erbB-2 Genproduktes, jedoch nicht zu einer Verminderung der Expression führt, wurde die Verminderung des Oberflächenrezeptors durchflußzytometrisch bestimmt. Alle 8 isolierten Zellklone haben im Vergleich zur Vektorkontrolle und zu nicht veränderten SK-OV-3 Zellen eine stabile Verminderung des c-erbB-2 Onkogenproduktes an der Zelloberfläche (Abbildung 4.7).

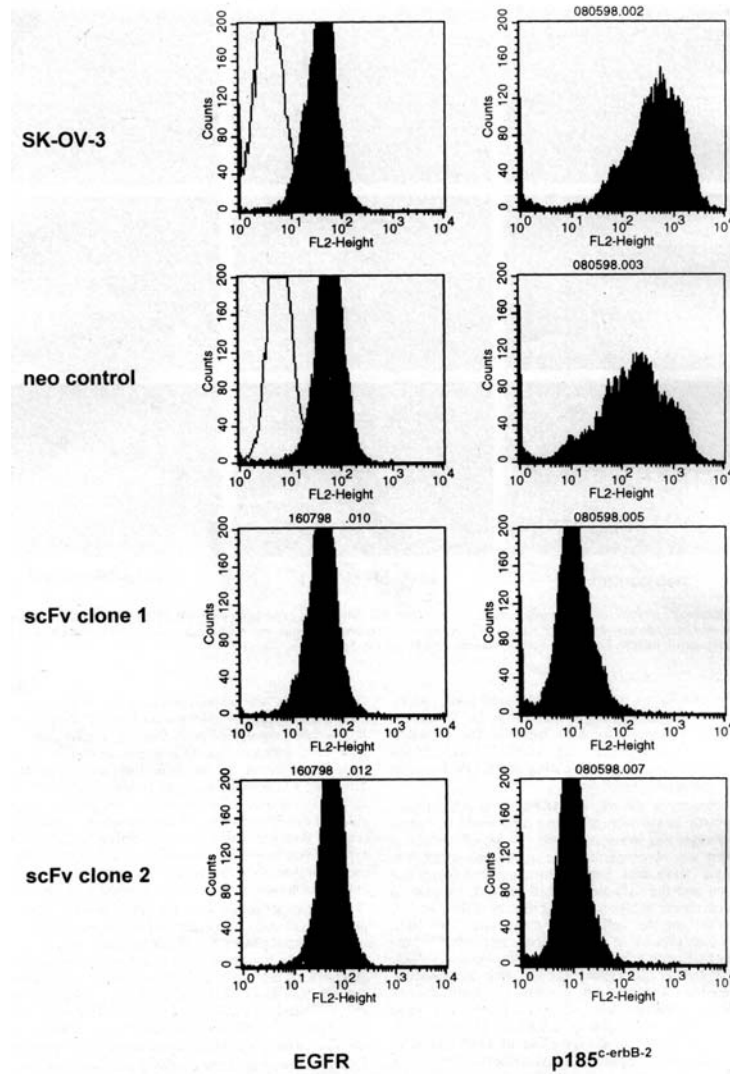


Abbildung 4.7: Spezifität der Ausschaltung von p185^{c-erbB-2} durch den 'single chain' Antikörper scFv-5R. (Rechtes Panel) Starke Expression von p185^{c-erbB-2} in SK-OV-3 Zellen und der Neo-Kontrolle. Starke Verminderung von p185^{c-erbB-2} in Zellklonen mit einer Expression des scFv-5R. (Linkes Panel) Keine Beeinflussung der Expression des EGF-Rezeptors durch scFv-5R (Leere Peaks mit Kontrolle durch unspezifisches IgG).

Die SK-OV-3 Zellklone mit Verminderung des Oberflächen-p185^{c-erbB-2} wurden hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens mit SK-OV-3 Zellen und Zellen mit dem leeren Vektor (Neo) verglichen (Abbildung 4.8). Die Verminderung des Oberflächen-p185^{c-erbB-2} veränderte das anheftungsabhängige Zellwachstum unter Kulturbedingungen mit hohen Konzentrationen von FKS im Medium nicht signifikant. Im Gegensatz dazu hemmte die Suppression von c-erbB-2 die Zellproliferation bei Verminderung der FKS-Konzentration bzw. unter anheftungsunabhängigen Bedingungen sehr stark. Zusätzlich wurde die Sekretion von potentiell matrix-degradierenden Proteasen durch die Ovarialkarzinomzellen gemessen. In diesen Experimenten zeigte sich, daß das c-erbB-2 Onkogenprodukt in SK-OV-3 Ovarialkarzinomzellen keinen Einfluß auf die Sekretion von Matrixmetalloproteasen (MMP) oder des urokinase-ähnlichen Plasminogenaktivators (uPA) hat.

4.5 Involvement of the c-erbB-2 oncogene product in the EGF-induced cell motility of SK-OV-3 ovarian cancer cells.

K. Wiechen, S. Karaaslan and M. Dietel

Publiziert in: Int. J. Cancer 83; 1999: 409-414

Der grundsätzliche Zusammenhang zwischen c-erbB-2 Überexpression und der Motilität von Ovarialkarzinomzellen wurde bereits in einer früheren Studie [53] nachgewiesen. Im Rahmen dieser Studie sollte der motogene Effekt von p185^{c-erbB-2}

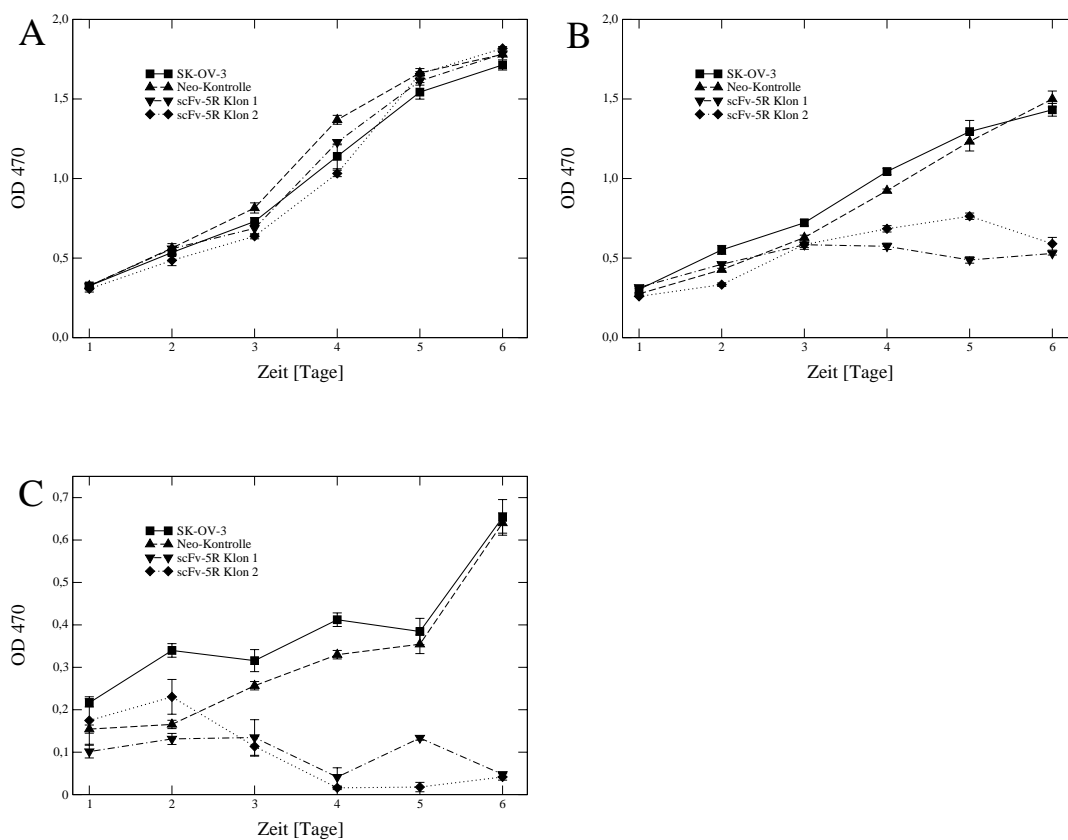


Abbildung 4.8: A, Kein Einfluß von $p185^{c-erbB-2}$ auf die Zellproliferation in Gegenwart von 10% FKS. B und C, Starke Verminderung der Zellproliferation durch Ausschaltung des $c-erbB-2$ Onkogenproduktes bei Verminderung des Serumgehaltes auf 1% (B) bzw. bei Hemmung der Zellanheftung durch polyHEMA (C). Die Zellproliferation wurde mittels XTT-Assay (Firma Roche) bestimmt.

genauer charakterisiert werden.

