

Aus dem Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der
Technischen Universität München
(Direktor: Univ-Prof. Dr. H. K. Höfler)

**Etablierung eines humanen T1-Protein spezifischen
Enzyme linked immunosorbent Assays (ELISA) an
Tumorextrakten von Mammakarzinomen**

Robert Schaich

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler
2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 08.07.2002 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.11.2002
angenommen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 T1-Protein – ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie	5
2. Zielsetzung	8
3. Patienten, Material und Methoden	9
3.1 ELISA	9
3.1.1 Mikrotiterplatte	9
3.1.2 Coating	9
3.1.3 Blockieren	9
3.1.4 Antigen	10
3.1.5 Entwickeln	10
3.1.6 Färbung	10
3.1.7 Messung	11
3.2 Endgültiges ELISA-Protokoll	11
3.3 Antigen	12
3.3.1 T1-S-flag Herstellung in High 5 Zellen	12
3.3.2 Affinitätsreinigung	12
3.4 Charakterisierung des hu T1-S-flag Protein	13
3.4.1 Photometrische Bestimmung	13
3.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford	13
3.4.3 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese	14
3.4.4 Western-Blot	17
3.4.5 Nachweis von Membrangebundenen Proteinen	17
3.5 T1-Protein positive Kontrollen	19
3.6 Monoklonale Antikörper	21
3.6.1 Immunpräzipitation	21
3.6.2 Biotinylierung monoklonaler Antikörper	21
3.7 Tumorextrakte	22
3.8 Patientenkollektiv	23
3.9 Chemikalien und sonstige Materialien	25

4.	Ergebnisse	27
4.1	T1 Antigen	27
4.2	Monoklonale Antikörper	28
4.2.1	Spezifität der monoklonalen Antikörper, Immunpräzipitation	29
4.2.2	Spezifität der monoklonalen Antikörper, ELISA	30
4.3	Optimierungen	31
4.3.1	Inkubationszeit	32
4.3.2	Reagenzien	32
4.3.3	Blockieren	34
4.3.4	Vergleich von hu T1-Fc mit hu T1-S-Flag als Antigen	35
4.3.5	Einfluß des Tumorextrakts	36
4.3.6	Biotinylierung	37
4.4	T1 Protein Tumorextrakte	41
4.4.1	Gesamtproteinkonzentration	41
4.4.2	T1-Proteinkonzentration	42
5.	Diskussion	46
6.	Zusammenfassung der Ergebnisse	53
7.	Literaturverzeichnis	55
8.	Abkürzungen	61

1. Einleitung

Brustkrebs ist die häufigste bösartige Erkrankung der Frau in der industrialisierten westlichen Welt. Im Laufe ihres Lebens erkrankt 1 von 10 Frauen (American Cancer Society 1994). Die Entstehung von Brustkrebs ist derzeit noch unklar, man glaubt aber, daß sich die Erkrankung wie Darmkrebs, über eine kaskadenartige Entwicklung von morphologisch unterscheidbaren Stadien von einer gutartigen Hyperplasie über eine Hyperplasie mit Atypien zu einem in situ Karzinom, und davon ausgehend, zu einem invasiven Karzinom entwickelt (Fearon et al., 1990; Russo et al., 1991; Simpson et al., 1997). Im Hinblick auf die individuelle Prognose von invasivem Brustkrebs hat der Befall von axillären Lymphknoten weiterhin den stärksten Einfluß. Brustkrebs mit axillären Lymphknotenmetastasen (Lymphknotenpositiv) zum Zeitpunkt der primären Operation hat mit einer Rezidivrate von 75% die schlechteste Prognose, dagegen bekommen nur 30% der Patienten mit Brustkrebs ohne Lymphknotenmetastase (Lymphknotennegativ) ein Rezidiv innerhalb eines 10-jährigen Beobachtungszeitraums (Clark et al., 1988).

Aktuelle Forschung zur Biologie von Brustkrebs konzentriert sich auf frühe Ereignisse der Tumorprogression und identifiziert tumorgekoppelte Veränderungen, z.B., Zellzyklusregulation und Wachstumsfaktor-Rezeptor-Signalerkennung, die mit dem Fortschreiten von lymphknotennegativem- zu metastasiertem Brustkrebs in Verbindung gebracht werden (DeMichele et al., 1997; Hoskins et al., 1995). In diesem Prozeß identifizierte Moleküle sind z.B., das Tumorsuppressorgen p53 (Barnes et al., 1993; Lipponen et al., 1993; Silvestrini et al., 1996; Soong et al., 1997) und Cyclin E und p27/kip1 (Porter et al., 1997) und könnten neue prognostische Marker für lymphknotennegativen Brustkrebs darstellen. Darüber hinaus wurde in den letzten Jahren das Vorkommen von verschiedenen niedermolekularen Substanzen, im wesentlichen

modifizierte Proteine und Nukleinsäuren, diskutiert. Diese große Zahl von Molekülen wurde im Hinblick auf ihre mögliche Verwendung als Prognosefaktoren für das Mammakarzinom untersucht. Inhalt dieser Untersuchungen waren z.B. Onkogene wie c-erbB-2 (Allred et al., 1992; Archer et al., 1995), der Urokinase-Typ-Plasminogenaktivator uPA (Schmitt et al., 1997), das Adhäsionsmolekül E-Cadherin (Rasbridge et al., 1993; Graff et al., 1995) und das Zytoskelettprotein Vimentin (Sommers et al., 1992).

Zuletzt wurde gezeigt, daß die Überexpression des löslichen T1-S Rezeptors in lymphknotennegativem Brustkrebs einen möglichen weiteren Indikator für Tumore mit geringem metastatischem Potential darstellt (Werenskiold et al., 2000; Prechtel et al., 2001).

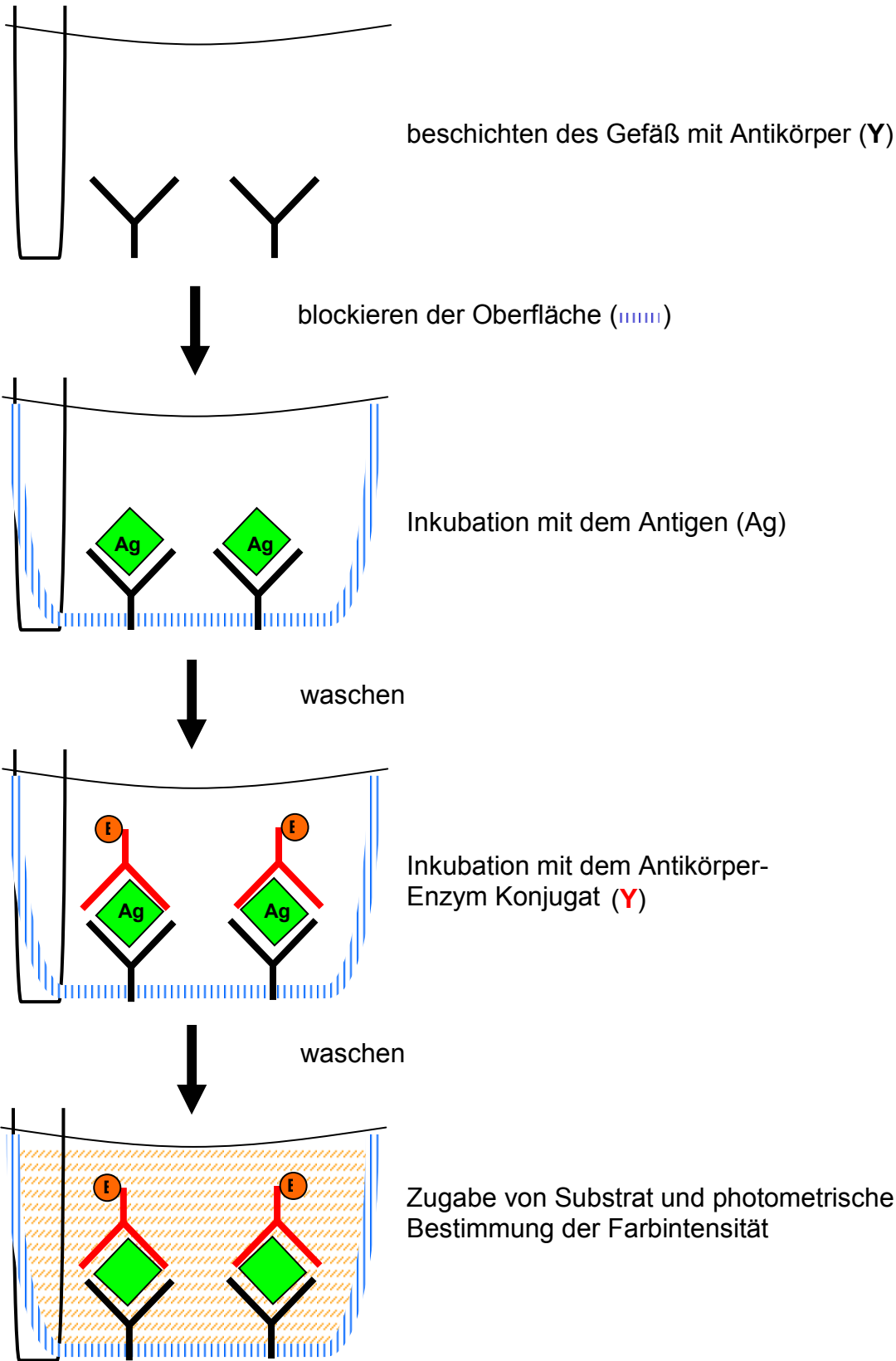
Wird heute die Funktion eines Proteins untersucht, so schließt das häufig auch seine Lokalisierung in vivo mit ein. Zum spezifischen Nachweis der mRNA, die solche Proteine codiert, stehen mehrere Methoden wie z.B. die „In situ“-Hybridisierung und RT-PCR zur Verfügung. Ein Protein dagegen kann spezifisch mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen eine einzige von vielen antigenen Determinanten des Agens gerichtet ist, oder einem polyklonalen Antiserum, einem Gemisch vieler Antikörper, nachgewiesen werden. Die Technik des „Enzyme-linked Immunosorbent-assays“ (**ELISA**) ermöglicht einen quantitativen Nachweis von Proteinen in Gewebeextrakten, Zelllysaten, Zellkulturüberständen sowie Körperflüssigkeiten.

Durch sogenanntes „Coating“ wird ein primärer Antikörper an eine feste Phase z.B. in Form von Mikrotiterplatten aufgebracht. Anschließend müssen freie Bindungsstellen der festen Phase in einem Vorgang den man Blockieren nennt versiegelt werden. Die so für die Inkubation mit dem Antigen vorbereitete Platte muß sorgfältig gewaschen werden um in einem nächsten Arbeitsschritt den sekundären Antikörper auftragen zu können. Dieser Antikörper ist kovalent mit einem Affinitätsreagenz markiert. Nach

erneutem Waschen schließt sich die Entwicklung des Tests durch Kopplung des Affinitätsreagenz mit seinem enzymmarkierten Substrat an. In einem abschließenden Schritt wird eine Übertragung reaktiver Gruppen des Substrats durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht und kann photometrisch quantitativ bestimmt werden (siehe Abb. 1) (Current protocols in molecular Biology, Vol 2, 1998).

Voraussetzung für die erfolgreiche Etablierung eines ELISAs ist das Vorliegen geeigneter, möglichst monoklonaler, Antikörper sowie einer Quelle für reines, ggf. rekombinantes, Antigen als internen Standard.

Abbildung 1: Antikörper-Sandwich ELISA zur Bestimmung spezifischen Antigens



1.1 T1-Protein – ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie

Der extrazellulär lösliche T1-S Rezeptor wurde ursprünglich als durch ein Onkogen induzierbares Protein von Maus Fibroblasten mit signifikanter Homologie zu den Interleukin-1 Rezeptoren und karzinoembryonalem Antigen entdeckt (Klemenz et al., 1989; Tominaga, 1989; Yanagisawa, 1993).

Strukturmerkmale sind ausgedehnte β -Faltblattstrukturen mit antiparallelen Strängen und eine Disulfidbrücke, die zahlreiche hydrophobe Seitenketten zwischen diesen Faltabschnitten verbindet. Die Mitglieder dieser Immunglobulinsuperfamilie üben so unterschiedliche Funktionen wie Antigenerkennung, Zelladhäsion und Signalrezeption aus. Abgesehen von dieser funktionellen Vielfalt scheinen alle diese Proteine an Zellinteraktion beteiligt zu sein. Zu dieser Superfamilie gehören z.B. Interleukin-1 Rezeptor, Interleukin-18 Rezeptor, die Toll Rezeptorfamilie, Immunglobuline, T-Zellrezeptoren, die MHC („major histocompatibility complex“)-Antigene oder Zelladhäsionsmoleküle wie N-CAM („neural cell adhesion molecule“). Einige, aber nicht alle dieser Moleküle besitzen Transmembrandomänen (Stryer, 1991).

Durch alternatives Spleißen werden zwei unterschiedliche T1-mRNA-Moleküle gebildet, die Informationen für zwei verschiedene Varianten des T1-Proteins tragen (Yanagisawa et al., 1993; Thomassen et al., 1995):

a) Ein sezerniertes „T1-S“-Protein (337 Aminosäuren) weist in seinen drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen eine Homologie zu den extrazellulären Teilen der IL-1-Rezeptoren auf (Tominaga, 1989; Tominaga et al., 1992). Es besitzt ein hydrophobes Leitpeptid sowie neun potentielle N-Glykosylierungsstellen und wird als 60-70 kDa großes Protein sezerniert, das in hohem Maße glykosyliert (N-Glykosylierung vom komplexen Typ) und sialyliert ist. Die reine Größe des unglykosylierten Polypeptids beträgt 38 kDa (Werenskiold, 1992).

b) Ein längeres „T1-M“-Protein (567 Aminosäuren) besitzt fast die gesamte T1-S-Sequenz, die wohl einen extrazellulären Rezeptorbereich darstellt, zusätzlich eine putative Transmembran- (24 Aminosäuren) und eine putative cytoplasmatische Domäne (201 Aminosäuren). Der cytoplasmatische Teil des T1-M Proteins ist wiederum der intrazellulären Region des IL-1RI Rezeptor homolog (Yanagisawa et al., 1993). T1-M ist wie T1-S in hohem Maße glykosyliert, 90-100 kDa groß und tritt an Membranen gebunden auf (Thomassen et al., 1995).

