



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 07 155 T2 2004.02.05**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 057 032 B1**

(51) Int Cl.⁷: **G01N 33/574**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 07 155.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB99/00506**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 905 087.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/042821**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.02.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **26.08.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.12.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **23.04.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.02.2004**

(30) Unionspriorität:

9803446	18.02.1998	GB
9803447	18.02.1998	GB
9812151	05.06.1998	GB
9814545	03.07.1998	GB
9903035	10.02.1999	GB

(73) Patentinhaber:

Theryte Ltd., Liverpool, GB

(74) Vertreter:

**Patentanwälte Westphal Mussnug & Partner,
78048 Villingen-Schwenningen**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**WARENIUS, Meek, Hilmar, Heswall, Wirral CH60
4RN, GB; SEABRA, Anthony, Laurence, Heswall,
Wirral L61 6XH, GB**

(54) Bezeichnung: **KREBSBEHANDLUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Anmeldung betrifft Verfahren zur Diagnose von Krebs. Die Anmeldung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Diagnose von Krebs durch Messung der Pegel von zwei in mutmaßlichen Krebszellen vorhandenen Proteinen.

[0002] Das Kennzeichen von Krebs ist seine Fähigkeit zur schrankenlosen, autonomen Zellwucherung. Die Entdeckung eines Mittels zur selektiven Hemmung des Wucherns in Krebszellen ohne gleichzeitige Beschädigung der Wucherungsfähigkeit von normalen Zellen könnte möglicherweise neue Methoden zum Aufhalten des Wachstums von Tumoren schaffen, und zwar unabhängig von deren Differenzierungsgrad, Vordringen oder Metastasenbildung. Es ist interessant zu verstehen, wie Krebszellen sich teilen und ob sich dies von der normalen Zellteilung unterscheidet. Die meisten Krebsbehandlungen sind allgemein cytotoxisch, wobei sie im Allgemeinen auf wuchernde Zellen gerichtet sind. Normale Gewebe wuchern jedoch ebenfalls und werden somit auch durch cytotoxische Wirkstoffe beschädigt. Eine Identifizierung von krebsspezifischen Markern, die ein Abzielen ermöglichen oder spezifische Ziele für die Arzneimittelentwicklung schaffen, würde die Entwicklung von Behandlungen ermöglichen, die spezifischer für Tumorgewebe toxisch sind, wodurch die schwächenden Wirkungen der Chemotherapie verringert würden.

[0003] Die Wirkung der Expression von einzelnen Genen allein auf das Ansprechen von menschlichen Krebszelllinien auf eine Behandlung mit cytotoxischen Arzneimitteln, wie z. B. CDDP, wurde in menschlichen in vitro-Zelllinien untersucht, da diese ein Modellsystem darstellen, welches für das Ansprechverhalten einer Krebserkrankung des Menschen im klinischen Bereich relevant ist. Insbesondere weisen sie den Umfang von Empfindlichkeiten gegenüber cytotoxischen Arzneimitteln und ionisierender Strahlung auf, welcher im klinischen Bereich üblicherweise vorgefunden wird. Für Entdeckungen in menschlichen in vitro-Zelllinien besteht daher die große Möglichkeit, auf klinisch brauchbare Tests hinsichtlich der Frage, welche Qualität des Ansprechens von Krebserkrankungen auf eine Behandlung zu erwarten ist, übertragen werden zu können.

[0004] Das Fortwachsen von Zellen durch den Zellzyklus wird von Holoenzymen reguliert, welche durch eine Kombination von Proteinen, genannt Cyclinen, deren Pegel den gesamten Zellzyklus hindurch fluktuieren, und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), welche bei Verbindung mit Cyclinen aktiv werden, gebildet werden. Die Cyclin/CDK-Komplexe können durch Proteine, die als Cyclin-abhängige Kinasehemmer (CKIs) bezeichnet werden und das Protein p21 WAF1/CIP1(p21) einschließen, gehemmt werden.