Das c-erbB-2 Genprodukt hat als Rezeptortyrosinkinase eine hohe Strukturhomologie zum Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF Rezeptor) und den nahe verwandten Genprodukten der c-erbB-3 und c-erbB-4 Gene [16]. Tyrosinkinaserzeptoren aus der erbB-Familie bilden nach Bindung spezifischer Polypeptidliganden Rezeptorhomo- oder Heterodimere, die zu einer Transphosphorylierung der Tyrosinreste am C-Terminus der Rezeptoren und zur Aktivierung von Signalwegen führen. Für das c-erbB-2 Onkogenprodukt sind im Gegensatz zu den anderen erbB-Rezeptoren bis jetzt keine eigenen Liganden charakterisiert worden. Die Bindung eines Liganden an ein anderes Mitglied der erbB-Rezeptorfamilie (z.B. EGF an den EGF-Rezeptor) führt jedoch zu Ausbildung von Heterodimeren mit p185^{c-erbB-2} und zur Tyrosinphosphorylierung beider Rezeptoren [16].

Die untersuchten SK-OV-3 Ovarialkarzinomzellen exprimieren sowohl EGF-Rezeptoren als auch p185^{c-erbB-2}. Die Ausschaltung des c-erbB-2 Onkogenproduktes mit dem 'single chain' Antikörper scFv-5R (Abschnitt 4.4) beeinflusst die Dichte des EGF-Rezeptors auf der Zelloberfläche nicht (Abbildung 4.7). Unterschiedliche Wachstumsfaktoren, wie EGF oder der Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) können bei Tumorzellen eine verstärkte Motilität auslösen [8], [18]. Daher wurde die Wirkung von EGF auf die Zellmotilität im SK-OV-3 Zellmodell untersucht. Die Zugabe von EGF bewirkt bei SK-OV-3 Zellen innerhalb von 2-4 Stunden die Ausbildung von pseudopodienähnlichen Zellfortsätzen und eine ausgeprägte Zelldissoziation (Abbildung 4.9). Diese EGF-induzierte Zelldissoziation ist bei SK-OV-3 Zellderivaten mit einer Suppression von p185^{c-erbB-2} stark ver-

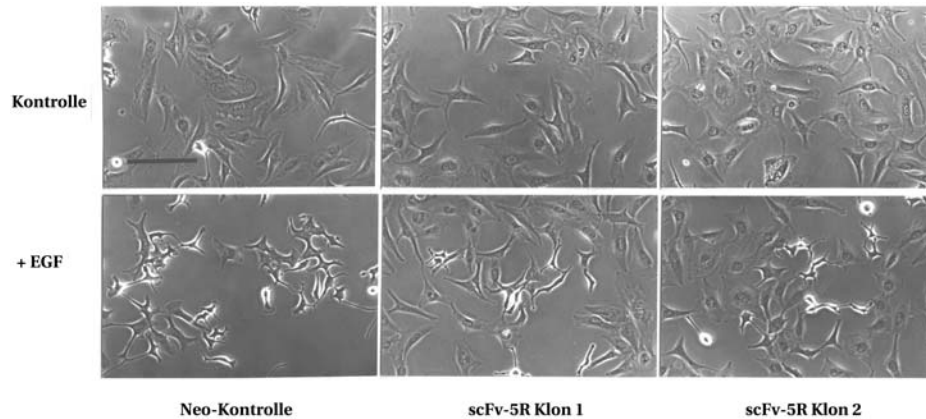


Abbildung 4.9: Vermittlung der EGF-induzierten Zellmotilität durch p185^{c-erbB-2} in SK-OV-3 Ovarialkarzinomzellen. Die Zugabe von EGF (100 ng/ml) führt bei SK-OV-3 Zellen bzw. bei Neo-Kontrollzellen (linkes Panel) nach 6 h zur Ausbildung von Pseudopodien und zu einer deutlichen Zelldissoziation (Scatter-Effekt). Die Ausschaltung von p185^{c-erbB-2} in 2 scFv-5R-exprimierenden Zellklonen führt zu einer starken Hemmung der EGF-Induzierten Zellmotilität (mittleres und rechtes Panel).

mindert. Somit stellt das EGF-Rezeptor/p185^{c-erbB-2}-Heterodimer bei SK-OV-3 Ovarialkarzinomzellen einen motogenen Schalter dar.

4.6 Gene expression profiling of human ovarian carcinoma and identification of CAVEOLIN-1 as a tumor suppressor gene.

K. Wiechen, L. Diatchenko, A. Agoulnik, B. Zhumabayeva, S. Desai, S. Htun, K.M. Scharff, K. Hyder, P.D. Siebert, M. Dietel, R. Schäfer and C. Sers

(Manuskript eingereicht)

In dieser Studie wurde die Genexpression von Normalovargewebe mit der von niedrig differenzierten Ovarialkarzinomen verglichen. Dazu wurde ^{32}P -markierte cDNA aus beiden Geweben auf einen Atlas Select Human Tumor Array (Firma Clontech), auf dem 437 verschiedene cDNA Fragmente immobilisiert sind, hybridisiert. Diese 437 Sequenzen repräsentieren differentiell exprimierte Gene zwischen Normalgewebe und Tumoren aus Colon, Lunge, Prostata, Mamma und Harnblase, die durch eine PCR-basierte cDNA Subtraktionstechnik [11] nachgewiesen wurden. Durch dieses Vorgehen sind auf dem Array Gene angereichert, die häufig in humanen Karzinomen dysreguliert sind. Allerdings können bei dieser Strategie keine Ovarialkarzinom-spezifischen Gene isoliert werden. Die Daten der primären Atlas Array Experimente wurden zunächst durch ein Dot Blot-Verfahren (Normal/Tumor-Array, Firma Clontech) überprüft. Hierbei handelt es sich um Arrays, auf denen komplette cDNAs von Tumoren und dem korrespondierenden Normalgewebe aufgetragen sind.

Mit diesen Hybridisierungstechniken wurde ein Expressionsverlust für Caveolin-1 in Ovarialkarzinomen gegenüber Normalovargewebe nachgewiesen. Dieser Ex-

pressionsverlust für Caveolin-1 in Ovarialkarzinomen konnte auf Proteinebene mittels Immunhistologie bestätigt werden (Abbildung 4.10). Weiterhin zeigten immortale Ovarialepithelzellen eine starke Expression von Caveolin-1 im Western Blot, während 4 von 6 Ovarialkarzinomzelllinien einen kompletten Expressionsverlust aufwiesen. Die Reexpression von Caveolin-1 führte in zwei untersuchten Ovarialkarzinomzellen zu einer starken Hemmung der Koloniebildung, so daß Caveolin-1 in Ovarialkarzinomen wahrscheinlich ein Tumorsuppressorgen ist.