Die verwandten T1-S Rezeptoren der Ratte (fit-1 S) und des Menschen (ST2) zeigen eine hoch entwickelte Ähnlichkeit: Das menschliche 328 Aminosäuren lange T1-S/ST2 Peptid ist zu 67,6% und 63,5% den jeweiligen Proteinen aus Maus und Ratte verwandt (Bergers et al., 1994; Tominaga et al., 1992). Das T1-Gen ist bei Maus und Mensch eng gekoppelt mit den IL-1-Rezeptoren (Sims et al., 1995) und die Sequenz des menschlichen T1 Gens bereits teilweise bekannt (Tominaga et al., 1992). Trotz der Ähnlichkeit der ligandenbindenden Domäne von T1-S bzw. T1-M zu den IL-1-bindenden Proteinen zeigen diese Proteine keine Affinität zu IL-1 α oder IL-1 β (Rößler et al., 1995). Es muß angenommen werden, daß die T1 Proteine mit einem noch unbekanntem Liganden interagieren (Gayle et al., 1996).

Die Expression des T1-S Rezeptors im Gewebe der Maus ist in der Entwicklung eingeschränkt (Rößler et al., 1995). Der T1-S Rezeptor wird ausschließlich in der Phase der dukalen Reifung der Brustdrüsen junger Mäuse (3-4 Wochen nach Geburt) gefunden, nicht aber während der Enddifferenzierung und Laktation. Eine davon abweichende erneute Expression von T1-S mRNA wurde für invasive Adenokarzinome der Brust in H-ras-Onkogen transgenen Mäusen gezeigt (Rößler et al., 1993). Der membranständige Rezeptor kommt natürlicherweise auf Mastzellen, Erythrozyten (Thomassen et al., 1995) und T-Helfer Zellen vor und scheint mit der Funktion von T-

Helfer Zellen Typ 2 verbunden zu sein (Löhning et al., 1998; Xu et al., 1998; Hoshino et al., 1999).

In menschlichen Tumoren der weiblichen Brust konnte die Überexpression von T1-S mRNA bisher semi-quantitativ über RT-PCR, in situ Hybridisierung oder immunhistochemisch nachgewiesen werden (Werenskiold et al., 2000; Prechtel et al. 2001). In diesen Arbeiten wurde gezeigt, daß die T1-S Rezeptor Überexpression ein neuer und unabhängiger biologischer Marker für das langsamere Fortschreiten von lymphknotennegativem Brustkrebs sein könnte.

2. Zielsetzung

Da das T1-S-Protein bisher nur semiquantitativ über RT-PCR (s.o.) bestimmt werden konnte, war es das Ziel dieser Arbeit, einen ELISA zur quantitativen T1-S- Proteinbestimmung aus Tumorextrakten zu etablieren.

Anschließend sollte die Korrelation der erhaltenen ELISA-Daten mit dem immunhistochemischen Nachweis von T1-S Rezeptor in Brustdrüsengewebe, sowie deren RNA Gehalt untersucht werden.

3. Patienten, Material und Methoden

3.1 ELISA

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verfahren des Indirekten Nachweises gewählt. Die Bedingungen zum Nachweis von hu T1-S mittels ELISA wurden hierfür optimiert (siehe Kap. 4).

3.1.1 Mikrotiterplatten

Es wurden Mikrotiterplatten der Fa. Nunc verwendet.

3.1.2 Coating

Beim Coating wurden pro well einer Mikrotiterplatte 200µl einer 2µg/ml Protein in Natriumcarbonatpuffer pH 9,5 enthaltenden Lösung des Antikörpers II6E3 pipettiert und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde die Platte ausgeschüttet und auf einem Papierhandtuch „trockengeschlagen“.

3.1.3 Blockieren

Die Blockierung freier Proteinbindungsstellen auf der Mikrotiterplatte erfolgte durch erneutes Auftragen von je 200µl Blockierungspuffer pro Kammer der Mikrotiterplatte. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Platte ausgeschüttet, dreimal mit PBS gewaschen und auf einem Papierhandtuch „trockengeschlagen“.

3.1.4 Antigen

Zur Bestimmung einer Eichkurve wurde eine Verdünnungsreihe von hu T1-S-Flag in Konzentrationen von 50ng/ml bis 0,39ng/ml in 1:1 Verdünnungsstufen, sowie zur Konzentrationsbestimmung der Tumorextrakte eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 erstellt und aufgetragen. Eine Verdünnung des Antigens erfolgte jeweils in einer Lösung von 1% BSA in PBS.

3.1.5 Entwickeln

Die Entwicklung des ELISA erfolgte durch eine erneute Inkubation mit dem biotinmarkierten sekundären Antikörper 143, der in einer Konzentration von wiederum 2µg Protein/ml in einer Lösung von 1% BSA in PBS gelöst wurde. Erneut wurden 200µl der Lösung pro Kammer der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Bindung erfolgte über zwei Stunden bei Raumtemperatur.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS schloß sich die Einleitung der Färbung mit der Zugabe von 200µl einer Lösung von StreptAvidin-POD in einer Verdünnung von 1:10000 an, wobei für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

Es erfolgte anschließend erneut gründliches Waschen mit 3 x PBS zur vollständigen Entfernung von ungebundenen Enzymresten.

3.1.6 Färbung

Die Färbung erfolgte durch Zugabe von 150µl 1-Step™ Turbo-Tetramethylbenzidin (Fa. Pierce) pro Kammer und die Entwicklung für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 100µl 2 M Schwefelsäure gestoppt.

3.1.7 Messung

Die Messung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm im DigiScan der Fa. Asys Hitech.

Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.2 Endgültiges ELISA Protokoll

Coating:	2µg/ml AK II6E3 in Na ₂ CO ₃	O/N KS
Waschen:	3 x PBS (kurz)	
Blockieren:	PBS/ 0,5%BSA, 2,5% Milchpulver	30min RT
Waschen:	3 x PBS	
Antigene:	in PBS/1%BSA verdünnt	O/N KS

hu T1-S-Flag 50/25/12,5/6,25/3,125/1,56/0,78/0,39 ng/ml

Tu-Extrakte 1:10 – 1:80 Verdünnung

Waschen:	3 x PBS	
Biotinylierter sekundärer Antikörper	2µg/ml AK 143 in PBS/1%BSA	2h RT
Waschen:	3 x PBS	
Streptavidin-POD:	(Fa. Roche, 1:10000 Verd. in PBS)	30min RT
Waschen:	3 x PBS	
TMB-Färbung:	150 µl Turbo-TMB (Fa. Pierce)	30min RT
Stoppen:	100µl 2M H ₂ SO ₄	
Messung:	450nm/620nm(Referenzwellenlänge)	

3.3 Antigen

3.3.1 T1-S-Flag Herstellung in High 5 Zellen (Rupp 1995).

High 5 Zellen wurden mit dem T1-S-Flag-rekombinanten Baculovirus infiziert und nach maximal 4 Tagen geerntet.

3.3.2 Affinitätsreinigung

Der Zellkulturüberstand wurde einmal filtriert und anschließend sterilfiltriert. Das Filtrat wurde über eine anti Flag Mab2 Sepharose Säule gereinigt. Zunächst wurden in eine Säule 100 μ l der anti Flag Mab2 Sepharose „gepackt“ und mit 100mM Glycin-HCl pH 3,5 regeneriert. Nach Äquilibrieren des Säulenmaterials mit PBS wurde der filtrierte Zellkulturüberstand zweimal über die Säule gegeben, um eine möglichst hohe Bindung zu erreichen. Ungebundene Proteine wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Im Anschluß erfolgte die Elution des Antigens durch 0,5ml Aliquots einer Lösung von 50 μ l Flag Peptid (c= 5mg/ml; Bindungskapazität: 25 nm Flagprotein /ml) in 2,5ml PBS, die jeweils getrennt aufgefangen wurden. Die Proteinkonzentration der Eluate wurde photometrisch bestimmt (s.u. Punkt 3.4.1). Die Säule wurde mit 0,5ml PBS gespült, das ebenfalls aufgefangen wurde. Zuletzt wurde noch einmal mit 100mM Glycin-HCl pH 3,5 ad 100 μ l Tris-Puffer pH 7-8 gebundens T1-S-Flag von der Säule gewaschen. Reinheit und Größe des eluierten T1-S-flag Proteins in den einzelnen Fraktionen wurde mittels SDS-Gelelektrophorese kontrolliert (s. u.). Die erhaltenen Eluate mit den höchsten Konzentrationen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration bei 3000 G durch einen 10 KiloDalton (blau) Filtron Porenfilter auf das 2 – 10 – fache (200 μ l) konzentriert, anschließend mit PBS auf 2ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert bis ein Volumen von ca. 200 μ l verblieb. Abschließend erfolgte eine erneute

photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung und die Kontrolle durch Gelelektrophorese (s.u.Punkt 3.4.1 ff).

3.4 Charakterisierung des huT1-S-Flag Proteins

3.4.1 Photometrische Bestimmung (Harlow and Lane, 1988):

Die Probe wurde in einer Quarzküvette bei $\lambda=280$ nm gegen den Probenpuffer (PBS) gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei einer Schichtdicke von 1cm über die Formel:

$$1 \text{ O.D. (280nm)} \quad \cong \quad 0,7\text{mg Protein/ml}$$

die anhand von Immunglobulin G gewonnen wurde. Bei Lösungen anderer Proteine ist das Verhältnis zum Teil anders, z.B. bei BSA: $0,7 \text{ O.D. } 280\text{nm} \cong 1\text{mg Protein/ml}$.

Da das T1-S-Protein zur Immunglobulinsuperfamilie gehört, ist die Konzentrationsabschätzung einer Lösung, die ein T1-S-Fragment enthält, mit obiger Formel genauer.

3.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976):

Eine Konzentrationsbestimmung von Proben, die über 1% Detergenz enthalten (BioRad-Anleitung zum Bradford-Test), ist nicht möglich, da die stöchiometrische Bindung des Farbstoffes gestört ist.

Die Proben für die Eichkurve (1-25 mg/ml BSA) wurden mit Wasser in einem Gesamtvolumen von 160 μl in eine Mikrotiterplatte (Fa. Nunc) gegeben und mit 40 μl Bradford-Reagenz (BioRad) gemischt. Nach 15 min bis 1 h wurde die O.D. bei 595nm gemessen.

3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Lämmli, 1970):

Es wurde die kleine Gelapparatur von Biometra verwendet.

10x SDS Laufpuffer:

250mM Tris

1,92M Glycin

0,5% SDS

pH 8,3

Trenngel: 12,5%

30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid 2,5ml

1M Tris/HCl, pH 8,8 2,25ml

20% SDS 30µl

H₂O 1ml

50% Glycerin 150 µl

TEMED 2µl

10% APS 30µl

Das Sammelgel wurde direkt auf das Trenngel gegossen.

Sammelgel:

30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid 0,33ml

1M Tris/HCl, pH 6,8 0,5ml

20% SDS 10µl

H₂O 1,17ml

TEMED 5µl

10% APS 10µl

Bromphenolblau wurde zu dem Sammelgel gegeben, um die Taschen sichtbar zu machen.

2x SDS-SB („sample buffer“):

1M Tris/HCl, pH 6,8 1,25ml

10% SDS	5,0ml
87% Glycerin	2,0ml
β-Mercaptoethanol	1,0ml
0,25% Bromphenolblau	0,75ml ∑ 10ml

Die Proben enthielten 1-fach konzentrierten SDS-SB und wurden 5 – 10 Minuten auf 95°C erhitzt, um alle Proteine zu denaturieren. Durch Zentrifugation wurden unlösliche Verunreinigungen sedimentiert.

Nach dem Probenauftrag lief das Gel 10min. bei 90Volt ein, die Auftrennung wurde dann 1h bei 160Volt durchgeführt.

Als Proteinmolekulargewichtsstandard wurde der Full Range Rainbow Marker RPN 800 von der Firma Amersham verwendet.

Silberfärbung

Fixierer:

30% (v/v)	Ethanol
10% (v/v)	Essigsäure
in H ₂ O bidest	

Reduzierlösung:

30ml	Ethanol
65ml	H ₂ O bidest
3,3ml	3M Natriumacetat
100mgThiosulfat	
ad 100ml	H ₂ O bidest

Silberlösung:

100mgSilbernitrat	
ad 100ml	H ₂ O bidest

25µl Formaldehyd (37%)

Entwickler:

2,5% (w/v) Na₂CO₃ (12,5% Stammlösung)

ad 100ml H₂O bidest

50µl Formaldehyd (37%)

Die Lösungen wurden immer frisch angesetzt und das Gel wurde wie nachfolgend geschildert angefärbt.

1x Fixierer mind. 30min. (bis über Nacht)

1x Reduzierlösung 30min

3x H₂O bidest 10min

1x Silberlösung 30min

Danach wurde das Gel sorgfältig mit Wasser abgespült und in einem anderen Gefäß Entwickler zugegeben. Sobald die Banden gut sichtbar waren, wurde die Reaktion durch Zugabe von Essigsäure (Endkonzentration 1%) gestoppt. Vor dem Trocknen wurde das Gel mit Wasser gewaschen.

3.4.4 Western Blot (Übertragung von Proteinen auf Nylonmembranen)

Zur Übertragung von Proteinen auf eine Immobilon PVDF-Membran (Pall, Eschborn) wurde die Fast Blot B33-Apparatur von Biometra, München, verwendet.

Transferpuffer:

Tris 20 mM

Methanol 20% (v/v)

Glycin 150 mM

pH 8,3

Durchführung:

Die schwer benetzbare Immobilon-P-Membran wurde 5 min. in Methanol äquilibriert, mit Wasser angefeuchtet und dann mit Transferpuffer gewaschen. In der Blot-Apperatur kamen auf drei Lagen mit Transferpuffer getränktem 3 MM Papier (Whatman) die Membran, das SDS-Gel mit den aufgetrennten Proteinen und abermals drei Lagen puffergetränktes 3 MM Papier. Luftblasen wurden entfernt und überschüssige Flüssigkeit abgesaugt. Transferiert wurden die Proteine bei 4 mA/cm² Gel für 30 Minuten. Der Western-Blot wurde entweder sofort zur Hybridisierung eingesetzt oder getrocknet und aufbewahrt. Eine getrocknete Membran mußte vor der Verwendung wieder mit Methanol und aq. bidest. angefeuchtet werden.