[0005] Die Proteinprodukte der Cyclin-D1- und B1-Gene und deren jeweilige Cyclin-abhängige Kinasepartner CDK4 und CDK1 wurden untersucht. Cyclin D1 und CDK4 kontrollieren das Fortwachsen von Zellen durch den Zellzyklus-Kontrollpunkt zwischen G1- und S-Phase (die Phase der DNA-Synthese). Cyclin B1 und CDK1 kontrollieren den Zellzyklus-Kontrollpunkt direkt vor der Mitose. Es wurde gezeigt, dass die Expression des Cyclin-D1-Proteins in einer Reihe von 16 menschlichen Krebszelllinien mit deren Eigenresistenz gegenüber dem cytotoxischen Arzneimittel CDDP zusammenhängt (Warenius et al., 1996). Die Cyclin-D1-Proteinpegel wiesen jedoch keine Beziehung zur Radiosensitivität, einer weiteren Behandlungsmodalität, auf. Die Beziehung zwischen Cyclin D1 und der CDDP-Resistenz ist jedoch allein nicht stark genug, um die Basis für klinisch nützliche Vorhersageanalysen zu bilden.

[0006] Das Ziel der vorliegenden Erfindung besteht in der Lösung der mit dem obenstehenden Stand der Technik in Verbindung stehenden Probleme und in der Bereitstellung eines verbesserten Verfahrens zur Diagnose von Krebs.

[0007] Demgemäß beschreibt diese Erfindung Verfahren zur Diagnose eines kanzerösen Zustands durch das gleichzeitige Messen der Eigenschaften von drei mit Krebs in Verbindung stehenden Genen. Diese Anmeldung betrifft die Messung der Pegel des Proteinprodukts des CDK1-Gens und des Proteinprodukts des CDK4-Gens, wobei auch der Mutationsstatus von p53 bestimmt wird.

[0008] Im Speziellen schafft diese Erfindung ein Verfahren zur Diagnose eines kanzerösen oder präkanzerösen Zustands bei einer Testperson, umfassend die Untersuchung einer mutierten p53-Zellen umfassenden Probe oder eines Extrakts davon hinsichtlich des gleichzeitigen Anstiegs von CDK1 und CDK4.

[0009] Der gleichzeitige Anstieg von CDK1, und CDK4 kann entweder ein Anstieg von deren Expression oder deren Proteinpegel sein. Der Anstieg der CDK1- und CDK4-Expression oder der Anstieg der CDK1- und CDK4-Proteinpegel kann durch jegliches geeignetes Verfahren, z. B. Western-Blotting, gemessen werden. Der Punkt, an dem der Pegel als erhöht oder die Expression als erhöht (oder als Überexpression) angesehen wird, ist dem Fachman auf diesem Gebiet klar gemäß der allgemeinen Lehre aus der Literatur bezüglich üblicher CDK1- und CDK4-Pegel in menschlichen Zelllinien (siehe Cancer Research, 1994, Nov. 15; 54(22), 5804–7; Cancer Research, 1993, Nov. 15; 53(22), 5535–41; und British Journal of Cancer, 1995, Juni; 71(6), 1231–6). Dieser Punkt kann gemäß der Beurteilung durch die das vorliegende Verfahren durchführende Person bestimmt werden, und zwar abhängig von den speziellen Zellen und dem Patienten, die involviert sind.

[0010] Die Erfindung sieht auch eine Ausstattung zur Diagnose eines kanzerösen oder präkanzerösen Zustands bei einer Testperson vor, umfassend:

(i) ein Mittel zum Untersuchen des Anstiegs von CDK1; und

- (ii) ein Mittel zum Untersuchen des Anstiegs von CDK4;
- (iii) ein Mittel zum Identifizieren von mutierten p53-Zellen.

[0011] Überdies stellt diese Erfindung ein neuartiges komplexes Ziel für das Arzneimittel-Screening bereit, was zu Arzneimitteln führen könnte, die spezifischer für Tumorgewebe toxisch sind; und zwar mit den bei dieser Erfindung geoffenbarten Merkmalen.