4.7 Down-Regulation of Caveolin-1, a Candidate Tumor Suppressor Gene, in Sarcomas.

K. Wiechen, C. Sers, A. Agoulnik, K. Arlt, M. Dietel, P. M. Schlag and U. Schneider

Publiziert in: Am. J. Pathol. (Manuskript im Druck)

Im Rahmen der Untersuchungen zu differentiell exprimierten Genen im Ovarialkarzinom (Abschnitt 4.6) wurde Caveolin-1 als wahrscheinliches Tumorsuppressorgen charakterisiert. Bei den immunhistologischen Analysen des Gewebes fiel eine konstante und kräftige endogene Expression von Caveolin-1 in mesenchymalen Zellen, wie Adipozyten, Fibroblasten, Endothelzellen (Abbildung 4.10 D) und glatten Muskelzellen auf. Deshalb wurde die Expression von Caveolin-1 in normalem mesenchymalen Geweben, in benignen mesenchymalen Tumoren und in Sarkomen im Rahmen dieser Studie systematisch untersucht.

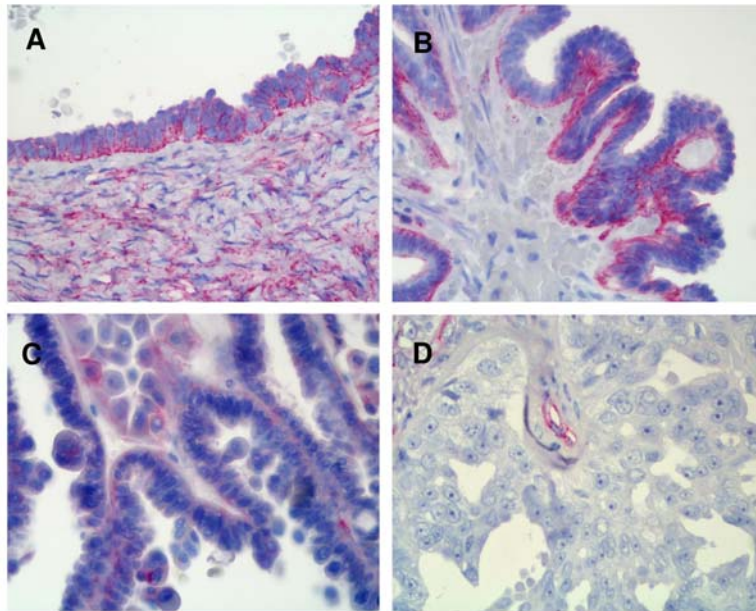


Abbildung 4.10: Immunhistologische Analyse der Caveolin-1 Expression in Ovargewebe und Ovarialtumoren. (A), starke Expression von Caveolin-1 im Oberflächenepithel und Stroma von Normalovargewebe. (B), Erhaltene Caveolin-1-Expression im Epithel von serösen Adenomen. (C), Verminderung der Expression in hochdifferenzierten serös-papillären Karzinomen. D, Expressionsverlust in niedrig-differenzierten serösen Karzinomen. Caveolin-1 ist in benignen Ovarrepiethelien (A und B) vorwiegend an der basalen und lateralen Zellmembran lokalisiert. In hochdifferenzierten Karzinomen findet sich eine schwache zytoplasmatische Expression von Caveolin-1 (C). Mesenchymale Zellen wie Endothelien, glatte Muskelzellen und Adipozyten zeigen eine starke Expression von Caveolin-1 (Caveolin-1-positive Kapillare in D als endogene Positivkontrolle).

Die immunhistologischen Untersuchungen (Abbildung 4.11) ergaben, daß in 22 benignen mesenchymalen Tumoren (untersucht wurden Fibromatosen, Leiomyome, Angiome und Lipome) eine starke und homogene Expression von Caveolin-1 ähnlich wie in mesenchymalen Normalgeweben nachweisbar ist. Zusätzlich wurden 79 Sarkome hinsichtlich ihrer Caveolin-1-Expression untersucht. Dieses Tumorkollektiv setzte sich aus Fibrosarkomen, Leiomyosarkomen, Angiosarkomen und Liposarkomen zusammen, bei denen Normalgewebe mit einer korrespondierenden Differenzierung existieren. Zusätzlich wurden mit malignen fibrösen Histiozytomen (MFH) und synovialen Sarkomen zwei Tumorentitäten untersucht, für die ein Normalgewebe bzw. die Gewebsherkunft nicht eindeutig charakterisiert sind. Die Mehrzahl der Sarkome wies einen ausgeprägten Verlust der Expression von Caveolin-1 auf. Die Tendenz zu einem Verlust der Expression von Caveolin-1 zeigte sich auch bei HT-1080 Fibrosarkomzellen, die im Gegensatz zu IMR-90 Fibroblasten nur eine sehr geringe endogene Expression aufweisen. Die Hemmung des RAS-RAF-MAPK Signalweges durch den synthetischen Inhibitor PD 98059 verstärkte die Expression von Caveolin-1 in HT-1080 Fibrosarkomzellen deutlich. Die heterologe Expression von Caveolin-1 in HT-1080 Fibrosarkomzellen supprimierte zudem die Koloniebildung deutlich (Abbildung 4.12). Somit ist Caveolin-1 in Sarkomen, ähnlich wie in Ovarialkarzinomen, wahrscheinlich ein Tumorsuppressorgen.

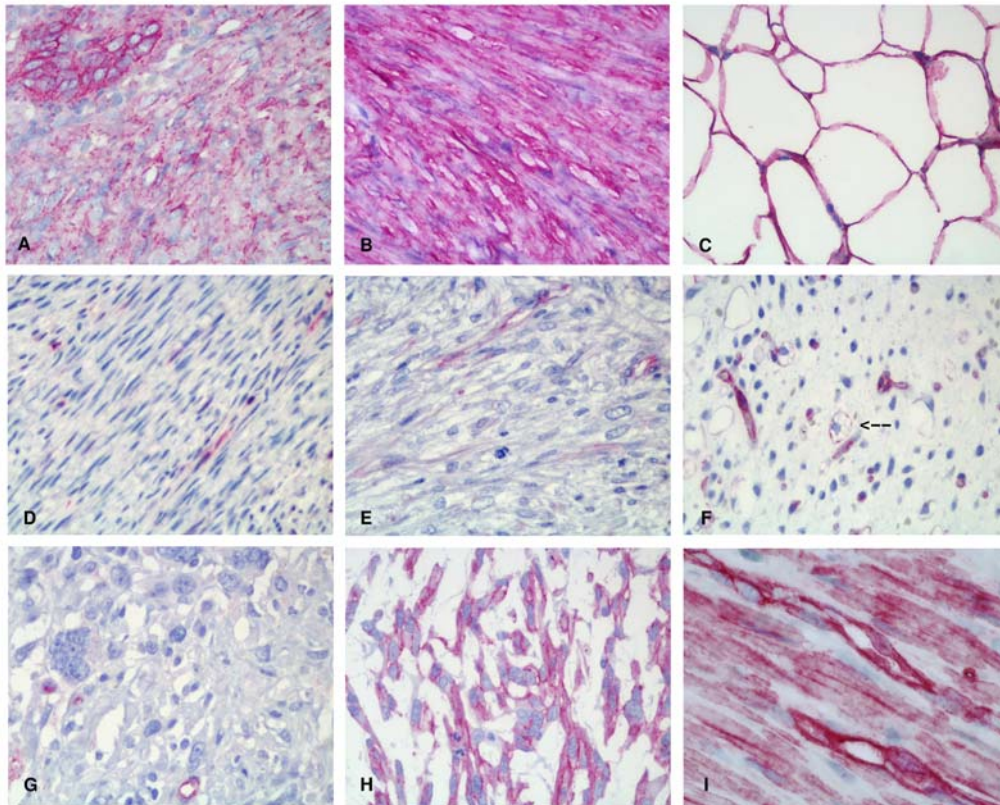


Abbildung 4.11: Expression von Caveolin-1 in mesenchymalem Gewebe, benignen mesenchymalen Tumoren und Sarkomen. A-C, Benigne mesenchymale Tumoren (A Fibromatose, B Leiomyom, C Lipom). D-G, Expressionsverlust in Sarkomen (D Fibrosarkom, E Leiomyosarkom, F Myxoides Liposarkom, G MFH). H, Erhaltene Caveolin-1-Expression in einzelnen Sarkomen (hier MFH). I, Mesenchymales Normalgewebe (Endothelien und glatte Muskulatur des Magens).