3.4.5 Nachweis von membrangebundenen Proteinen (Blake et al., 1984)

Auf Membranen gebundene Proteine wurden durch eine Antikörperreaktion wie folgt sichtbar gemacht. Das spezifische Antigen auf der Membran wird von einem enzymmarkierten Antikörper erkannt und gebunden. Ein Substrat bindet kovalent an das Enzym, das in einer Farbreaktion ein sichtbares Signal erzeugt und somit eine Lokalisierung des gesuchten Proteins möglich macht.

Lösungen:

TBS, pH 7,4

0,05 M Tris,

0,15 M NaCl

Milchpuffer, pH 9

2,5% (w/v) Magermilchpulver

0,05% (v/v) Tween 20

in TBS, pH 10

Färbelösungen:

Alkalische Phosphatase(AP):

AP-Puffer, pH 9,5

Tris/HCl 100 mM

NaCl 100 mM

MgCl₂ 5 mM

X-Phosphat: „5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat“ (BCIP)

X-Phosphat-Stammlösung

X-Phosphat (BCIP) 50mg/ml

in Dimethylformamid

NBT-Stammlösung Nitroblau-Tetrazolium 50mg/ml

in 70% DMF

AP-Färbelösung X-Phosphat-Stammlösung 30µl/10ml

NBT-Stammlösung 66µl/10ml

in AP-Puffer

Antikörperverdünnungen:

Primärer Antikörper

Mab2 (anti Flag) biotin 10 µg/ml

Substrat:

Streptavidin-AP 1:5000 in TBS

Durchführung:

Alle Inkubationen werden im Rollofen bei 37°C durchgeführt.

Die feuchte Immobilon-P-Membran wird über Nacht in 5 ml Milchpuffer (in 50ml Falcon-Röhrchen) im Kühlraum gewaschen, um unspezifisch bindende Reste der Membran zu blockieren. Die Hybridisierung mit dem ersten Antikörper erfolgt für 1 h bei 37°C. Dann wurde die Membran 3x mit TBS gewaschen und mit Streptavidin-AP ebenfalls für 1 h inkubiert und wieder 3x mit TBS gewaschen. Anschließend wird die Membran fünf Minuten in AP-Puffer äquilibriert. Durch Zugabe von 30µl NBT und

30µl BCIP zu 10 ml AP-Puffer wird die Membran bis zu 30 min gefärbt und die Reaktion mit Wasser gestoppt, wenn sich die Banden deutlich abzeichnen.

3.5 T1-Protein positive Kontrollen

Tabelle 1 zeigt Zelllinien und Gewebe, für die im Labor ein hoher Gehalt an T1-Protein nachweisbar war, und die als interne positive Kontrolle verwendet wurden.

Tabelle 1: T1-Protein Positivkontrollen

Gewebe/Zelllinie	T1-Protein	Nachweis
HMC-1 (Mastzellen)	T1-M-Rezeptor + wenig T1-S-Protein	Immunhistochemie Northern-Blot, RT-PCR
HaCat (Keratozyten)	Wenig T1-M- Rezeptor in Zellen, T1-S- Protein im Medium	Immunhistochemie Northern-Blot
Placenta	Alle Formen	Immunhistochemie Northern-Blot, RT-PCR

3.6 Monoklonale Antikörper

Zu Beginn der Arbeit stehen fünf gegen humanes T1 (huT1-S-Fc) gewonnene monoklonale Antikörper der Fa. Immunex (Seattle, USA) zur Verfügung . Im weiteren Verlauf erhielten wir sechs weitere Antikörper durch eine Kooperation mit dem DRFZ Berlin. Alle Antikörper sind gegen das rekombinante huT1-S-Fc Protein aus COS Zellen hergestellt und es ist nur die Spezifität für rekombinantes huT1Fc bekannt (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Namen, Klassifizierung und Ursprung der monoklonalen Antikörper

Labor-Nr	Offizielle Bezeichnung	Isoform	Herkunft
140	140	Ratte IgG2a	Immunex
141	141	Ratte IgG1	Immunex
142	142	Ratte IgG1	Immunex
143	143	Ratte IgG1	Immunex
144	144	Ratte IgG2a	Immunex
1	II7B8	Maus IgG2b	DRFZ
2	5`C7/2	Maus IgG1	DRFZ
3	5`C7/4	Maus IgG1	DRFZ
4	5`C7/9	Maus IgG1	DRFZ
5	4`A8/1	Maus IgG1	DRFZ
6	II6E3	Maus n. bek.	DRFZ

3.6.1 Immunpräzipitation

In ein ERG pipettiert man 20µl des ungereinigten hu T1-S-Flag -haltigen Protein-überstands infizierter High 5 Insektenzellen und gibt 2µg Antikörper hinzu. Anschließend werden 15µl Protein G-Sepharose (Pierce) zugegeben und über Nacht unter Schütteln im Kühlschrank inkubiert. Die Proben werden jetzt kurz zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und aufgehoben. Das Präzipitat wird dreimal mit 500µl PBS/0,05% Tween 20 gewaschen, die 3. Waschlösung mit einer ausgezogenen Pasteur-Pipette oder Kapillare vollständig abgehoben. Die

Präzipitate werden mit je 10µl 2x SDS Probenpuffer, die Überstände mit 5µl 5x SDS Probenpuffer versetzt und bei 90°C 5 min erhitzt, um alle Proteine zu lösen. Durch kurze Zentrifugation werden unlösliche Bestandteile sedimentiert.

Die Proteintrennung und Identifizierung erfolgt durch eine SDS Gelelektrophorese wie unter Punkt 3.4.3 beschrieben und anschließendem Western Blot.

3.6.2 Biotinylierung monoklonaler Antikörper

Biotin ist eine niedermolekulare Substanz, die hier als Affinitätsreagens verwendet wird. Es wird ein Biotin labeling Kit der Fa. Boehringer Mannheim verwendet und modifiziert (Sorensen, 1996).

Lösungen:

PBS

Biotin-7-NHS-Lösung (immer frisch zubereitet)

5mg Biotin-7-NHS wurden in 250µl DMSO gelöst um eine Konzentration von 20mg/ml zu erhalten und 1:10 verdünnt (c=2mg/ml).

Slide-A-Lyzer™ Dialyse Kassette (Pierce Chemical)

Durchführung:

Zunächst wird die Dialyse-Membran in PBS für 2 – 3 min angefeuchtet. Anschließend erfolgt das Umpuffern der Antikörper durch Einbringen der Probe in die Kammer und Äquilibrierung der Kassette mit Hilfe eines Schwimmers in 500ml PBS für 2 h bei Raumtemperatur. Der molare Reaktionsansatz beträgt 1:10. Eine entsprechende Menge Biotin-7-NHS Lösung wird jetzt über die Schleuse in die Kammer gegeben, dabei verbleibt eine kleine Luftblase in der Kassette. Die Kassette wird flach auf einem Schütteltisch fixiert, der so eingestellt wird, dass eine sanfte Bewegung der Luftblase sichtbar ist. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wird das überschüssige Biotin durch Dialyse gegen 500ml PBS (2 Wechsel) über Nacht entfernt.

Anschließend erfolgt die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration, Trennung durch eine SDS-Gelelektrophorese, Transfer im Western-Blot und Nachweis der Biotinylierung durch Hybridisierung mit Streptavidin-AP und Färbung mit NBT/BCIP (s.o. Punkt 3.5.5).

3.7 Tumorextrakte

Zur Herstellung der Tumorextrakte wird aus der „Tumorbank“ des Instituts für Pathologie der Technischen Universität für 26 Fälle tiefgefrorenes, unfixiertes Gewebe ausgewählt.

Das tiefgefrorene Gewebe wird makroskopisch untersucht und im Bereich des Tumors mit Hilfe eines scharfen Spatels ein etwa reiskorngroßes Stück entnommen. Das Tumorgewebe wird in einem 1,5ml ERG mit 500µl PBS/1% TritonX 100 versetzt und 10 Minuten mit Hilfe eines Pistills mechanisch zerkleinert. Die Suspension wird vollständig in ein 2,0ml großes ERG überführt. Zur Extraktion der Proteine wird die Gewebesuspension über Nacht im Kühlschrank unter Rühren inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile werden abzentrifugiert und der Gesamtproteingehalt des Tumorextrakts mit Hilfe des Bradford-Test bestimmt (s.o. Punkt 3.4.2).

3.8 Patientenkollektiv

Für diese Untersuchung wird aus der „Tumorbank“ des Institutes für Pathologie der Technischen Universität München Fälle von invasiven nodal negativen (N0) Mammakarzinomen unterschiedlichen histologischen Typs ausgewählt. Auswahlkriterien sind dabei der Zugang sowohl zu Formalin-fixiertem als auch zu tiefgefrorenem, unfixiertem Gewebe. Der T1-Proteingehalt wird immunhistochemisch, der T1-RNA Gehalt mit semi-quantitativer reverser Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion bestimmt (Wernskiold et al.; 2000).

Untersucht wird eine Gruppe von insgesamt 26 Patientinnen, die in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Klinikum rechts der Isar, der Technischen Universität München zwischen 1990 und 1993 primär operativ mit brusterhaltender Chirurgie oder Mastektomie und Axilladisektion behandelt wurden. Bei keiner Patientin gab es zum Zeitpunkt der Operation einen Anhalt für Lymphknoten- oder Fernmetastasen (N0, M0). Zum Zeitpunkt der Operation lag das Alter der Patientinnen zwischen 42 und 86 Jahren (Durchschnitt: 61,8 Jahre). Die Größe des Primärtumors (pT) und des regionären Lymphknotenstatus (pN) wurden makroskopisch, und durch histopathologische Untersuchung an Paraffinschnitten nach den Richtlinien der Tumor-Node-Metastasis (TNM) Klassifikation der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) bestimmt (Sobin LH et al.; 1997). Differenzierung (G) wurde durch eine histologisch-zytologische Beurteilung bewertet (Baessler R et al.; 1992), ausgenommen lobuläre Karzinome. Östrogen- und Progesteronrezeptor Expression wurde immunhistochemisch bestimmt und nach Remmele und Stegner bewertet (Remmele W, Stegner HE, 1987).

3.9 Chemikalien und sonstige Materialien

Die allgemeinen Laborchemikalien wurden bei den Firmen *Merck, Darmstadt* und *Sigma, München* bezogen. Der Reinheitsgrad war „pro analysi“.

Außerdem wurden verwendet:

ABC-Vector-Staining Kit	<i>Camon, Wiesbaden</i>
30% Acryamid/0,8% Bisacrylamid („Rotiphorese Gel 30“)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Anti-Flag Mab2 Sepharose Säule	<i>Sigma, München</i>
Anti-Flag® M2 monoklonaler Antikörper	<i>Sigma, München</i>
Anti-Flag® M2 biotinylierter monoklon. Antikörper	<i>Sigma, München</i>
Flag® Peptid	<i>Sigma, München</i>
BCIP	<i>Boehringer, Mannheim</i>
„Biotin Labeling Kit“	<i>Boehringer, Mannheim</i>
Bradford Reagenz	<i>BioRad, München</i>
Bromphenolblau	<i>Merck, Darmstadt</i>
Extravidin-POD	<i>Sigma, München</i>
Filtron-Membran (blau) 10Kda	<i>Filtron</i>
FKS	<i>Pan Systems, Aidenbach</i>
Mikrotiterplatten	<i>Nunc, Feldafing</i>
Molekulargewichtsmarker(RPN 800)	<i>Amersham</i>
NBT/X-phosphat	<i>Boehringer, Mannheim</i>
PVDF-Membran	<i>Pall, Eschborn</i>
Rinderserumalbumin (BSA)	<i>Sigma, München</i>
„Slide-A-Lyzer™ Dialyse Kassette“	<i>Pierce, KMF, Sankt Augustin</i>
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	<i>Eurobio, Frankreich</i>
Streptavidin-POD	<i>Boehringer, Mannheim</i>

TEMED

Pharmacia LKB, Freiburg

TMB-Tabletten

Sigma, München

„1-Step™ Turbo TMB-ELISA“

Pierce, KMF, Sankt Augustin

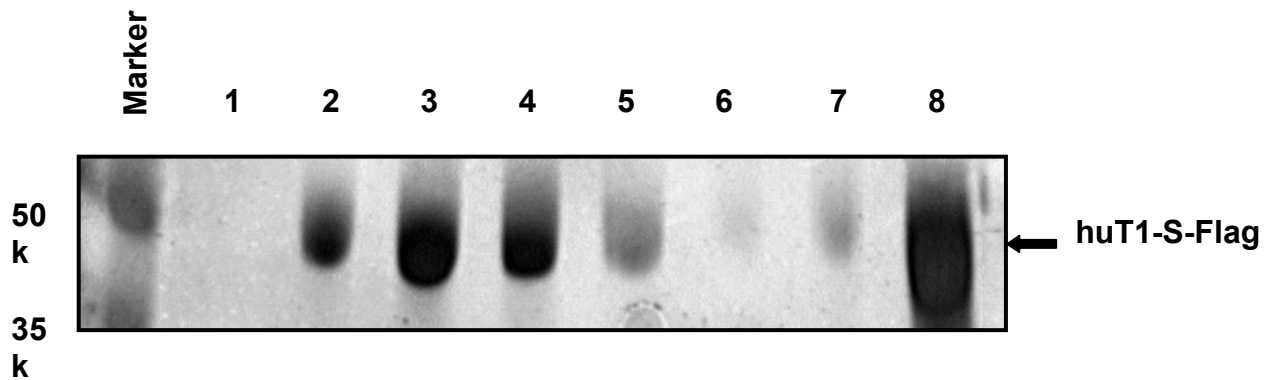
4. Ergebnisse

4.1 T1-Antigene

Als Referenz und interner Standard für die ELISA-Untersuchungen steht zu Beginn der Arbeit ein hu T1-S-Fc Fusionsprotein zur Verfügung, das rekombinant in Säugerkzellen (COS) hergestellt wird. HuT1-S-Fc enthält die vollständige Aminosäuresequenz des humanen T1-S Proteins fusioniert an eine C-terminale konstante Region (Fc) eines Antikörpermoleküls. Das stark glykosylierte Fusionsprotein liegt im Zellkulturüberstand als Dimer (Molekulargewicht: 180kD) vor. Es wird mittels Affinitätschromatographie an ProteinA Sepharose gereinigt. Da der Fc-Teil sowohl des huT1-S-Fc Proteins als auch derjenige der im Zellkulturmedium vorliegenden bovinen Immunglobuline mit hoher Affinität an ProteinA binden, sind die Präparationen des rekombinanten Proteins mit bovinen Immunglobulinen verunreinigt.