[0012] Diese Erfindung betrifft insbesondere die Messung der CDK1-Proteinpegel und CDK4-Proteinpegel in Zellen. Der p53-Mutationsstatus der Zellen wurde z. B. durch eine DNA-Sequenzierung identifiziert. Hohe CDK1- und CDK4-Pegel werden in menschlichen Krebszellen vorgefunden, welche p53-Mutationen tragen.

Modulierung der Beziehung zwischen CDK1 und CDK4 in mutierten menschlichen p53-Zellen

[0013] Die obigen sind ungewöhnliche Entdeckungen, die nicht mit dem zusammenpassen, was derzeit über CDKs weithin bekannt ist. Die Störung der CDK1/CDK4-Beziehung in mutierten p53-Zellen kann als neues Ziel für die Krebsbekämpfungstherapie identifiziert werden. Da der gleichzeitige Anstieg von CDK1 und CDK4 und die p53-Mutation auf Krebszellen beschränkt sind und miteinander verbunden zu sein scheinen, bilden sie in Kombination überdies ein komplexes Ziel, das sich unter den bisher entdeckten wahrscheinlich als jenes erweist, das am spezifischsten für die Krebstherapie ist.

[0014] Die Erfindung wird nunmehr rein beispielhaft detaillierter beschrieben, und zwar unter Bezugnahme auf die angeschlossene Zeichnung, in welcher:

[0015] **Fig. 1** die Wechselbeziehung zwischen den CDK1- und CDK4-Pegeln in menschlichen Krebszelllinien sowie die entsprechenden Pegel in normalen Zellen, wie z. B. Keratinozyten und Fibroblasten des Menschen, darstellt;

[0016] **Fig. 2** den relativen Mangel einer Wechselbeziehung zwischen den Pegeln von Cyclin D und Cyclin B (den jeweiligen Partnern von CDK4 und CDK1) in menschlichen Krebszelllinien darstellt;

[0017] **Fig. 3** die Reihe der Werte für die CDK1-Pegel zeigt, die in mehreren, an spezifischen menschlichen in vitro-Zelllinien durchgeführten Western-Immunoblot-Versuchen vorgefunden wurden (die Standardfehler sind ebenfalls dargestellt);

[0018] **Fig. 4** die der **Fig. 3** entsprechenden, bezüglich CDK4 erhaltenen Daten zeigt;

[0019] **Fig. 5** die Wechselbeziehung zwischen den CDK1- und CDK4-Pegeln in mutierten p53-Krebszelllinien des Menschen darstellt; und

[0020] **Fig. 6** die der **Fig. 5** entsprechende, bezüglich Wildtyp-p53-Zelllinien des Menschen erhaltene Wechselbeziehung zeigt.

Doppelparameter-Krebstest unter Verwendung einer CDK1- und CDK4-Proteinexpression

[0021] Ein klinischer Krebstest wird bereitgestellt, welcher auf der Messung der CDK1-Proteinexpressionsstärken, der CDK4-Proteinexpressionsstärken und der Detektion von Mutationen im p53-Gen basiert. In einer Forschungsumgebung werden die CDK-Proteinpegel typischerweise durch Western-Blotting oder eine Immunzytochemie gemessen, für diagnostische Zwecke sind jedoch kostengünstigere und schnellere Verfahren mehr bevorzugt.

[0022] Die Bestimmung des Mutationsstatus von p53 kann durch Sequenzierung des das Gen des Patienten tragenden, genomischen Locus oder durch Sequenzierung der exprimierten mRNA nach der Konversion zu cDNA durchgeführt werden. Verschiedene Methodenlehren zur Nucleinsäure-Sequenzierung sind derzeit verfügbar, von denen alle zur Verwendung mit dieser diagnostischen Analyse geeignet sind. Das gebräuchlichste Verfahren würde auf dem Einbau von Terminations-Nucleotiden in durch eine Polymerase erzeugte Kopien einer Matrize basieren, wobei das Verfahren von Sanger et al, 1977, angewandt wird. Zahlreiche Alternativen ergaben sich in jüngster Zeit, einschließlich der Adaptor-Sequenzierung (PCT/US95/12678), der auf einer Ligasierung basierenden Sequenzierung (PCT/USS96/03245), der Sequenzierung durch Hybridisierung (A. D. Mirzabekov, TIB Tech 12: 27-32, 1994), um nur einige aufzulisten. Verschiedene Untersuchungsverfahren hinsichtlich spezifischer Mutationen existieren und sind im Stand der Technik wohlbekannt, wie z. B. die Taq-Man-Analyse, Oligonucleotid-Ligase-Analysen, einzelsträngige Konformations-Polymorphismen und Analysen, die auf der Hybridisierung von Matrizen-Nucleinsäuren mit Oligonucleotid-Reihen basieren.