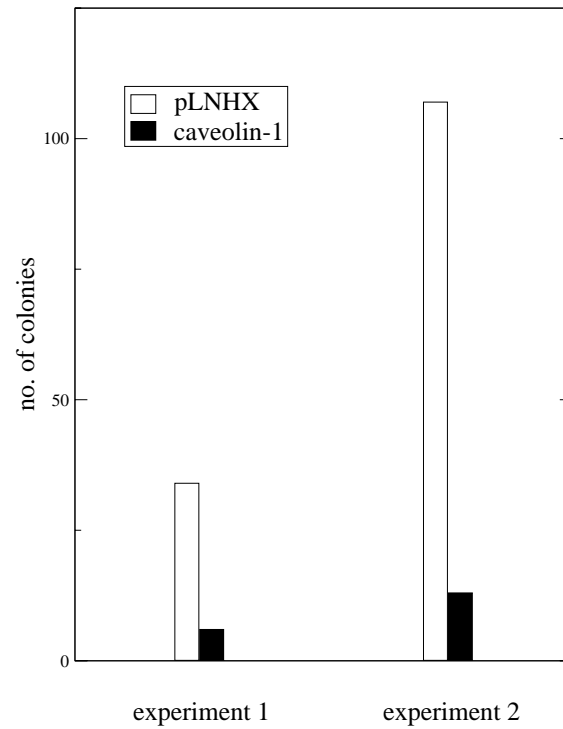


Abbildung 4.12: Hemmung der Koloniebildung von HT-1080 Fibrosarkomzellen durch heterologe Expression von Caveolin-1 in zwei unabhängigen Experimenten. Die HT-1080 Zellen wurden mit einem Caveolin-1-Expressionsvektor oder dem leeren Vektor (pLNHX) als Kontrolle transfiziert und anschließend mit G418 selektiert. G418-resistente Kolonien wurden nach 10 Tagen fixiert, angefärbt und ausgezählt.

5 Diskussion

5.1 Funktion von Rezeptortyrosinkinasen in Ovarialkarzinomen

Wachstumsfaktoren wie IGF-I oder EGF aktivieren ihre entsprechenden Rezeptortyrosinkinasen. Diese Rezeptoren stimulieren intrazelluläre Signalwege, wie den RAS-RAF-MEK oder den PI3K-AKT Signalweg, die wiederum nukleäre Transkriptionsfaktoren aktivieren. Permanent aktivierte Signalwege ändern die Genexpression und können so das Zellwachstum und das Zellüberleben fördern. Zusätzlich können Zellen durch aktivierte Signalwege maligne transformiert werden. Eine permanente Aktivierung des RAS-RAF-MEK Signalweges ist in Ovarialkarzinomzelllinien beschrieben [33]; eine Aktivierung des PI3K-AKT Signalweges ist in Ovarialkarzinomen ebenfalls bekannt [63]. In Ovarialkarzinomen bzw. Ovarialkarzinomzellen ist die Expression einer Reihe von Rezeptortyrosinkinasen wie z.B. des c-erbB-2 und des c-MET Onkogenproduktes [27], [21], des EGF-Rezeptors [8], des IGF-I Rezeptors [3] und des PDGF α -Rezeptors citeOvar-PDGF-alpha-R nachgewiesen worden.

Die Signaltransduktion über das c-erbB-2 Onkogenprodukt erfolgt durch Heterodimerisation mit anderen Mitgliedern der erbB-Familie. Dieser Mechanismus wurde als "laterale Signaltransduktion" charakterisiert cite Hynes-EMBO. Mit Hilfe eines c-erbB-2-spezifischen 'single chain' Antikörpers zur selektiven Ausschaltung von c-erbB-2 wurde kürzlich von der Arbeitsgruppe von N. Hynes

und Mitarbeitern nachgewiesen, daß das c-erbB-2 Genprodukt die Invasivität von Mammakarzinomzellen steigert [41]. Weiterhin wurde von dieser Arbeitsgruppe eine verstärkte Sekretion von vaskulärem endothelialelem Wachstumsfaktor (VEGF) in c-erbB-2-überexprimierenden Mammakarzinomzellen nachgewiesen [61]. Daher stimuliert das c-erbB-2 Onkogenprodukt in Mammakarzinomen möglicherweise direkt Invasion, Metastasierung und Angiogeneese. Der c-erbB-2-spezifische 'single chain' Antikörper wurde uns für die Untersuchungen an Ovarialkarzinomzellen von N. Hynes (Friedrich Miescher Institut, Basel) zur Verfügung gestellt cite Hynes-EMBO.

Im Rahmen mehrerer Studien [53], [54], [55], [28] wurde die Funktion des c-erbB-2 Onkogenproduktes und des IGF-I Rezeptors in Ovarialkarzinomzellen näher untersucht. Das c-erbB-2 Onkogenprodukt ist in ungefähr 20-30% aller Ovarialkarzinome überexprimiert und stellt einen unabhängigen und prognostisch ungünstigen Faktor dar [27]. Der IGF-I Rezeptor ist in Ovarialkarzinomen wahrscheinlich durch autokrine oder parakrine Regulationsmechanismen dauerhaft aktiviert [28]. Die Überexpression des IGF-I Rezeptors bewirkt bei Mammakarzinomen eine Radioresistenz und eine erhöhte Lokalrezidivrate [48].

In unseren Experimenten ergaben sich deutliche Unterschiede der Funktion des c-erbB-2 Genproduktes und des IGF-I Rezeptors in Ovarialkarzinomzellen. So hat der IGF-I Rezeptor einen starken Einfluß auf die Zellproliferation, während das c-erbB-2 Onkogenprodukt in erster Linie Zelltransformation und Zellmotilität steuert. Daher aktivieren c-erbB-2 Genprodukt und IGF-I Rezeptor in Ovarialkarzinomzellen wahrscheinlich zum Teil verschiedene intrazelluläre Signal-

wege. Das c-erbB-2 Onkogenprodukt reguliert in Mammakarzinomzellen matrix-degradierende und metastasierungsfördernde Proteasen [45]. Eine Regulation von Proteasen in Ovarialkarzinomzellen war im Gegensatz dazu in unseren Experimenten nicht nachweisbar. Daher ist die Wirkung des c-erbB-2 Onkogenproduktes möglicherweise zell- oder gewebspezifisch.