Ein erstes Ziel der Arbeit war es deshalb, monomeres, gering glykosyliertes rekombinantes hu T1-S in hochreiner Form herzustellen. Hierfür wurde ein Baculovirus-Expressionssystem gewählt, das bereits erfolgreich für die Produktion und Reinigung von rekombinantem murinem T1-S Protein aus Insektenzellen eingesetzt worden war (Rupp, 1995). Das sezernierte hu T1-S Protein wird aus Zellkulturüberstand gewonnen, aufgereinigt und konzentriert. Abbildung 2 zeigt eine Silberfärbung, nach denaturierender SDS-Gelelektrophorese, der einzelnen Eluat-Fractionen einer hu T1-S Proteinreinigung. Aufgrund der Glykosylierung des hu T1-S-Flag Proteins läuft es als diffuse Bande. In den einzelnen Spuren sind keine anderen Proteinbanden sichtbar, als Hinweis für eine hohe Reinheit (>95 %) des gereinigten Proteins. Die Fractionen mit den höchsten Konzentrationen (Spur 3, 4 und 5) wurden vereinigt und konzentriert. Aus 50 ml Zellkulturmedium konnten 15 µg gereinigtes Protein gewonnen werden. Die Konzentration betrug 0,076 mg/ml huT1-S-flag.

Abbildung 2: SDS-Gel der Affinitätsreinigung (Silberfärbung)



Spuren 1-7: Eluatfraktionen, Spur 8: ungereinigter Zellkulturüberstand.

4.2 Monoklonale Antikörper

Zu Beginn der Arbeit standen fünf gegen humanes T1-S-Fc gewonnene monoklonale Antikörper (MAk) der Fa. Immunex, Seattle zur Verfügung, die bereits auf ihre Eignung für verschiedene Techniken getestet worden waren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Als geeignet für ELISA erweisen sich in den Voruntersuchungen die monoklonalen Antikörper Kombinationen MAk 140 – MAk 143 und bedingt geeignet die Kombination MAk 140 – MAk 144.

Parallel war in Kooperation mit Th. Kamradt, DRFZ Berlin, mit der Gewinnung eigener MAks begonnen worden. Es werden sechs hu T1-S reaktive Antikörper erhalten (siehe Methoden Punkt 3.6, Tabelle 2), diese sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf ihre Eignung für einen T1-spezifischen ELISA analysiert werden (Tabelle 2).

Tabelle 3: Reaktivität anti-humaner T1Fc monoklonaler Antikörper aus der Ratte

(von J.E. Sims, Immunex, Seattle zur Verfügung gestellt)

Nr. MAK	ELISA	IHC	Western- Blot
140	+++	+/-	+/-
141	-	-	-
142	++	+	+/-
143	+++	-	+/-
144	++	+++	+/-

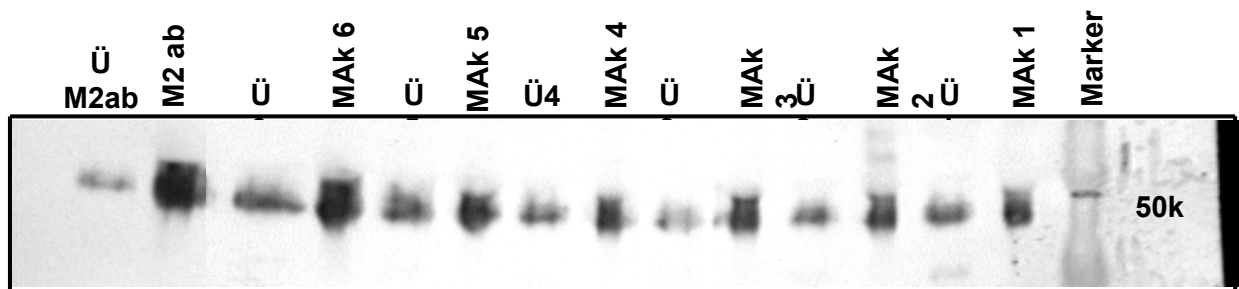
4.2.1. Spezifität der monoklonalen Antikörper, Immunpräzipitation

Die Spezifität der neuen MAks gegenüber dem rekombinierten T1-S-Protein wird zunächst in Immunpräzipitationsexperimenten geprüft. Hierfür werden ungereinigte Kulturüberstände von hu T1-S-Flag-exprimierenden Insektenzellen mit den jeweiligen MAks immunpräzipitiert. Als Positivkontrolle dient ein gegen das Flag Epitop gerichteter MAK, als Negativkontrolle ein irrelevanter MAK. Die präzipitierten Proteine werden in einem denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt und das T1-S-Flag Protein mittels Western Blot Hybridisierung mit einem FLAG spezifischen Antikörper nachgewiesen (siehe Kap 3.4.3.).

Die Abbildung 3 zeigt, daß in allen Präzipitaten das huT1- S-Flag Protein nachweisbar ist. Die Fällung war nicht vollständig, da auch noch nicht gefälltes Protein in den Überständen nachweisbar ist, während bei der mit dargestellten Positivkontrolle (anti

Flag MAk M2 ab) eine fast vollständige Präzipitation erreicht wird. Gleiches konnte für die MAk der Fa. Immunex gezeigt werden (nicht dargestellt).

Abb. 3: Immunpräzipitation:



MAk: denaturierte Immunpräzipitate der Antikörper 1-6.

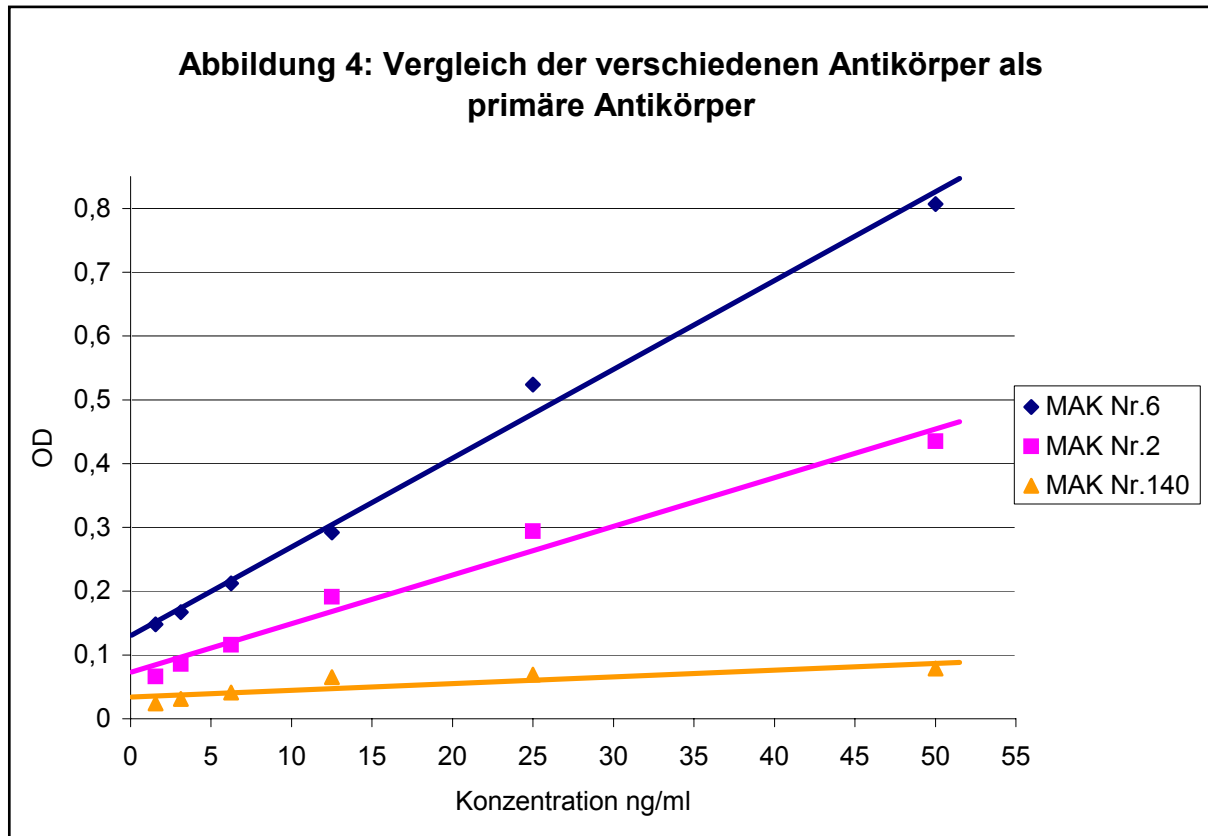
Ü: dem Präzipitat zugehöriger Überstand. **M2 ab:** Positivkontrolle.

4.2.2 Spezifität der monoklonalen Antikörper, ELISA

Da für alle sechs MAks die T1-S-Spezifität belegt werden konnte, wurden diese nun als Primärantikörper in indirekten ELISAs weiter untersucht. Hierfür wurden zunächst alle sechs MAks an Mikrotiterplatten gebunden. MAk 140, der in den Vorversuchen als bislang bester primärer Antikörper identifiziert worden war, diente als Referenz.

Wie in Abbildung 4 beispielhaft dargestellt, bestehen erhebliche Unterschiede bezüglich der Affinitäten der Antikörper zu dem verwendeten Antigen. Dies wird besonders deutlich anhand der unterschiedlichen Steigungen der erhaltenen Geraden.

Da die Bindung an die Mikrotiterplatte unspezifisch erfolgt, kann man davon ausgehen, daß in einem ELISA nach Standardprotokoll meßbare Unterschiede durch unterschiedliche Affinitäten der eingesetzten MAk zu dem Antigen verursacht werden. Man erkennt eine hohe Bindungsaffinität des MAk Nr.6 zu dem Antigen. Dies erkennt man an der größeren Steigung der zugehörigen Kurve.



Im weitere Verlauf wurde deshalb der Antikörper MAK Nr.6 als primärer Antikörper verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde der biotinylierte Antikörper 143 der Fa. Immunex verwendet.

4.3 Optimierungen

Zur Optimierung der ELISA Bedingungen werden Einzelschritte der Technik variiert. Wenn es nicht anders angegeben ist, erfolgt der Versuchsablauf unter Standardbedingungen wie unter Punkt 3.2 angegeben und es wird jeweils nur der behandelte Einzelschritt variiert.

4.3.1 Inkubationszeit

In Vorversuchen zeigte die Veränderung der Inkubationszeiten, daß eine Bindung der Antikörper an die Mikrotiterplatte und an das Antigen sehr langsam erfolgt. Das Coating und die Bindung des Antigens erfolgte deshalb jeweils über Nacht und im

Kühlschrank (nicht gezeigt) und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

4.3.2 Reagenzien

Ziel war es, eine Meßkurve zu erhalten, die zwei Bedingungen erfüllte:

1. Ein geringes Hintergrundsignal ergibt.
2. Im niedrigen Konzentrationsbereich einen möglichst steilen Anstieg zeigt.

a) Tetramethylbenzidin (TMB)

Es wurden zwei verschiedene Zubereitungen getestet (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5:

Tetramethylbenzidin	Peroxidase	Verdünnung
TMB-Tabletten (Fa. Sigma)	Streptavidin-POD (Fa. Roche)	1:10000 bis 1:100000
Turbo-TMB (Fa. Pierce)	Extravidin-POD (Fa. Sigma)	1:1000 bis 1:3000

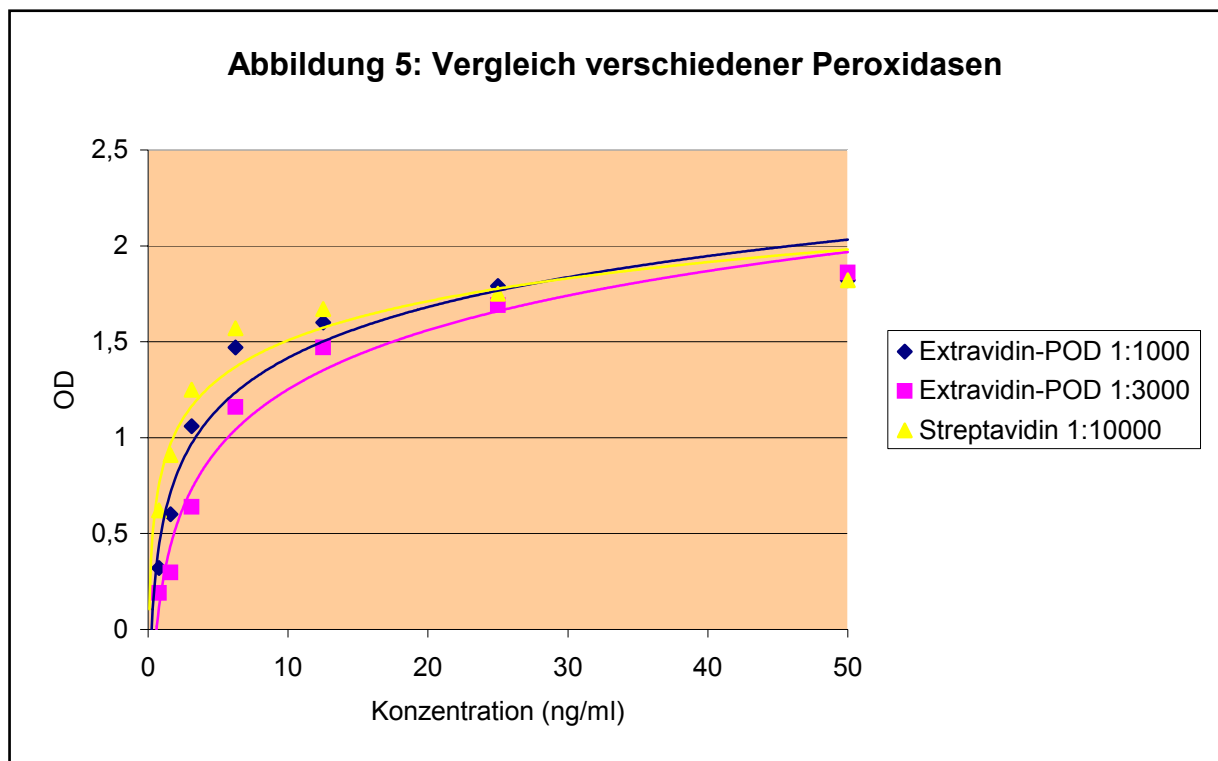
Es wurden direkte ELISA durchgeführt, bei denen das Antigen direkt an die Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden und diese mit 0,5% BSA und 2,5% Milchpuffer geblockt wurde. Der Nachweis erfolgte mit dem biotinylierten Antikörper 143 und anschließender Färbung nach dem Standardprotokoll.