Eine wichtige Funktion des c-erbB-2 Onkogenproduktes besteht offenbar zusammen mit dem EGF-Rezeptor in der Regulation der Zellmotilität citeWiechen-IJC95, [54]. Eine durch p185^{c-erbB-2} verstärkte Zellmotilität kann die intraperitoneale Ausbreitung von Ovarialkarzinomzellen begünstigen und somit zur schlechten Prognose c-erbB-2-überexprimierender Ovarialkarzinome beitragen. Interessanterweise ist bei Fällen von mammärem Morbus Paget in über 90% der Fälle eine starke Überexpression von c-erbB-2 nachweisbar [10]. Die c-erbB-2-überexprimierenden Tumorzellen können beim Morbus Paget offenbar durch ihre erhöhte Motilität verstärkt in die Epidermis einwandern. Die Zellform und Zellmotilität wird über komplexe Interaktionen zwischen Zelladhäsionsproteinen, dem Aktin-Zytoskelett und der Extrazellulärmatrix reguliert [42]. Kürzlich wurde in diesem Zusammenhang nachgewiesen, daß c-erbB-2 zu einer Aufregulation der Expression von Fascin, einem Protein, welches Aktin bündelt, führt [17]. Daher ist die c-erbB-2-vermittelte Zellmotilität möglicherweise partiell auf eine transkriptionelle Regulation zurückzuführen. Zum größeren Teil ist die c-erbB-2-vermittelte Zellmotilität jedoch wahrscheinlich durch die Aktivierung bestimmter Signalwege bedingt. Die durch den Hepatozytenwachstumsfaktor HGF ausgelöste Zellmotilität [18] wird über Signalwege vermittelt, in die kleine GTP-bindende

Proteine aus der Familie der Rho-GTPasen eingeschaltet sind [44]. Ein Mitglied dieser Familie, RhoC, ist in metastasierenden Adenokarzinomen des Pankreas häufig überexprimiert [43], [9]. Der Zusammenhang zwischen c-erbB-2-vermittelter Zellmotilität und Rho-GTPasen in Ovarialtumoren wird daher zur Zeit näher analysiert (Zimmer et al., Manuskript in Vorbereitung).

5.2 Rezeptortyrosinkinasen als therapeutische Zielmoleküle

Da über das c-erbB-2 Onkogenprodukt und den IGF-I Rezeptor in Ovarialkarzinomzellen Funktionen vermittelt werden, die Tumorausbreitung und -progression *in vivo* fördern können, sind diese Rezeptoren mögliche Zielmoleküle für neuartige Krebstherapien. Im Rahmen von insgesamt 3 Studien wurde die Suppression des c-erbB-2 Genproduktes und des IGF-I Rezeptors durch Antisense- und Ribozymstrategien untersucht [53], [28], [58].

Antisense-Nukleinsäuren oder Ribozyme können prinzipiell extrazellulär appliziert oder von einem Expressionvektor intrazellulär transkribiert werden. Im ersten Fall ist *in vivo* eine chemische Stabilisierung, wie zum Beispiel eine Phosphorothioat-Modifikation [51] notwendig, um einen raschen Abbau durch Nukleasen zu verhindern.

Eine bedeutsame Einschränkung bei der Anwendung von Antisense-Strategien ist die Ausbildung von Sekundärstrukturen der Ziel-RNA. Dadurch stehen viele Be-

reiche einer mRNA nicht für eine Hybridisierung mit einem Antisense-sODN oder einem Ribozym zur Verfügung. Da es zur Zeit keine sichere Methode gibt, die Sekundärstrukturen einer Ziel-mRNA vorherzusagen, müssen Antisense-Sequenzen empirisch gesucht werden [52]. Die Experimente zur Ausschaltung von c-erbB-2 ergaben bei der Suche nach verfügbaren Positionen der mRNA sowohl mit dem Antisense-sODN als auch mit dem Ribozymansatz gute Übereinstimmungen: Das wirksame Antisense-sODN [53] richtet sich gegen die identische Position der mRNA wie eines der wirksamen Ribozyme (RZ211 in Tabelle 4.1, [58]).

Von größter Bedeutung bei der Ausschaltung einer mRNA durch Antisense- oder Ribozymstrategien ist die Überprüfung der Spezifität und der Ausschluß von Nicht-Antisenswirkungen [52]. Unspezifische Wirkungen von Antisense-Nukleinsäuren insbesondere auf das Zellwachstum sind durch intrazelluläre Akkumulation von Abbauprodukten oder zellfremden Transkripten beschrieben [51], [52], [53]. Daher wurden in allen Studien Kontrolloligonukleotide bzw. Kontrollvektoren mitgeführt und die Antisense- oder Ribozymwirkung direkt auf der Ebene der mRNA oder des Proteins überprüft.

Für einen möglichen therapeutischen Einsatz von Antisense- und Ribozymstrategien gegen Rezeptortyrosinkinasen ist eine effektive Einschleusung in die Tumorzellen notwendig. Denkbar in diesem Zusammenhang ist die Applikation synthetischer Antisense-sODNs als Lipidkomplexe oder der Einsatz von Retro- und Adenoviren. Antisensemoleküle oder Ribozyme müssen zur Wirksamkeit gegenüber der Ziel-RNA in einem hohen molaren Überschuß vorliegen. Daher ist nach unseren Daten [58] die Anwendbarkeit von Antisense-sODNs oder Ribozymen

gegen das stark überexprimierte c-erbB-2 Onkogen in Ovarialkarzinomen wahrscheinlich schwierig. Im Falle von Rezeptortyrosinkinasen, die wie der IGF-I Rezeptor in Ovarialkarzinomen nicht stark überexprimiert werden, sind Antisensestrategien zu therapeutischen Zwecken jedoch in Zukunft denkbar. Die prinzipielle Möglichkeit von Antisensetherapien gegen maligne Erkrankungen wird zur Zeit klinisch getestet: In klinischer Erprobung sind z.B. Antisense-Nukleotide gegen Proteinkinase C- α , bcl-2, c-raf und gegen die R1- α Untereinheit der Proteinkinase A [23].

Weiterhin werden Rezeptortyrosinkinasen bereits für therapeutische Zwecke mit monoklonalen Antikörpern und synthetischen Tyrosinkinaseantagonisten ausgeschaltet. So wird mit Trastuzumab (HerceptinTM) ein monoklonaler Antikörper gegen das c-erbB-2 Onkogenprodukt therapeutisch bei Mammakarzinomen eingesetzt [2], [1], [34]. Zur Suppression des EGF-Rezeptors und des bcr-abl Fusionsproteins (bei chronisch myeloischer Leukämie) wurden zudem verschiedene synthetische Tyrosinkinaseantagonisten klinisch getestet citeRTK-Inhibitor-1, [67], [30], [14].

5.3 Identifizierung von Caveolin-1 als Suppressorgen in Ovarialkarzinomen und Sarkomen

Mittels Microarray-Hybridisierung wurde ein Expressionsverlust von Caveolin-1 in Ovarialkarzinomen gegenüber dem Normalovar nachgewiesen. Caveolin-1 ist der Hauptbestandteil von sogenannten Caveolae, bei denen es sich um Ω -

förmige Einstülpungen der Zellmembran handelt [38], [36], [32]. Caveolin-1 bindet und inaktiviert unterschiedliche Signalmoleküle, wie H-RAS, MEK1, ERK2, Serpentin-Rezeptoren, G-Proteine, eNOS und Tyrosinkinasen [31]. Da Caveolin-1 verschiedene Signalmoleküle inhibiert, wurde von der Arbeitsgruppe von Lisanti et al. vermutet, daß es sich um ein Tumorsuppressorgen handelt citeLisanti-Expression-in-mes-Zellen. Diese Hypothese wurde durch die Beobachtung gestützt, daß das Gen für Caveolin-1 (CAV1) auf Chromosom 7q31.1 in einer Region mit häufigen LOH-Ereignissen in Mamma-, Nieren-, Prostata- und Colonkarzinomen lokalisiert ist [13], [66], [65], [22], [40]. Weiterhin sind die ersten beiden Exons des CAV1-Genes von sogenannten CpG-Inseln umgeben. Im Bereich von CpG-Inseln ist genomische DNA häufig methyliert. Methylierte Gene sind häufig inaktiviert. Daher wird die Expression von CAV1 möglicherweise zum Teil durch Methylierung dieser CpG-Inseln gehemmt [12].

Caveolin-1 ist in normalem Ovaroberflächenepithel und in den auskleidenden Epithelien seröser Adenome exprimiert. Eine starke Expression ist weiterhin in mesenchymalen Normalgeweben nachweisbar. Sowohl in Ovarialkarzinomen (Wiechen et al., Manuskript eingereicht) als auch in Sarkomen [57] ist immunhistologisch ein deutlicher Caveolin-1-Expressionsverlust zu beobachten. Die heterologe Expression von Caveolin-1 hemmt zusätzlich die Koloniebildung von Ovarialkarzinom- und von Sarkomzellen. Daher ist Caveolin-1 wahrscheinlich ein wichtiges Tumorsuppressorgen, dessen Inaktivierung in die Entstehung von Ovarialkarzinomen und von Sarkomen involviert ist.

In HT-1080 Fibrosarkomzellen läßt sich Caveolin-1 durch Hemmung des RAS-

RAF-MAPK Signalweges wieder aufregulieren [57]. Die Regulation von Caveolin-1 durch den RAS-RAF-MAPK Signalweg stimmt mit Daten von Engelman et al. überein [13]. Da die Expression von Caveolin-1 in Sarkomzellen reversibel herunterreguliert ist, muß das CAV1 Gen intakt sein. Nach Daten von Hurlstone et al. [24] konnten in Ovarialkarzinomen und zahlreichen Tumorzelllinien ebenfalls keine Mutationen im CAV1 Gen nachgewiesen werden. Somit ist das CAV1 Gen wahrscheinlich nicht in die auf Chromosom 7q31.1 nachgewiesenen LOH-Ereignisse involviert. Suppressorgene, die reversibel herunterreguliert sind, werden als Klasse II Suppressorgene bezeichnet [24]. Klasse II Tumorsuppressorgene, wie Caveolin-1, können eventuell in Zukunft therapeutisch genutzt werden, wenn es gelingt ihre Expression in Tumoren durch Pharmaka wieder zu induzieren. So wurden in klinischen Pilotstudien bei chronisch myeloischer Leukämie mit Blastenkrise und bei myelodysplastischen Syndromen bereits hypomethylierende Substanzen wie 5-Aza-2'-Deoxycytidin eingesetzt, um Klasse II Tumorsuppressorgene, die durch eine aberrante Methylierung inaktiviert sind, im Tumor wieder aufzuregulieren [29]. Beispiele für Klasse II Tumorsuppressorgene, die in einem Teil der Tumoren durch Methylierung inaktiviert sind, sind E-Cadherin, der Östrogenrezeptor, der cyclin-abhängige Kinaseinhibitor p16^{INK4A} und der Angiogeneseinhibitor Thrombospondin-1 [29]. Da Caveolin-1 in humanen Tumoren möglicherweise zum Teil durch Methylierung des Genes supprimiert ist [12], wird die Methylierung des CAV1 Genes in Ovarialkarzinomen und Sarkomen zur Zeit untersucht.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Ovarialkarzinome haben aufgrund fehlender Frühsymptomatik und rascher intra-peritonealer Ausbreitung eine sehr schlechte Prognose. Die Ausgangszellen für Ovarialkarzinome sind die Ovaroberflächenepithelien, die wahrscheinlich durch aufeinanderfolgende genetische Alterationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgen mit einer zentralen Rolle bei der Wachstumsregulation, in Karzinomzellen transformiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion von zwei Rezeptortyrosinkinasen, des c-erbB-2 Onkogenproduktes und des Rezeptors für den insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor, in Ovarialkarzinomzellen analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, daß über diese Rezeptoren in Ovarialkarzinomzellen Funktionen vermittelt werden, die in vivo Tumorwachstum und Tumorprogression begünstigen können. Dies sind Zellproliferation, Transformation und Zellmotilität. Daher besteht vielleicht zukünftig die Möglichkeit die Hemmung dieser Rezeptortyrosinkinasen für die Therapie des Ovarialkarzinoms zu nutzen.

Weiterhin wurden Änderungen des Genexpressionsprofils zwischen Normalovar und Ovarialkarzinomen durch eine Microarray-basierte Technik untersucht. Aufgrund dieser Daten konnte in weiteren Studien Caveolin-1 als wahrscheinliches Tumorsuppressorgen in Ovar und Weichgewebe charakterisiert werden. Das Gen für Caveolin-1 ist in Ovarialkarzinomen und Sarkomen wahrscheinlich intakt und die Expression ist somit prinzipiell reversibel vermindert (sog. Klasse II Tumorsuppressorgen). Daher könnte es Zukunft möglich werden, Caveolin-1 durch

Pharmaka, wie zum Beispiel die hypomethylierende Substanz 5-Aza-2'-Deoxycytidin in Ovarialkarzinomen oder Sarkomen wieder zu exprimieren und die Tumorsuppressorfunktion therapeutisch zu nutzen.

Literaturverzeichnis

- [1] J. Baselga. Clinical trials of single-agent trastuzumab. *Semin. Oncol.*, 27:20–26, 2000.
- [2] J. Baselga. Current and planned clinical trials with trastuzumab. *Semin. Oncol.*, 27:27–32, 2000.
- [3] R. Baserga. The contradictions of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Oncogene*, 19:5574–5581, 2000.
- [4] R. Baserga, C. Sell, P. Porcu, and M. Rubini. The role of the igf-i receptor in the growth and transformation of mammalian cells. *Cell Prolif.*, 27:63–71, 1994.
- [5] P.O. Brown and D. Botstein. Exploring the new world of the genome with dna microarrays. *Nat. Genet.*, 21:33–37, 1999.
- [6] C.A.C. Carraway, M.E. Carvajal, Y. Li, and K.L. Carraway. Association of p185neu with microfilaments via a large glycoprotein complex in mammary carcinoma microvilli. *J.Biol.Chem.*, 268:5582–5587, 1993.
- [7] J.Q. Cheng, A.K. Godwin, A. Bellacosa, T. Taguchi, T.F. Franke, T.C. Hamilton, P.N. Tschlis, and J.R. Testa. Akt2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:9267–9271, 1992.

- [8] R.D. Christen, D.K. Hom, D.C. Porter, P.A. Andrews, C.L. MacLeod, L. Hafstrom, and S.B. Howell. Epidermal growth factor regulates the in vitro sensitivity of human ovarian carcinoma cells to cisplatin. *J. Clin. Invest.*, 86:1632–1640, 1990.
- [9] E.A. Clark, T.R. Golub, E.S. Lander, and R.O. Hynes. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for rhoc. *Nature*, 406:532–535, 2000.
- [10] C.R. De Potter, I. Eeckhout, A.-M. Schelfhout, M.-L. Geerts, and H.J. Roels. Keratinocyte induced chemotaxis in the pathogenesis of paget’s disease of the breast. *Histopathology*, 24:349–356, 1994.
- [11] L. Diatchenko, Y.-F. Lau, A.P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S.A. Lukyanov, K.A. Lukyanov, N.D. Gurskaya, E.D. Sverdlov, and P.D. Siebert. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cdna probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93:6025–6030, 1996.
- [12] J.A. Engelman, X.L. Zhang, and M.P. Lisanti. Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the d7s522 locus (7q31.1). methylation of a cpg island in the 5’ promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines. *FEBS Lett.*, 448:221–230, 1999.
- [13] J.A. Engelman, X.L. Zhang, B. Razani, R.G. Pestell, and M.P. Lisanti. p42/44 map kinase-dependent and -independent signaling pathways regulate