Es zeigte sich auf der einen Seite, daß die Kombination von Extravidin-POD mit Turbo-TMB im Vergleich den geringeren Leerwert hat, was man an den niedrigeren Säulen des Diagramms erkennt. Wiederholt man das gleiche Experiment und blockt zugleich die Oberfläche mit den verschiedenen Möglichkeiten (siehe Tab. 4) so bleibt diese Beobachtung bestehen. Zudem erhält man für die Kombination von Extravidin-POD mit Turbo-TMB für alle Blockierungsreagenzien ein geringeres Hintergrundsig-

nal sowie geringe Unterschiede im Vergleich zu Extravidin-POD mit TMB-Tabletten. Diese Kombination zeigte eine große Variabilität bei verschiedenen Blockierungsreaktionen (siehe Abbildung 6).

b) Peroxidase (siehe Tab.5)

Streptavidin-POD wurde, wie vom Hersteller empfohlen, in den Verdünnungen von 1:10000 bis 1:100000 ausgetestet. Dabei hat sich gezeigt, daß die 1:10000 Verdünnung für unseren Bedarf am Besten geeignet ist (nicht gezeigt). In Abbildung 5 wird dargestellt, daß eine 1 : 10000 Verdünnung von Streptavidin-POD im niedrigen Konzentrationsbereich den steilsten Anstieg hatte. Im Vergleich mit Extravidin-POD in den Verdünnungen 1:1000, 1:3000 erfüllte die 1 : 10000 Verdünnung von Streptavidin die erforderlichen Kriterien am Besten. Es erfolgte eine logarithmische Darstellung der Kurve, da bei hohen Konzentrationen bereits eine Sättigung erreicht wurde und in diesem Fall die lineare Darstellung zu ungenau ist.



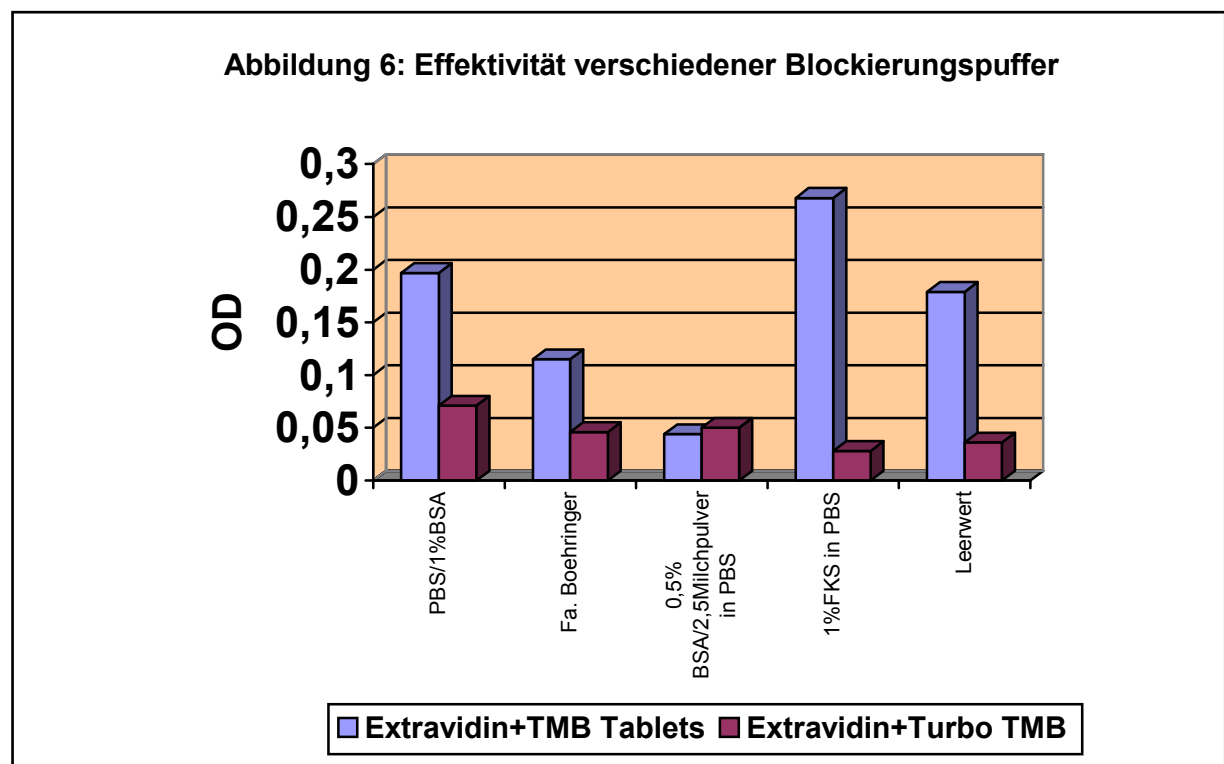
Für die Messung der Tumorextrakte wurde deshalb die Kombination von Streptavidin-POD (1:10000 verd.) mit Turbo-TMB gewählt.

4.3.3 Blockieren

Die Qualität verschiedener Blockierungsreagenzien wurde in weiteren ELISA Experimenten getestet, die als direkte ELISA durchgeführt wurden. Unter der Annahme, freie Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte zu blockieren, wird die unspezifisch bindende Oberfläche mit üblichen Blockierungspuffern blockiert (siehe Tabelle 4). Der Nachweis der erfolgten Blockierung erfolgte durch anschließende Inkubation mit dem biotinylierten sekundären Antikörper 143. Anschließend wurde nach dem Standardprotokoll gefärbt. Wie man in Abbildung 6 erkennen kann, blockiert ein Gemisch von 0,5% BSA und 2,5% Milchpulver in PBS unspezifische Bindungen am besten, so daß ein geringes Hintergrundsignal sowohl für die Kombination Extravidin-POD+TMB Tabletten als auch für Extravidin-POD+Turbo-TMB erreicht wird.

Tabelle 4 (Blockierungspuffer):

1% BSA in PBS	Fa. Boehringer Blockierungs-Reagenz	0,5% BSA und 2,5% Magermilchpulver in PBS	1% Fetales Kälberserum in PBS
---------------	-------------------------------------	---	-------------------------------

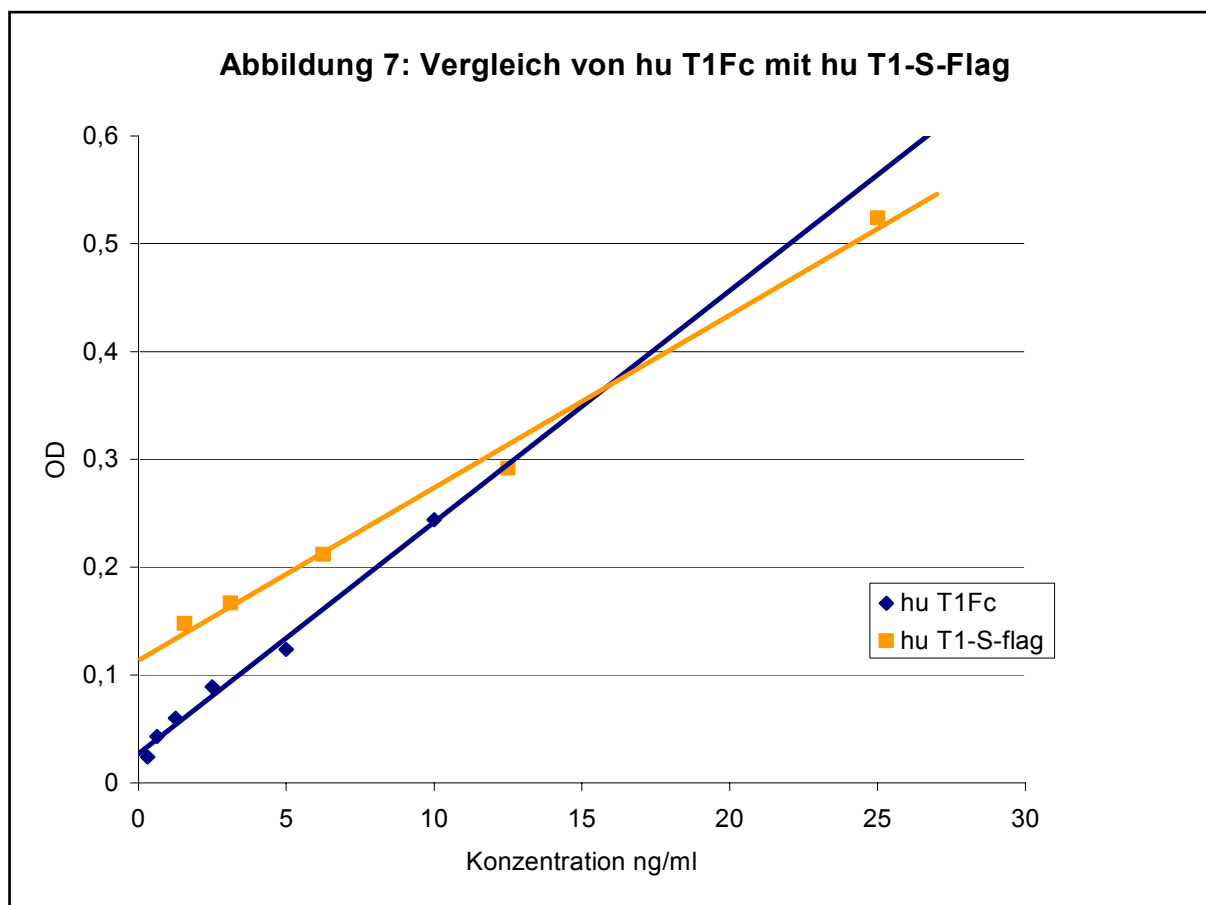


4.3.4 Vergleich von huT1-Fc mit huT1-S-Flag als Antigen

Das Bindungsverhalten zu den Antikörpern war in Immunpräzipitationen (s.o. Punkt 4.2.1) kontrolliert worden.

Anschließend wurde untersucht, wie sich das T1-S-flag in vergleichenden ELISA zu dem T1-Fc Protein verhält. Abbildung 7 zeigt die nach einem Standardprotokoll erhaltenen Eichgeraden.

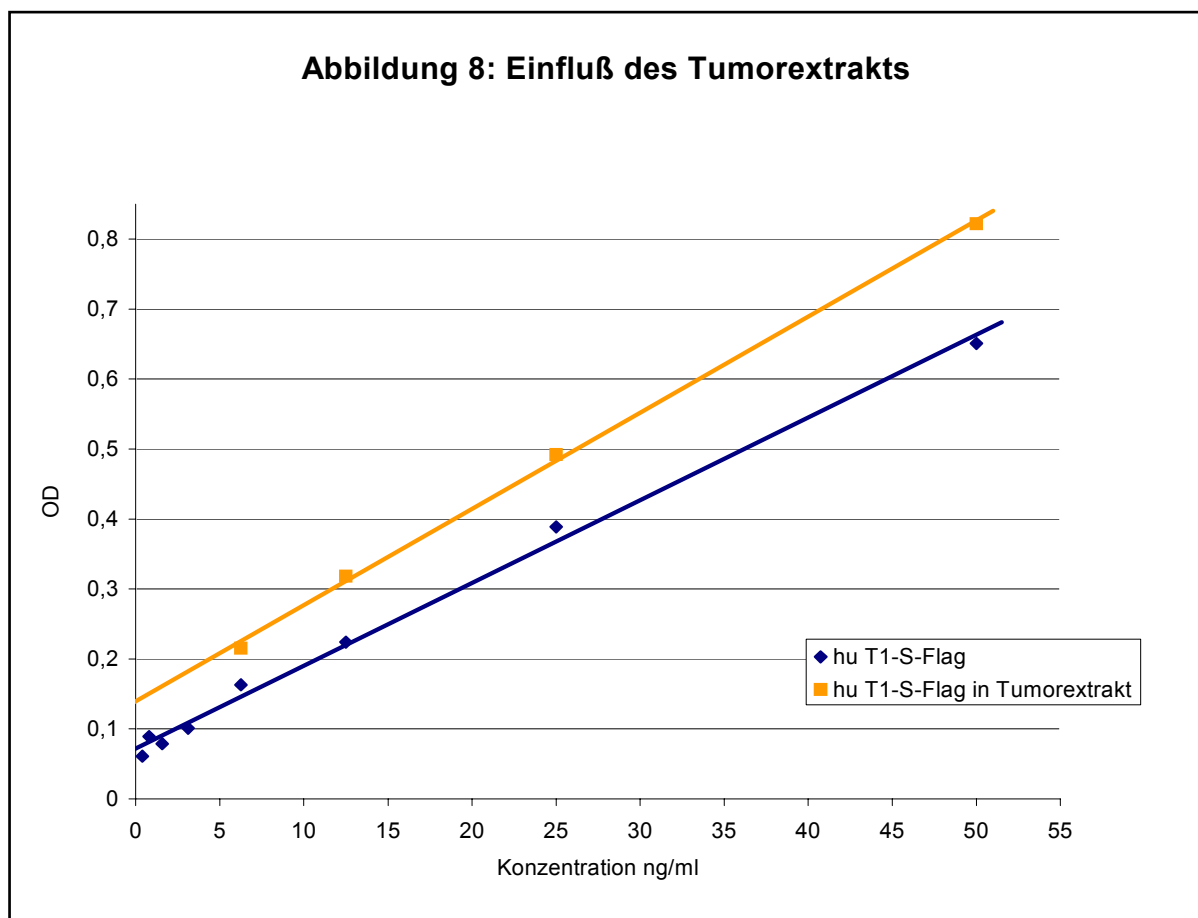
Man erkennt, daß sich die erhaltenen Geraden in der Steigung und dem jeweiligen Hintergrundsignal deutlich unterscheiden. Ausgehend von diesen Kurven muß man sagen, daß das T1-Fc Protein eine höhere Bindungsaffinität zu den verwendeten Antikörpern hat, erkennbar an der steileren Geraden. Aufgrund des geringeren Hintergrundsignals kann vermutet werden, daß das huT1-Fc-Protein weniger unspezifische Bindungen besitzt.