- caveolin-1 gene expression. activation of ras-map kinase and protein kinase a signaling cascades transcriptionally down-regulates caveolin-1 promoter activity. *J. Biol. Chem.*, 274:32333–32341, 1999.
- [14] S. Faderl, H.M. Kantarjian, M. Talpaz, and S. O'Brien. New treatment approaches for chronic myelogenous leukemia. *Semin. Oncol.*, 27:578–586, 2000.
- [15] H. Fukazawa, S. Mizuno, and Y. Uehara. A microplate assay for quantitation of anchorage-independent growth of transformed cells. *Anal. Biochem.*, 228:83–90, 1995.
- [16] D. Graus-Porta, R.R. Beerli, J.M. Daly, and N.E. Hynes. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all erbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.*, 16:1647–1655, 1997.
- [17] A. Grothey, R. Hashizume, and H. et. al. Ji. C-erbB-2/ her-2 upregulates fascin, an actin-bundling protein associated with cell motility, in human breast cancer cell lines. *Oncogene*, 19:4864–4875, 2000.
- [18] G. Hartmann, K.M. Weidner, H. Schwarz, and W. Birchmeier. The motility signal of scatter factor/hepatocyte growth factor mediated through the tyrosine kinase met requires intracellular action of ras. *J. Biol. Chem.*, 269:21936–21939, 1994.
- [19] J. Haseloff and W. Gerlach. Simple rna enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature*, 334:585–591, 1988.

- [20] R.M. Hudziak, J. Schlessinger, and A. Ullrich. Increased expression of the putative growth factor receptor p185her2 causes transformation and tumorigenesis of nih 3t3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84:7159–7163, 1987.
- [21] D. Huntsman, J.H. Resau, E. Klineberg, and N. Auersperg. Comparison of c-met expression in ovarian epithelial tumors and normal epithelia of the female reproductive tract by quantitative laser scan microscopy. *Am J. Pathol.*, 155:343–348, 1999.
- [22] R.B. Jenkins, J. Qian, H.K. Lee, H. Huang, K. Hirasawa, D.G. Bostwick, J. Proffitt, K. Wilber, M.M. Lieber, W. Liu, and D.I. Smith. A molecular cytogenetic analysis of 7q31 in prostate cancer. *Cancer Res.*, 58:759–766, 1998.
- [23] D.M. Kushner and R.H. Silverman. Antisense cancer therapy: the state of the science. *Curr. Oncol. Rep.*, 2:23–30, 2000.
- [24] S.W. Lee, C. Tomasetto, and R. Sager. Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88:2825–2829, 1991.
- [25] P. Liang and A.B. Pardee. Differential display of eukaryotic messenger rna by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257:967–971, 1992.
- [26] H.T. Lynch, M.J. Casey, J. Lynch, T.E. White, and A.K. Godwin. Genetics and ovarian carcinoma. *Semin. Oncol.*, 25:265–280, 1998.

- [27] H. Meden, Marx D., W. Rath, M. Kron, A. Fattahi-Meibodi, B. Hinney, W. Kuhn, and A. Schauer. Overexpression of the oncogene c-erbB2 in primary ovarian cancer: Evaluation of the prognostic value in a cox proportional hazards multiple regression. *Int.J.Gynecol.Pathol*, 13:45–53, 1994.
- [28] M. Müller, M Dietel, A. Turzynski, and K. Wiechen. Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide down-regulation of the insulin-like growth factor I receptor in ovarian cancer cells. *Int. J. Cancer*, 77:567–571, 1998.
- [29] R.L. Momparler and V. Bovenzi. Dna methylation and cancer. *J. Cell. Physiol.*, 183:145–154, 2000.
- [30] M.E. O'Dwyer and B.J. Druker. Status of bcr-abl tyrosine kinase inhibitors in chronic myelogenous leukemia. *Curr. Opin. Oncol.*, 12:594–597, 2000.
- [31] T. Okamoto, A. Schlegel, P.E. Scherer, and M.P. Lisanti. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 273:5419–5422, 1998.
- [32] R.G. Parton. Caveolae and caveolins. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 8:542–548, 1996.
- [33] S.E. Patton, M.L. Martin, L.L. Nelsen, X. Fang, G.B. Mills, R.C. Bast, and M.C. Ostrowski. Activation of the ras-mitogen-activated protein kinase pathway and phosphorylation of ets-2 at position threonine 72 in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.*, 58:2253–2259, 1998.

- [34] M. Pegram and D. Slamon. Biological rationale for her2/neu (c-erbB2) as a target for monoclonal antibody therapy. *Semin. Oncol.*, 27:13–19, 2000.
- [35] P.E. Scherer, Z. Tang, M. Chun, M. Sargiacomo, H.F. Lodish, and M.P. Lisanti. Caveolin isoforms differ in their n-terminal protein sequence and sub-cellular distribution. *J. Biol. Chem.*, 270:16395–16401, 1995.
- [36] A. Schlegel, D. Volonte, J.A. Engelman, F. Galbiati, P. Mehta, X.L. Zhang, P.E. Scherer, and M.P. Lisanti. Crowded little caves: structure and function of caveolae. *Cell Signal.*, 10:457–463, 1998.
- [37] R.E. Scully and P.B. Young. In: *Armed Forces, Institute of Pathology, Wash. D.C.*, chapter Atlas of Tumor Pathology, Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube and broad ligament. 1998.
- [38] N.J. Severs. Caveolae: static in-pocketings of the plasma membrane, dynamic vesicles or plain artifact? *J. Cell. Sci.*, 90:341–348, 1988.
- [39] L. Shayesteh, Y. Lu, W.L. Kuo, R. Baldocchi, T. Godfrey, C. Collins, D. Pinkel, B. Powell, G.B. Mills, and J.W. Gray. *Pik3ca* is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat. Genet.*, 21:99–102, 1999.
- [40] V. Shridhar, Q.C. Sun, O.J. Miller, G.P. Kalemkerian, J. Petros, and D.I. Smith. Loss of heterozygosity on the long arm of human chromosome 7 in sporadic renal cell carcinomas. *Oncogene*, 15:2727–2733, 1997.

- [41] K.S. Spencer, D. Graus-Porta, J. Leng, N.E. Hynes, and R.L. Klemke. ErbB-2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by erbB family receptor tyrosine kinases. *J. Cell. Biol.*, 24:385–397, 2000.
- [42] D.G. Stupack, S.Y. Cho, and R.L. Klemke. Molecular signaling mechanisms of cell migration and invasion. *Immunol. Res.*, 21:83–88, 2000.
- [43] H. Suwa, G. Ohshio, T. Imamura, G. Watanabe, S. Arii, M. Imamura, S. Narumiya, H. Hiai, and M. Fukumoto. Overexpression of the rhoc gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br. J. Cancer*, 77:147–152, 1998.
- [44] K. Takaishi, T. Sasaki, M. Kato, W. Yamochi, S. Kuroda, T. Nakamura, M. Takeichi, and Y. Takai. Involvement of rho p21 small gtp-binding protein and its regulator in the hgf-induced cell motility. *Oncogene*, 9:273–279, 1994.
- [45] M. Tan, J. Yao, and D. Yu. Overexpression of the c-erbB-2 gene enhanced intrinsic metastasis potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities. *Cancer Res.*, 57:1199–1205, 1997.
- [46] M.G. Teneriello, M. Ebina, R.I. Linnoila, M. Henry, J.D. Nash, R.C. Park, and M.J. Birrer. p53 and ki-ras gene mutations in epithelial ovarian neoplasms. *Cancer Res.*, 53:3103–3108, 1993.
- [47] J.D. Thompson. Strategies to express structural and catalytic rnas in mammalian cells. *Methods Enzymol.*, 306:241–260, 1999.

- [48] B.C. Turner, B.G. Haffty, L. Narayanan, J. Yuan, P.A. Havre, A.A. Gumbs, L. Kaplan, J.L. Burgaud, D. Carter, R. Baserga, and P.M. Glazer. Insulin-like growth factor- α receptor overexpression mediates cellular radioresistance and local breast cancer recurrence after lumpectomy and radiation. *Cancer Res.*, 57:3079–3083, 1997.
- [49] Y. Ueoka, K. Kato, Y. Kuriaki, S. Horiuchi, Y. Terao, J. Nishida, H. Ueno, and N. Wake. Hepatocyte growth factor modulates motility and invasiveness of ovarian carcinomas via ras-mediated pathway. *Br.J. Cancer*, 82:891–899, 2000.
- [50] V.E. Velculescu, L. Zhang, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. Serial analysis of gene expression. *Science*, 370:484–487, 1995.
- [51] V.V. Vlassov and L.A. Yakubov. *Oligonucleotides in cells and in organisms: pharmacological considerations*. In: E. Wickstrom (ed.) *Prospects for anti-sense nucleic acid therapy of cancer and AIDS*, pages pp. 243–266. Wiley-Liss, New York, 1991.
- [52] R.W. Wagner. Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature (Lond.)*, 372:333–335, 1994.
- [53] K. Wiechen and M. Dietel. c-erbB-2 anti-sense phosphorothioate oligodeoxynucleotides inhibit growth and serum-induced cell spreading of p185^{c-erbB-2}-overexpressing ovarian carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 63:604–608, 1995.

- [54] K. Wiechen, S. Karaaslan, and M. Dietel. Involvement of the c-erbB-2 oncogene product in the egf-induced cell motility of sk-ov-3 ovarian cancer cells. *Int. J. Cancer*, 83:409–414, 1999.
- [55] K. Wiechen, S. Karaaslan, A. Turzynski, and M. Dietel. Suppression of the c-erbB-2 gene product decreases transformation abilities but not the proliferation and secretion of proteases of sk-ov-3 ovarian cancer cells. *Br. J. Cancer*, 81:790–795, 1999.
- [56] K. Wiechen, H. Plendl, and W. Grote. Isoelectric focusing of amniotic fluid α -fetoprotein to improve diagnosis of neural tube defects. *Lancet*, 337:674, 1991.
- [57] K. Wiechen, C. Sers, A. Agoulnik, K. Arlt, M. Dietel, P.M. Schlag, and U. Schneider. Down-regulation of caveolin-1, a candidate tumor suppressor gene, in sarcomas. *Am. J. Pathol.*, (in press).
- [58] K. Wiechen, C. Zimmer, and M. Dietel. Selection of a high activity c-erbB-2 ribozyme using a fusion gene of c-erbB-2 and the enhanced green fluorescent protein. *Cancer Gene Ther.*, 5:45–51, 1998.
- [59] S. Yang, R. Delgado, S.R. King, C. Woffendin, C.S. Barker, Z.Y. Yang, L. Xu, G.P. Nolan, and G.J. Generation of retroviral vector for clinical studies using transient transfection Nabel. *Hum. Gene Ther.*, 10:123–132, 1999.

- [60] D. Yee, F.R. Morales, T.C. Hamilton, and D.D. Von Hoff. Expression of insulin-like growth factor i, its binding proteins, and its receptor in ovarian cancer. *Cancer Res.*, 51:5107–5112, 1991.
- [61] L. Yen, X.L. You, A.E. Al Moustafa, G. Batist, N.E. Hynes, S. Mader, S. Meloche, and M.A. Alaoui-Jamali. Heregulin selectively upregulates vascular endothelial growth factor secretion in cancer cells and stimulates angiogenesis. *Oncogene*, 20:3460–3469, 2000.
- [62] D. Yu, J.K. Wolf, M. Scanlon, J.E. Price, and M.C. Hung. Enhanced c-erbB-2/neu expression in human ovarian cancer cells correlates with more severe malignancy that can be suppressed by e1a. *Cancer Res.*, 53:891–898, 1993.
- [63] Z.Q. Yuan, M. Sun, R.I. Feldman, G. Wang, X. Ma, C. Jiang, D. Coppola, S.V. Nicosia, and J.Q. Cheng. Frequent activation of akt2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-oh kinase/akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene*, 19:2324–2330, 2000.
- [64] A.N. Zakharchuk, K.K. Doronin, V.A. Karpov, V.A. Krougliak, and B.S. Naroditsky. The fowl adenovirus type 1 (celo) virus-associated rna-encoding gene: a new ribozyme-expression vector. *Gene*, 161:189–93, 1995.
- [65] J.C. Zenklusen, I. Bieche, R. Lidereau, and C.J. Conti. C-a)n microsatellite repeat d7s522 is the most commonly deleted region in human primary breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91:12155–12158, 1994.

- [66] J.C. Zenklusen, J.C. Thompson, A.J. Klein-Szanto, and C.J. Conti. Frequent loss of heterozygosity in human primary squamous cell and colon carcinomas at 7q31.1: evidence for a broad range tumor suppressor gene. *Cancer Res.*, 55:1347–1350, 1995.
- [67] L. Zitella. Tyrosine kinase inhibitors: a cure for chronic myeloid leukemia? *Clin. J. Oncol. Nurs.*, 4:227–229, 2000.

*

A Abkürzungen

IGF-I	Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-I
IGF-IR	Rezeptor für den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-I
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
sODN	Phosphorothioat-Oligodeoxynukleotid
FKS	fetales Kälberserum
PI3K	Phosphatidyl-inositol 3-Kinase
MAPK	'mitogen activated protein kinase'
MEK	'MAP kinase or ERK kinase'
G418	Geneticin
EGFP	'Enhanced green fluorescent protein'
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
LTR	'long terminal repeat'
IRES	'internal ribosome entry site'
MFH	Malignes fibröses Histiozytom
LOH	'loss of heterozygosity'
VEGF	'vascular endothelial growth factor'

Danksagung

An erster Stelle möchte ich besonders Herrn Professor Dr. Manfred Dietel für zahlreiche Anregungen und seine langjährige und großzügige Unterstützung für die vorliegende Arbeit danken.

Nachdrücklich danken möchte ich auch Frau Dr. Christine Sers und Herrn Professor Dr. Reinhold Schäfer für die enge wissenschaftliche Zusammenarbeit und die offenen, sachbezogenen Diskussionen. Ohne die sich aus dieser Zusammenarbeit ergebende enge Verzahnung von Grundlagenforschung und histopathologischer Diagnostik wäre ein Teil der Projekte nicht realisierbar gewesen. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Frau Dr. Ulrike Schneider und Herrn Professor Dr. Peter M. Schlag für die Bereitstellung von Probenmaterial und die wissenschaftliche Kollaboration danken.

Der Arbeitsgruppe, ohne deren Unterstützung die vorliegenden Arbeiten nicht möglich gewesen wären, gilt mein besonderer Dank. Beteiligt waren bzw. sind Stephanie Wurr, Dörte Zacher und Susanne Metzkow als MTA's, Markus Müller, Selma Karaaslan, Bettina Prüße, Gina Marjoram, Hagen Schober und Katharina Arlt als Doktoranden.

Danken möchte ich auch Frau Dr. Charlotte Zimmer und Frau Dr. Aurelia Noske, die neben der Betreuung eigener Projekte in die Arbeitsgruppe neue Ideen und Impulse eingebracht haben.

Frau Margit Becker danke ich für die Hilfe bei den durchflußzytometrischen Mes-

sungen.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Veit Krenn für anregende und hilfreiche Diskussionen und die kritische Durchsicht der Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank der Deutschen Krebshilfe, der Berliner Krebsgesellschaft und der Forschungskommission der Charité für die großzügige Förderung der Projekte.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Kai Wiechen

Berlin, den 27. Februar 2001