Wie unter Punkt 4.1 ausgeführt, führen Probleme bei der Reinigung des huT1-Fc-Proteins zu einer ungenauen Konzentrationsbestimmung. Die Herstellung von T1-S-flag benötigte kein Serum für die Zellkultur, so daß aufgrund der Affinitätsreinigung eine genauere Konzentrationsbestimmung möglich war. Für die Etablierung des ELISA wurde deshalb das huT1-S-flag Protein als interner Standard gewählt.

4.3.5 Einfluß des Tumorextrakts

Zur Überprüfung welchen Einfluß das Herstellungsverfahren der Tumorextrakte auf das Ergebnis hatte, wurden Verdünnungsreihen des hu T1-S-flag Protein als Eichgerade verglichen mit einer Verdünnungsreihe des hu T1-S-flag Protein in einer 1:300 Verdünnung verschiedener Tumorextrakte. Dazu wurden Tumorextrakte ausgewählt, die wenig T1-S Protein enthielten. Abbildung 8 zeigt die hierbei erhaltenen Geraden.



Man erkennt bei identischer Steigung lediglich eine Parallelverschiebung der Eichkurven durch einen erhöhten hu T1-S-Proteingehalt.

Es läßt sich also sagen, daß das Herstellungsverfahren der Tumorextrakte keinen Einfluß auf die Meßergebnisse hat.

4.3.6 Biotinylierung

Biotin ist eine niedermolekulare Substanz, die als Affinitätsreagenz verwendet wird. Es bindet äußerst fest an Avidin oder seine Derivate Extravidin und Streptavidin. Diesen Effekt nützt man folgendermaßen aus: Biotin wird kovalent an den Antikörper gebunden. Dieser so markierte Antikörper bindet an Avidin oder Streptavidin markiertes Enzym (hier POD), ohne daß die enzymatische Aktivität vermindert wird. Durch Zugabe von Enzymsubstrat (hier TMB) kann die gebundene Enzymaktivität als Maß für die Menge gebundener MAks quantitativ bestimmt werden (Alberts, 1995).

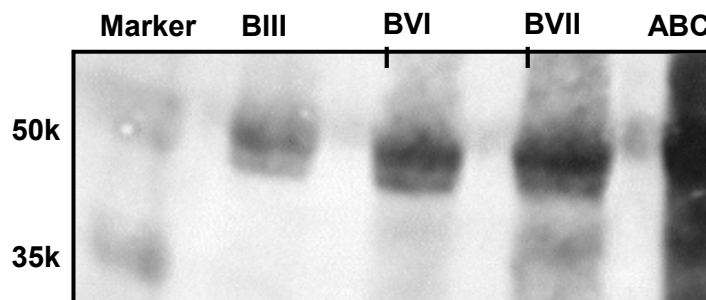
Nachdem bisherige Experimente gute Ergebnisse mit dem MAk 143 erbracht hatten, wurde in dieser Arbeit der MAk 143 als sekundärer Antikörper beibehalten und nicht variiert. Dieser Antikörper mußte selbst biotinyliert, und die Funktionalität überprüft werden (siehe Punkt 3.6.2).

Die Konzentrationen der verschiedenen Präparationen wurden jeweils photometrisch bestimmt. Sie waren je nach Reaktionsansatz unterschiedlich und betrugen 0,23 mg/ml bis 0,67mg/ml.

Der Erfolg der Biotinylierung wird durch denaturierende SDS-Gelelektrophorese und anschließender Western-Blot Analyse kontrolliert (siehe Punkt 3.4.4). Die erhaltenen Banden werden mit Streptavidin-AP detektiert und mit NBT-BCIP gefärbt. Die Intensität der Färbung entspricht der gebundenen Menge Streptavidin und das wiederum der entspricht dem Biotinylierungsgrad. Zum direkten Vergleich werden jeweils 1µg der unterschiedlichen Präparationen biotinylierter Antikörper eingesetzt, als positive

Kontrolle diente der anti-rabbit Biotin Antikörper des ABC Vector staining Kit. In Abbildung 10 sind verschiedene Präparationen biotinylierter Antikörper dargestellt. Man erkennt bei gleichen eingesetzten Mengen der Antikörper unterschiedliche Intensitäten der 50 KDa Bande, als Hinweis auf einen unterschiedlichen Anteil der Biotinylierung.

Abbildung 10:

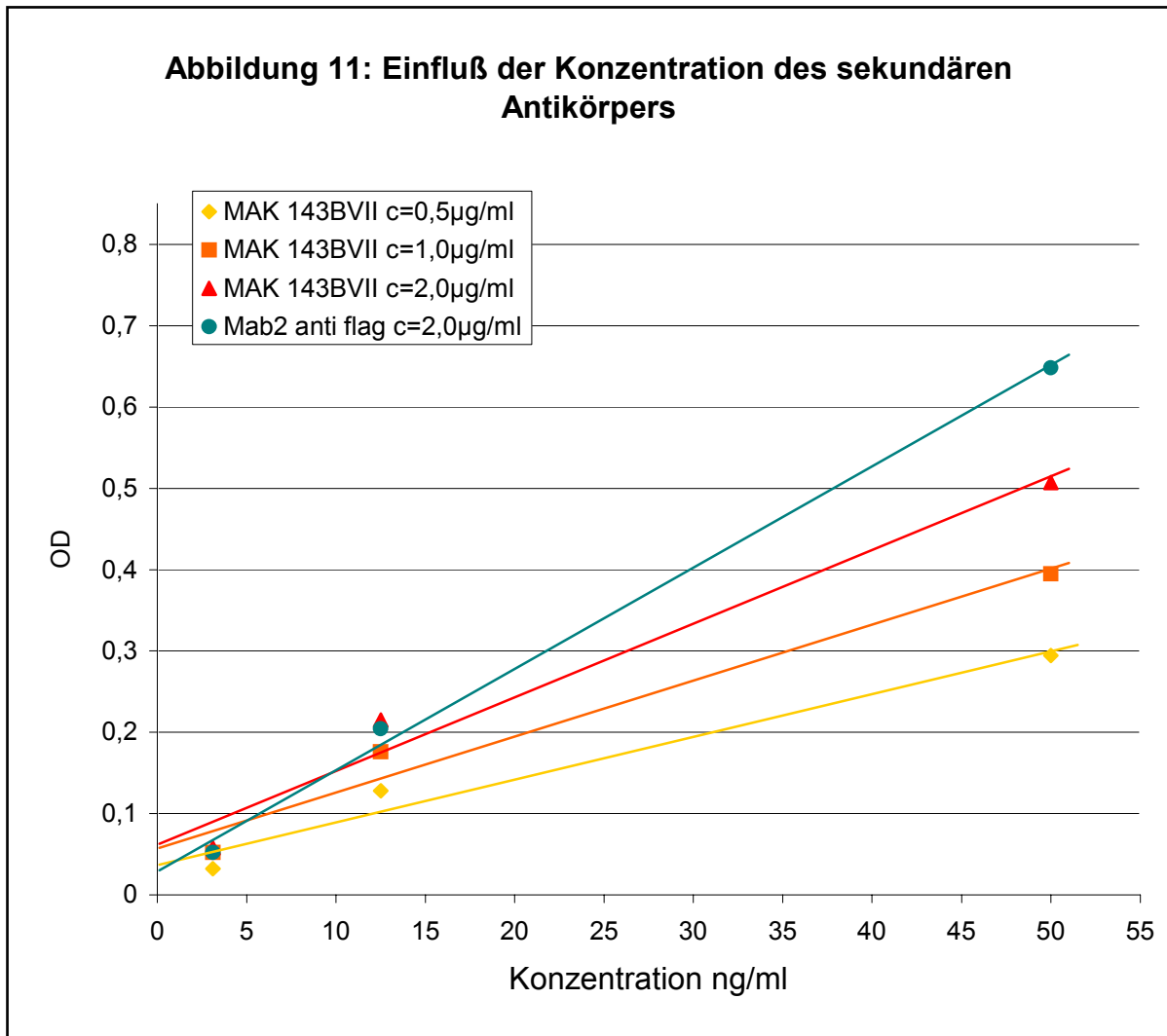


Die Biotinylierung ist in allen Reaktionen nachweisbar, die Effizienz in verschiedenen Präparationen hingegen unterschiedlich.

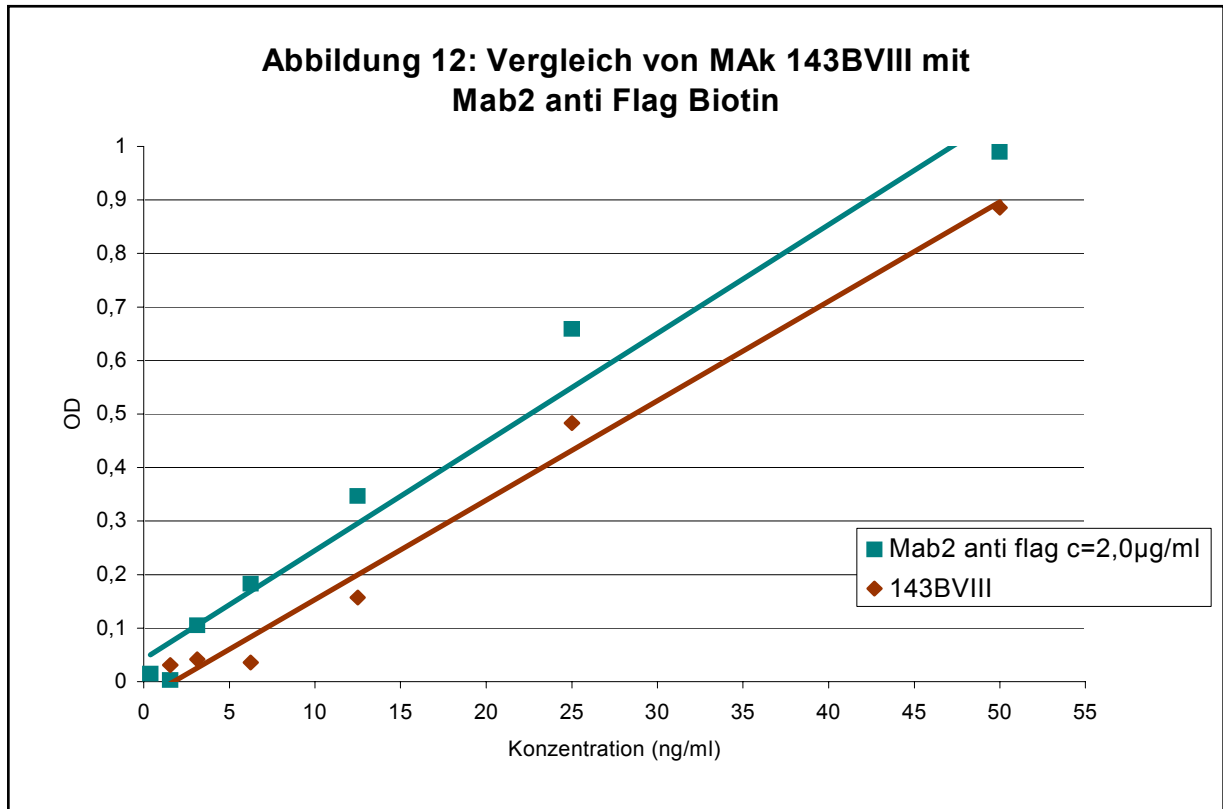
Insgesamt standen acht verschiedene Präparationen biotinylierter Antikörper zur Verfügung. Um die Funktionalität der biotinylierten sekundären Antikörper abschätzen zu können, wird in ELISAs nach Standardbedingungen ein käuflicher monoklonaler anti-Flag™ M2 biotinylierter Antikörper (Fa. Sigma), sowie die selbst hergestellten MAK 143-Biotin als sekundäre Antikörper miteinander verglichen.

Welchen Einfluß die Konzentration des sekundären Antikörpers hatte zeigt sich in Abbildung 11. Es wurden in einem Standard ELISA drei verschiedene Konzentrationen (0,5-1,0-2,0 µg/ml) des biotinylierten sekundären Antikörpers verglichen. Mit steigender Konzentration des sekundären Antikörpers nimmt die Steigung der Eichgeraden ebenfalls zu, ohne daß das Hintergrundsignal wesentlich ansteigt. Es wurde deswegen der sekundäre Antikörper in einer Konzentration von 2µg/ml in PBS/1%BSA eingesetzt.

Abbildung 11: Einfluß der Konzentration des sekundären Antikörpers



Die Abbildungen 11 und 12 zeigen exemplarisch das Bindungsverhalten des biotinylierten anti-Flag Antikörpers im Vergleich zu selbst hergestellten biotinylierten Antikörpern Nr. 143.



Man erkennt, daß die Verwendung des käuflichen Antikörpers nur im Vergleich mit dem biotinylierten Antikörper 143BVIII zu einer Parallelverschiebung der Kurve zu erhöhten Meßwerten führte und die Steigung der Geraden gleich blieb. Die Präparation 143BVIII hat dagegen noch eine zu geringe Steigung, so daß für die Konzentrationsbestimmungen mit dem ELISA der MAk 143BVIII verwendet wurde. Dieser selbst hergestellte biotinylierte sekundäre Antikörper ist gut für den ELISA einsetzbar.

4.4 T1-Protein Tumorextrakte

4.4.1 Gesamtproteinkonzentration

Die Proteinextraktion aus dem tiefgefrorenen Frischmaterial der 26 Mamma- Tumoren ergibt Proteinkonzentrationen von 0,5 – 7,0 mg/ml.

4.4.2 T1-Proteinkonzentration

Zur Messung der T1-Proteinkonzentrationen werden zunächst die idealen Verdünnungsstufen der Tumorextrakte in Vorversuchen mit breiten Verdünnungsstufen (1:50 bis 1:400 Verdünnungen) ermittelt. Es zeigt sich, daß eine relativ geringe Verdünnung (1:10/1:20/1:40/1:80) der Tumorextrakte notwendig ist, um in dem angestrebten Meßbereich zu liegen (nicht gezeigt). Die einzelnen Tumorextrakte wurden zwischen vier und acht Mal gemessen. Es wurden jeweils von jeder Probe Doppelbestimmungen durchgeführt und der erhaltene Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

Voraussetzung für die Wertung einer Messung war eine Eichkurve mit einer ausreichend hohen Differenz zwischen $OD_{(25ng)}$ und $OD_{(0,39ng)}$, der dadurch bedingten Steigung der Meßkurve, sowie einer niedrigen Negativkontrolle.

Die Einschlußkriterien mit den entsprechenden Standardabweichungen sind in Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 6: Einschlußkriterien

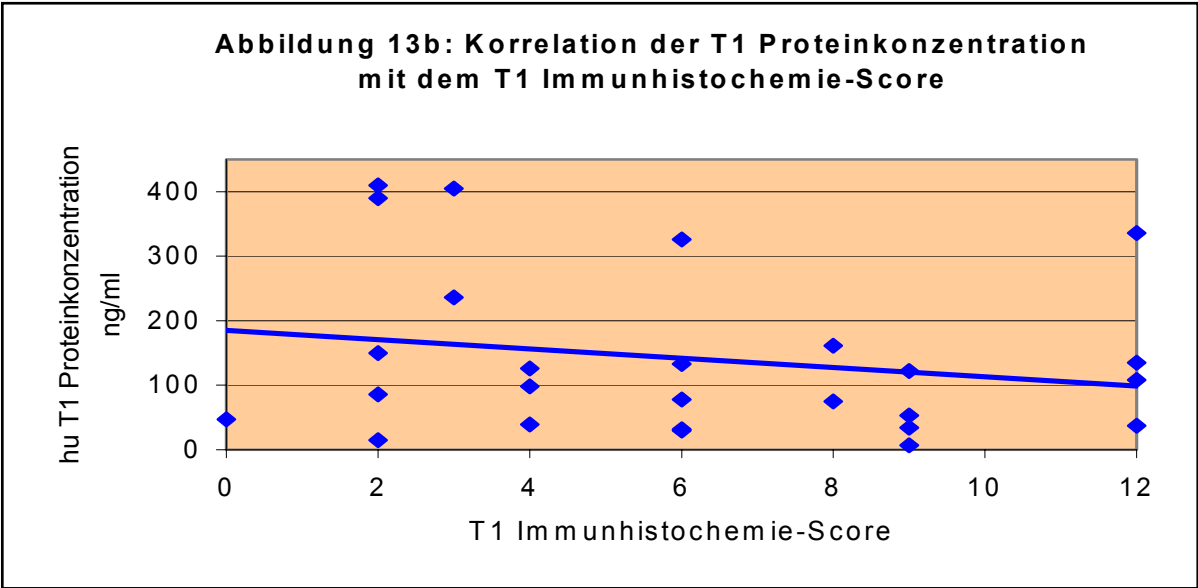
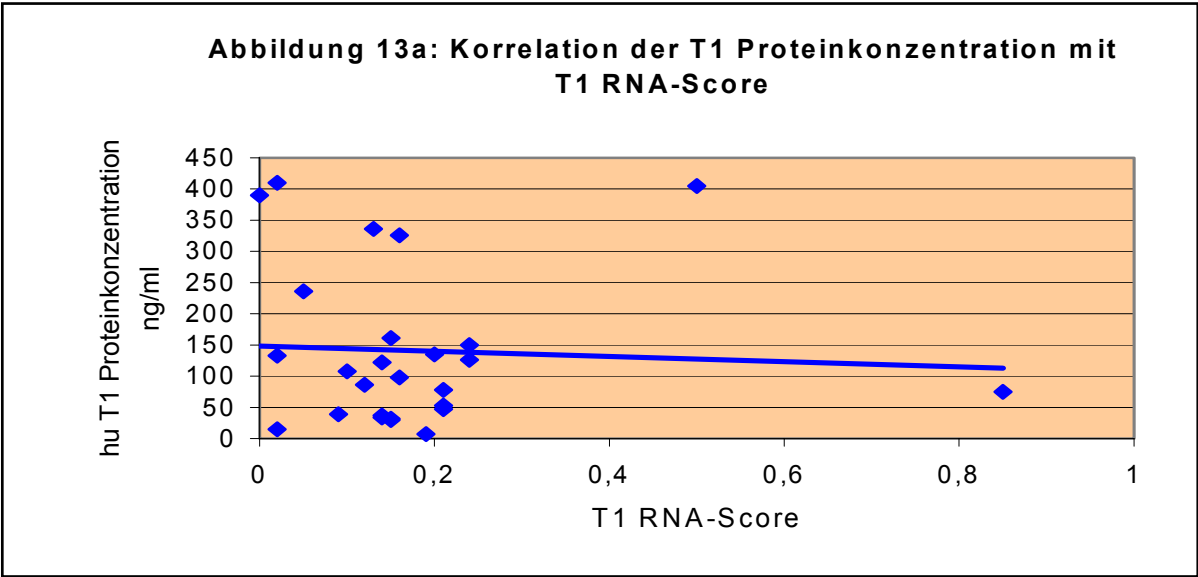
	Mittelwert	Standardabweichung
OD_{25ng}	0,82	$\pm 0,27$
$OD_{0,39ng}$	0,037	$\pm 0,028$
ΔOD	0,78	$\pm 0,27$
Neg.Kontrolle	0,16	$\pm 0,13$

Insgesamt erfüllten 78,6% der Messungen die Einschlußkriterien. 14,3% der durchgeführten ELISA konnten aufgrund zu hoher Negativkontrollen nicht gewertet werden. In 7,1% der Messungen war eine insgesamt zu geringe Intensität aufgefallen und konnten deshalb nicht gewertet werden.

Für jeden Tumorextrakt konnte man im Rahmen der Meßbedingungen (s.o.) mindestens drei bis max. sechs Konzentrationsbestimmungen auswerten. Es gab jedoch Extrakte, die auffallend häufig außerhalb des definierten Meßbereichs lagen und in den huT1-Protein Konzentrationen offensichtlich sehr gering waren. Der Tumorextrakt eines Fibroadenoms war in allen durchgeführten Messungen unterhalb der Meßbedingungen geblieben.

Auffallend ist, daß bei einem Versuchsansatz extrem differierende T1-Proteinmengen gemessen werden. Weiterhin auffallend ist, daß für gleiche Tumorextrakte die jeweiligen Proteinkonzentrationen in unterschiedlichen Messungen sehr unterschiedlich sind und demnach eine große Standardabweichung haben. Grob unterscheiden kann man Tumorextrakte, die hohe Proteinkonzentrationen ergaben, Messungen, die mittlere Proteinkonzentrationen ergeben und Messungen, die niedrige Proteinkonzentrationen ergeben. Vergleicht man für einen bestimmten Tumorextrakt verschiedene Messungen miteinander war der T1-Proteingehalt eines Tumorextraktes in der Relation zu den anderen Extrakten immer gleich, als entweder hoch, mittel oder niedrig einzustufen. Das Ziel, eine quantitative Aussage über den T1-Proteingehalt zu treffen ist mit dem derzeitigen System sehr schwer zu treffen. Die ermittelten Korrelationen sind in den folgenden Abbildungen 13a und b sichtbar gemacht.

Man erkennt, daß sich für einen bestimmten T1 RNA Score unterschiedlich große T1 Proteinkonzentrationen ergeben. Diese Proteinkonzentrationen sind, mit bedingt durch große Standardabweichungen, so gestreut, daß sich kein Trend für einen Zusammenhang zwischen T1 Proteinkonzentration und T1 RNA Score abzeichnet.



Auch in dieser Darstellung zeigt sich ein ähnliches Bild. Für einen bestimmten immunhistochemischen T1-Score zeigte sich eine breite Streuung der T1 Proteinkonzentration über den gesamten Meßbereich, so daß auch hier keine Aussage über den Zusammenhang zwischen T1 Proteinkonzentration und T1-Score getroffen werden konnte.

5. Diskussion

Die Technik des „Enzyme-linked Immunosorbent-assays ELISA“ ermöglicht einen quantitativen Nachweis von Proteinen in Gewebeextrakten, Zelllysaten, Zellkulturüberständen und Körperflüssigkeiten, ohne dass immunologische Aktivität verloren geht. Das Verfahren beruht auf der Spezifität von Antikörper-Antigen Komplexen. Antikörper sind Proteine, die vom Immunsystem der Wirbeltiere zur Infektionsabwehr hergestellt werden. Sie sind einzigartig unter den Proteinen, da sie in Milliarden verschiedener Formen hergestellt werden, jede mit einer anderen Bindungsstelle, die für sein Zielmolekül, das Antigen, spezifisch ist (Alberts, 1995). Im Prinzip sind zwei verschiedene Vorgehensweisen möglich.

- a) Direkter Nachweis eines Antigens durch Antikörper. Dies setzt voraus, daß das Antigen in hohen Konzentrationen vorhanden ist.
- b) Indirekter Nachweis eines Antigens durch Antikörper. Hierbei wird die Empfindlichkeit der Methode durch ein Signalverstärkungsverfahren noch gesteigert und erreicht so eine Sensitivität zum Nachweis von 100pg/ml bis 1ng/ml Protein.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verfahren des indirekten Nachweises gewählt.

Es standen insgesamt elf verschiedene monoklonale Antikörper zur Austestung zur Verfügung. Diese Antikörper wurden alle gegen rekombinantes humanes T1-Fc aus COS-7 Zellen hergestellt. Eine Spezifität war für alle Antikörper nur für rekombinantes humanes T1-Fc bekannt.

Aus den zur Verfügung stehenden Antikörpern wurde der Antikörper II6E3 als primärer Antikörper in Kombination mit dem biotinylierten Antikörper 143 als sekundären Antikörper aus den in Kap. 4 dargelegten Gründen ausgewählt.

Für die Bestimmung von T1-Proteinkonzentrationen war es von entscheidender Bedeutung einen internen Standard zu besitzen. Dieser Standard diente der Bestim-

mung einer Eichgeraden. Als Standard wurde zunächst ein T1-Fc Fusionsprotein verwendet. Die Herstellung des Proteins erfolgte durch Transfektion von Säugerzellen (COS-7) mit dem entsprechenden Expressionsvektor. Die Zellen produzierten humanes T1-S, das durch die Koppelung an die konstante(Fc) Region eines IgG Moleküls als Dimer vorlag. Für das Wachstum dieser Zellen war im Nährmedium ein Zusatz von mind. 4% FKS notwendig. Die im FKS enthaltenen bovinen Immunglobuline binden, ebenso wie das T1-Fc Fusionsprotein, mit hoher Affinität an ProteinA Sepharose, so daß die Präparationen des rekombinanten T1-Fc Proteins mit bovinen Immunglobulinen verunreinigt waren.

Dadurch wurde eine exakte Konzentrationsbestimmung für das T1-Fc Protein erschwert.

Ein erstes Ziel war es einen Weg zu finden das Antigen unabhängig von Serumproteinen und als Monomer herstellen zu können. Dies erfolgte durch Umklonierung des Expressionsvektors in Baculovirus und Amplifikation über Insektenzellen (Rupp 1995). Man erhielt dann ein monomeres T1-S Protein, das ein Flag Epitop anstatt des Fc-Teils trägt und über eine Affinitätschromatographie gereinigt werden kann. Es stand also ein Zellkultursystem zur Produktion von humanem T1-S Protein für die Erstellung von Eichkurven zur Verfügung.

Ziel des entwickelten Meßsystems war es, Eichkurven konsistent und reproduzierbar mit großer Steigung zu erhalten. Für dieses Meßsystem war allerdings nicht bekannt, wie die ideale Eichkurve aussehen soll. Daher wurden verschiedene Kriterien als Randbedingungen ausgewählt, die aus Vergleichen mit kommerziellen ELISA wichtig erscheinen. Die wichtigste Bedingung hierbei ist, daß das $\Delta OD = OD_{25ng} - OD_{0,39ng}$ als Ausdruck der Steigung groß genug ist ($0,82 \pm 0,27$). Die gewünschten Signalintensitäten konnten nur erreicht werden, indem man das Antigen in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt hat (50ng – 0,39ng). Dementsprechend müssen die herge-

stellten Tumorextrakte in hohen Verdünnungsstufen von 1:10 bis 1:80 eingesetzt werden.

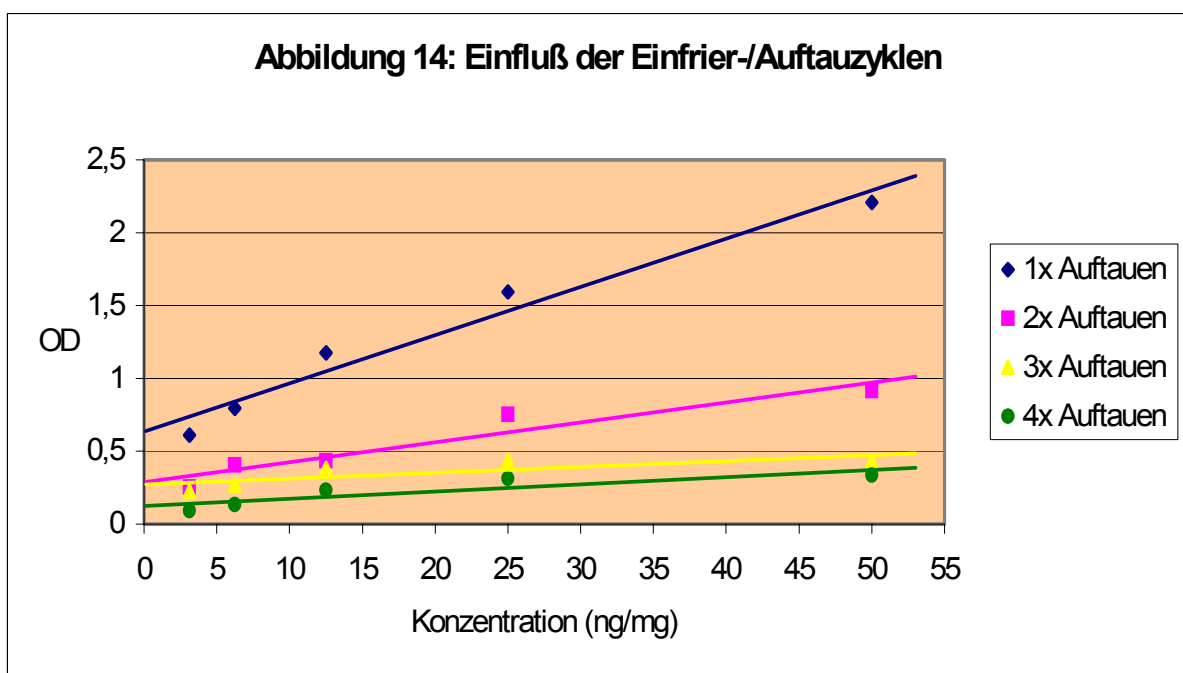
Die Abbildung 8 in Kap. 4.3.5 zeigt beispielhaft eine, bei unseren Messungen, häufig erhaltene Eichkurve. Bestimmt man damit Proteinkonzentrationen so wird deutlich, daß bei einem geringen Unterschied in der optischen Dichte bereits ein sehr starker Unterschied in der T1-Proteinkonzentration gemessen wird. Dies erklärt, daß bei formal gleichen Reaktionsbedingungen, unterschiedliche T1-Proteinkonzentrationen der gleichen Tumorextrakte gemessen werden. In den Tumorextrakten konnte man mit dieser Eichkurve häufig keine Proteinkonzentrationen bestimmen, da selbst bei der geringsten Verdünnungsstufe das gemessene Signal unterhalb des definierten Meßbereichs liegt. In diesem Fall braucht man noch stärkere Verdünnungsstufen des Antigens. Bei noch stärkeren Verdünnungen erhält man aber keine meßbaren Unterschiede mehr, da die Spezifität der Antikörper nicht ausreicht und das Hintergrundsignal der Färbereaktion zu hoch ist.

Eine mögliche Erklärung kann auch sein, daß in den jeweiligen Extrakten sehr wenig T1-Protein enthalten ist. Dazu passt die Beobachtung, daß der Proteinextrakt eines Fibroadenoms in allen Messungen immer unterhalb des Meßbereichs bleibt und kein verwertbares Signal ergibt.

Eine mögliche weitere Fehlerquelle ist die Entnahme der Gewebeproben aus dem tiefgefrorenen Material. Da die Auswahl nur aufgrund des makroskopischen Aspekts getroffen wurde und umgebendes Fettgewebe nicht sicher abgrenzbar ist, hatte man keine Kontrolle wie hoch der Anteil des Tumors im gewonnenen Präparat ist.

Es ist bekannt, daß Proteine ihre Sekundärstruktur in wäßriger Lösung durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren verändern können. Diese Veränderungen führen dazu, daß Antikörper nicht mehr so gut binden können und die Eichkurve im Verlauf immer schlechter wird. Dieses Phänomen kann man bei unseren Experimenten e-

benfalls beobachten. Abbildung 14 zeigt in einem Diagramm zusammengefaßte Eichkurven, die nach mehrmaligem Auftauen erhalten wurden und im Verlauf deutlich schlechter werden bis nach 3-maligem Auftauen ein stabiler Zustand erreicht scheint. Dann ist jedoch die Steigung so gering, daß keine genaue Proteinbestimmung mehr möglich ist. Ein weiteres Ziel muß es daher sein, das gereinigte Antigen in Lösung zu stabilisieren.



Biologisch beschränkt sich die T1-S Expression im Brustdrüsengewebe der Maus auf das duktales Wachstum während der weiblichen Pubertät und ist nicht meßbar in der ausgereiften oder laktierenden Brustdrüse. Eine Neuexpression von T1-S mRNA konnte für invasive Adenokarzinome der Brust in H-ras-Onkogen transgenen Mäusen gezeigt werden (Rößler et al.1993). Erst kürzlich konnte erstmals gezeigt werden, daß hu T1-S mRNA in 67% von primären invasiven, Lymphknoten negativen Mammarkarzinomen der Frau ebenfalls überexprimiert wird. In der gleichen Arbeit wird

ausgeführt, daß ein Immunhistochemischer T1-Protein Nachweis stark unterschiedliche Ergebnisse in Brustkrebszellen bringt (Werenskiold et al. 2000).

Insgesamt standen für diese Untersuchung 26 Tumorextrakte zur Verfügung. 25 davon waren invasiv wachsende Karzinome, ein Tumorextrakt stammte von einem Fibroadenom.

Die erhaltenen Ergebnisse für T1-S mRNS, T1-Protein Immunhistochemie und T1-Proteinbestimmung mit ELISA zeigen für eine gutartige Neubildung der Brustdrüse niedrige T1-S Proteinkonzentrationen.

Ziel der Arbeit war es, eine exakte Proteinkonzentration für jeden Tumorextrakt zu ermitteln und einen Zusammenhang mit dem T1 mRNA-Score und dem T1-Proteinscore herzustellen. Dieser Zusammenhang sollte eine Aussage darüber treffen ob eine mittels ELISA durchgeführte Bestimmung der T1-Proteinkonzentration möglich ist.

Die Abbildungen 13a und b zeigen die erhaltenen Korrelationen. Als Fazit kann man sagen, daß mit den derzeit erhältlichen Antikörpern eine konstante und reproduzierbare Eichgeraden mit einer entsprechend notwendigen Steigung nicht sicher gewährleistet ist, und deshalb im Augenblick keine zuverlässigen Aussagen über T1-Proteinkonzentrationen und deren Zusammenhang mit anderen Parametern gemacht werden kann.

Das Hauptziel wird demnach die Verbesserung von Antikörpern und deren Bindung an das Antigen sein müssen. Dazu wäre die Identifizierung der bindenden Domänen eine Voraussetzung. Anschließend daran könnte man spezifischere Antikörper mit stärkeren Bindungsaffinitäten herstellen.

6. Zusammenfassung

Der extrazellulär lösliche hu T1-S Rezeptor ist als Mitglied der Immunglobulin Superfamilie an unterschiedlichen Funktionen, wie der Antigenerkennung, Zelladhäsion und Signalrezeption beteiligt. Untersuchungen an der Maus zeigten, daß der hu T1-S Rezeptor ausschließlich in der Phase der duktaalen Reifung der Brustdrüsen junger Mäuse exprimiert wird. Eine davon abweichende erneute Expression von hu T1-S mRNA wurde für invasive Adenokarzinome der Brustdrüse in H-ras-Onkogen transgenen Mäusen gezeigt. In menschlichen Tumoren der weiblichen Brustdrüse konnte ebenfalls eine Überexpression von hu T1-S mRNA semi-quantitativ mittels RT-PCR, in situ Hybridisierung oder immunhistochemisch nachgewiesen werden. Dabei konnte eine Korrelation zwischen dem rezidivfreien Intervall und der hu T1-S Proteinexpression hergestellt werden. Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es die bereits semi-quantitativ nachgewiesene Expression des T1-Rezeptors mittels der ELISA Technik genauer zu quantifizieren. Hierzu wurden 25 primäre Mammakarzinome vom invasiv-duktaalen Typ ausgewählt und die erhobenen ELISA Daten mit dem immunhistochemischen T1-Rezeptorstatus sowie mit dem T1-S mRNA Gehalt korreliert.

Aus einem Panel von insgesamt 11 Antikörpern zeigte lediglich die Kombination zweier Antikörper (Nr. II6E3 sowie Nr. 143) eine für die Quantifizierung notwendige reproduzierbare Eichgerade. Die daraus abgeleiteten Proteinmengen zeigten unterschiedliche Konzentrationen des T1-S Rezeptors in den untersuchten Mammakarzinomen. Dabei ließ sich keine Korrelation zwischen der gemessenen T1-S Protein- und der semiquantitativ erhobenen T1-S mRNA Konzentration feststellen. Ein Vergleich der T1-S Proteinkonzentration mit denen in einem Score zusammengefaßten immunhistologischen Daten ließ keinen Trend erkennen. Als mögliche Erklärung für diese Phänomene bietet sich zum einen eine mangelnde Affinität der untersuchten

Antikörper zum T1-S Protein an, was durch die letztlich nur in einer Antikörperkombination reproduzierbaren Ergebnisse unterstrichen wird. Zum anderen könnte eine Instabilität des untersuchten Proteins über die Zeit zu einer Erschwerung der Antikörperbindung führen, was durch die beobachtete Abnahme der Eichkurvensteigung im Verlauf angedeutet wird (siehe Abb 14).

Unter der Voraussetzung einer Verbesserung der Antikörperbindung, erscheint eine weitergehende Untersuchung des hu T1-S Rezeptorstatus auf Protein- sowie RNA-Ebene mit neueren Methoden (z.B. Taq-Man Technologie) sinnvoll, um genauere Daten bezüglich der Bedeutung von hu T1-S Protein im Hinblick auf die Rezidivrate des Mammakarzinoms zu gewinnen.

7. Literaturverzeichnis

1. American Cancer Society, 1994
2. Baessler R, Böcker W, Hermanek P. Die gegenwärtige Situation des Gradings beim Mammakarzinom. *Pathologe* 1992;13:130-4
3. Bergers G, Reikerstorfer A, Braselmann S, Graninger P, Busslinger M. Alternative promoter usage of the fos-responsive gene Fit-1 generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. *EMBO J* 1994; 13: 1176-88.
4. Clark GM, McGuire W. Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. *Semin Oncol* 1988;15:20-5.
5. *Current Protocols in molecular Biology*, Vol 2; 1998:
6. DeMichele A, Weber BL. Recent advances in breast cancer biology. *Curr Opin Oncol* 1997; 9: 499-504.
7. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for Colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67.
8. Gayle MA, Slack JL, Bonnert TP, Renshaw BR, Sonoda G, Taguchi T, Testa JR, Dower SK, Sims JE. Cloning of a Putative Ligand for the T1/ST^c Receptor. *J Biol Chem* 1996;271;5784-5789.
9. Hoskins K, Weber BL. Recent advances in breast cancer biology. *Curr Opin Oncol* 1995; 7: 495-9.
10. Klemenz R, Hoffmann S, Werenskiold AK. Serum- and oncoprotein mediated induction of a gene with similarity to carcinoembryonic antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:5708-12.

11. Löhning M, Stroehmann A, Coyle A, et al. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of IL-4-, IL-5, and IL-10 and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6930-6.
12. Porter PL, Malone KL, Heagerty PJ, et al. Expression of cell-cycle regulators p27/kip1 and Cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med* 1997; 3: 222-5.
13. Prechtel D, Harbeck N, Berger U, Höfler H, Werenskiold AK. Clinical Relevance of T1-S, an Oncogene-Inducible, Secreted Glycoprotein of the Immunoglobulin Superfamily, in Node-Negative Breast Cancer. *Lab Invest* 2001; 81: 159-165.
14. Remmele W, Stegner HE. Immunohistochemischer Nachweis von Östrogenrezeptoren (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe: Vorschlag zur einheitlichen Bewertung des Untersuchungsbefundes. *Frauenarzt* 1987;2:41-3
15. Rößler U, Andres AC, Reichmann E, Schmal W, Werenskiold AK. Expression of T1, a CEA family member, in mammary carcinomas of WAP-ras transgenic mice. *Oncogene* 1993;8:609-17.
16. Rößler U, Thomassen C, Hültner L, Baier S, Danescu J, Werenskiold AK. Secreted and membrane-bound isoforms of T1, an orphan receptor related to IL-1 binding proteins, are differently expressed in vivo. *Dev Biol* 1995;168:86-97.
17. Rupp B, Rössler U, Löwel M, Werenskiold AK. High level expression of the IL-1 receptor related T1 receptor in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 Nov 13;216(2):595-601.
18. Russo J, Russo IH. Mammary tumorigenesis. *Prog Exp Tumor Res* 1991; 33: 175-91.
19. Schmitt M, Thomassen C, Ulm K, et al. Time-varying prognostic impact of tumor biologic factors urokinase (uPA), PAI-1 and steroid hormone receptor status in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1997;76:306-11.

20. Silvestrini R, Benini E, Veneroni S, Daidone MG, Tomasic G, Salvadori B. p53 and bcl-2 expression correlates with clinical outcome in a series of node-negative breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1604-10.
21. Simpson JF, Page DL. Pathology of preinvasive and excellent-prognosis breast cancer. *Curr Opin Oncol* 1997;9:512-9.
22. Sims JE, Paintner SL, Gow IR. Genomic organization of the type I and type II IL-1 receptors. *Cytokine* 1995;7:483-490.
23. Sobin LH, Fleming ID. TNM-classification of malignant tumors, 5th ed. Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 1997;80:1803-4.
24. Soong R, Iacopetta BJ, Harvey JM, Sterrett GF, Dawkins HJ, Hahnel R, Robbins PD. Detection of p53 gene mutation by rapid PCR-SSCP and its association with poor survival in breast cancer. *Int J Cancer* 1997; 74: 642-7.
25. Thomassen E, Kothny G, Haas S, Danescu J, Hültner L, Dörmer P, Werenskiold AK. Role of celltype-specific promoters in the developmental regulation of T1, an Interleukin-1 receptor homologue. *Cell Growth Differ* 1995; 6: 178-84.
26. Tominaga S, Yokota T, Yanagisawa K, Tsukamoto T, Takagi T, Tetsuka T. Nucleotide sequence of a complementary DNA for human ST2. *Biochim Biophys Acta* 1992;1171:215-8.
27. Tominaga S: A putative protein of growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of interleukin 1 receptor. *FEBS Lett* 1989;258:301-04.
28. Werenskiold AK, Hoffmann S, Klemenz R. Induction of a mitogen responsive gene after the expression of the H-ras oncogene in NIH3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1989;9:5207-14.

29. Werenskiold AK, Prechtel D, Harbeck N, Höfler H, Diagn Mol Pathol 2000;9(1):26-34.
30. Werenskiold AK. Characterization of a secreted glycoprotein of the immunoglobulin superfamily inducible by mitogen and oncogene. Eur J Biochem 1992;204(3):1041-7.
31. Yanagisawa K, Takagi T, Tsukamoto T, Tetsuka T, Tominaga S. Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1. FEBS Lett 1993;318:83-7.

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
ELISA	„Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay“
ERG	Eppendorfreagenzgefäß
FKS	Fetales Kälberserum
h	Stunde(n)
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen bzw.-paare
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
max	Maximum
mg	Milligramm
min	Minute(n)
min	Minimum
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
OD	Optische Dichte
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNS	Ribonukleinsäure
mRNS	„Boten“-ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SDS	„Sodium Dodecyl Sulfat“
SDS-SB	SDS-Probenpuffer („sample buffer“)
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

TEMED	N,N,N,'N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1, 3-Propandiol
U/min	Umdrehungen pro Minute
U	Units
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Phosphat	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat, auch BCIP