[0023] Da CDK1 und CDK4 nicht unter einer direkten Transkriptionskontrolle stehen, ist es unwahrscheinlich, dass die mRNA-Pegel für CDK1 und CDK4 demselben Muster folgen wie ihre Proteine. Dies bedeutet, dass eine Bestimmung der mRNA-Pegel dieser Gene für die Zwecke dieses Tests nicht ausreichend ist.

Immunzytochemie

[0024] Bei einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung könnten CDK1- und CDK4-Proteinpegel mit-

tels Immunzytochemie gemessen werden, wobei die konfokale Laserfluoreszenzmikroskopie zum Nachweis einer Antikörperbindung angewandt wird. Vorzugsweise wurde ein Abtastsystem eingesetzt, wie jene, die in der PCT/US91/09217, PCT/NL/00081 und PCT/US95/01886 beschrieben sind. Ein Antikörper gegen CDK1 (wie z. B. der monoklonale Maus-sc-54 von Santa Cruz Biotechnology, CA) würde mit einem Farbstoff markiert werden, und ein Antikörper gegen CDK4 (wie z. B. der gereinigte polyklonale Kaninchen-sc-260 von Santa Cruz Biotechnology, CA) würde mit einem zweiten Farbstoff markiert werden, während ein dritter DNA-bindender Farbstoff zum Auswählen von Aneuploidzellen eingesetzt werden könnte. DNA-bindende Farbstoffe, wie z. B. der Hoechst 33258-Farbstoff, welcher AT-reiche DNA bindet, oder Chromomycin A₃, welcher GC-reiche DNA bindet, wären geeignet. Die Intensität der Fluoreszenz dieser Farbstoffe würde einen Hinweis auf die Expressionsstärke der Gene liefern. Ein diagnostischer Test kann die folgenden Schritte umfassen:

- Das Entnehmen einer Biopsie des Tumors eines Patienten.
- Gegebenenfalls das Zerlegen des Materials unter dem Mikroskop, um normales Gewebe von Tumormaterial zu trennen.
- Das Vorbereiten des Biopsiematerials für die mikroskopische Untersuchung, was die folgenden Schritte umfasst:
 - Das Markieren des Biopsiematerials mit den obenstehenden fluoreszenzmarkierten Antikörpersonden gegen CDK1 und CDK4. Das Biopsiematerial kann gegebenenfalls auch mit Antikörpersonden gegen mutierte p53-Proteine und mit einem DNA-bindenden Farbstoff markiert werden.
 - Das Trennen der markierten Zellen von ungebundenen markierenden Sonden.
 - Das Legen des markierten Biopsiematerials in ein konfokales Rastermikroskop, um Zellen zu zählen, welche:
 - CDK1 überexprimieren oder einen Anstieg davon aufweisen, d. h. mit zumindest einer Schwellenwert-Menge eines Antikörpers gegen CDK1 markiert sind.
 - CDK4 überexprimieren oder einen Anstieg davon aufweisen, d.h. mit zumindest der Schwellenwert-Menge eines Antikörpers gegen CDK4 markiert sind.
 - Gegebenenfalls solche, welche mutierte Formen von p53 exprimieren, d. h. mit zumindest der Schwellenwert-Menge von Antikörpern gegen p53-Mutanten markiert sind. Wahlweise könnte der p53-Mutationsstatus durch eine Analyse der mRNA oder der genomischen DNA bestimmt werden, wie obenstehend besprochen.
 - Gegebenenfalls solche, welche chromosomale Amplifikationen besitzen, wie durch die Intensität der Fluoreszenz von DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen.

Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung

[0025] Eine Ausführungsform des diagnostischen Tests könnte sich die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) zunutze machen. Ein FACS-Instrument trennt die Zellen in einer Suspension in einer Weise, die von den Zellen, die mit einem Fluoreszenz-Marker markiert sind, abhängt. Ein typisches FACS-Gerät funktioniert wie folgt: Die Zellen in einer Suspension, welche sich in einer einzelnen Reihe fortbewegen, werden durch eine Schwingdüse geleitet, welche die Bildung von eine einzelne Zelle oder überhaupt keine Zelle enthaltenden Tröpfchen hervorruft. Die Tröpfchen passieren einen Laserstrahl. Die Fluoreszenz, die von jeder einzelnen Zelle in ihrem Tröpfchen durch einen Laser angeregt wird, wird gemessen. Nach dem Detektor tritt der Strom von Zellen, die sich in Suspension befinden, durch einen elektrostatischen Ring, welcher den Tröpfchen eine Oberflächenladung verleiht. Den Tröpfchen, die Zellen tragen, wird eine positive oder negative Ladung verliehen. Enthält der Tropfen eine Zelle, die mit einer oberhalb eines bestimmten Schwellenwerts liegenden Intensität fluoresziert, so erhält der Tropfen eine Ladung von einer Polarität. Unmarkierte Zellen erhalten eine Ladung von entgegengesetzter Polarität. Die geladenen Tröpfchen werden danach von einem elektrischen Feld abgelenkt und werden in Abhängigkeit von ihrer Oberflächenladung in getrennte Behälter geleitet und gezählt. Tröpfchen, die mehr als eine Zelle enthalten, streuen das Licht mehr als einzelne Zellen. Dies ist leicht nachzuweisen, und somit bleiben diese ungeladen und kommen in einen dritten Entsorgungsbehälter.

[0026] Mehrkanal-Fluoreszenz-Detektionsgeräte wurden konstruiert, die basierend auf der Markierung mit mehreren verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen Zellen trennen können. Diese haben Mehrfachlaser, die Fluoreszenz in verschiedenen Frequenzen anregen können, und der Detektor weist verschiedene Emissionsfrequenzen nach. Unter Anwendung dieser Technik könnte ein Test durchgeführt werden, wobei ohne Erfordernis einer Sortierung bei einem Durchflusszytometer eine Multiparameter-Reihe eingesetzt wird. Ein System mit drei Markierungen wäre für diesen Test geeignet. Ein Antikörper gegen CDK1 würde mit einem Farbstoff markiert werden, und ein Antikörper gegen CDK4 würde mit einem zweiten Farbstoff markiert werden, während ein dritter DNA-bindender Farbstoff zum Auswählen von Aneuploidzellen eingesetzt werden kann. DNA-bindende Farbstoffe, wie z. B. der Hoechst 33258-Farbstoff, welcher AT-reiche DNA bindet, oder Chromomycin A₃, welcher GC-reiche DNA bindet, sind geeignet. Überdies ist eine Reihe von Antikörpern im Handel erhältlich, welche einige der mutierten Formen von p53 nachweisen können. Antikörper wie diese können mit einem vierten Farbstoff markiert werden. Die Intensität der Fluoreszenz dieser Farbstoffe gibt einen Hinweis auf die Expressionsstärken der beiden Proteine dar und zeigt den Chromosomenzustand von durch den Detektor gehen-

den, markierten Zellen an. Ein minimaler Anteil der Fluoreszenzintensität jedes Farbstoffs, der in einer einzelnen Zelle vorhanden ist, kann erforderlich sein, um eine Zelle als kanzerös einzustufen. Derzeit können nicht alle mutierten Formen von p53 unter Verwendung von Antikörpern nachgewiesen werden, obwohl es Antikörper gegen eine Reihe von bekannten mutierten Formen des p53-Proteins gibt. Ein diagnostischer Test kann die folgenden Schritte umfassen:

- Das Entnehmen einer Biopsie des Tumors eines Patienten.
- Gegebenenfalls das Zerlegen des Materials unter dem Mikroskop, um normales Gewebe von Tumormaterial zu trennen.
- Das Zerstören der intrazellulären Adhäsion zwecks Bildung einer Einzelzellen-Suspension.
- Das Markieren der suspendierten Zellen mit den obenstehenden fluoreszenzmarkierten Sonden gegen CDK1 und CDK4. Das Biopsiematerial kann gegebenenfalls auch mit Antikörpersonden gegen mutierte p53-Proteine und mit einem DNA-bindenden Farbstoff markiert werden.
- Das Trennen der markierten Zellen von ungebundenen markierten Sonden.
- Das Leiten der Suspension von markierten Zellen durch ein FACS-Gerät, um Zellen zu zählen, welche:
- CDK1 überexprimieren oder einen Anstieg davon aufweisen, d. h. mit zumindest einer Schwellenwert-Menge eines Antikörpers gegen CDK1 markiert sind.
- CDK4 überexprimieren oder einen Anstieg davon aufweisen, d. h. mit zumindest der Schwellenwert-Menge eines Antikörpers gegen CDK4 markiert sind,
- Gegebenenfalls Zellen, die mutierte Formen von p53 exprimieren, d. h. mit zumindest der Schwellenwert-Menge von Antikörpern gegen p53-Mutanten markiert sind. Wahlweise kann der p53-Mutationsstatus durch eine Analyse der mRNA oder der genomischen DNA bestimmt werden, wie obenstehend besprochen.
- Gegebenenfalls Zellen, die chromosomale Amplifikationen besitzen, wie durch die Intensität der Fluoreszenz von DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen.

Beispiel 1

[0027] Es zeigte sich, dass menschliche in vitro-Zelllinien von unterschiedlicher histologischer Herkunft, welche eine Reihe von intrinsischen Empfindlichkeiten gegenüber cytotoxischen Arzneimitteln aufweisen, wie durch klonogene Zellüberlebensanalysen gemessen, geeignete Modelle für klinische Tumore, insbesondere hinsichtlich deren Ansprechverhalten auf die Chemotherapie, darstellen. Insbesondere weisen diese Zelllinien den Umfang von Empfindlichkeiten gegenüber cytotoxischen Arzneimitteln und ionisierender Strahlung auf, welcher im klinischen Bereich üblicherweise vorgefunden wird. Diese menschlichen in vitro-Krebszelllinien werden nummehr weitgehend als relevante Modelle für das klinische Ansprechen von Tumoren auf die Chemotherapie anerkannt. Es ist daher möglich, Gene aus diesen Krebsmodellen zu identifizieren, deren Expression und/oder Mutationsstatus tumorspezifisch ist, was auch Merkmale von wirklichen klinischen Tumoren sind. Für Entdeckungen bei menschlichen in vitro-Zelllinien, wie z. B. jene, die zu dieser Erfindung führen, besteht daher die große Möglichkeit, auf bedeutungsvolle Ziele für Arzneimittelerkennungsprogramme übertragen werden zu können.

[0028] Ein Umfang von Arbeiten wurde zur Analyse der Expression einer Reihe von Genen ausgeführt, welche beim Krebserkrankungsvorgang eine Rolle spielen. Im Gegensatz zu allen anderen die Zellteilung steuernden Genen, welche untersucht wurden, schienen CDK1 und CDK4 in einer langen Reihe von menschlichen Krebszelllinien und Extrakten eines klinischen Dickdarm-Krebses durchwegs gleichzeitig erhöht zu sein. Ohne durch eine Theorie eingeschränkt zu sein, wird, die Hypothese aufgestellt, dass es zur erfolgreichen Weiterleitung von Krebszellen notwendig sein könnte, dass a) CDK1 und CDK4 ihre normalen Funktionen beibehalten und b) die erhöhten Pegel dieser beiden Proteine mit einer Krebserkrankung des Menschen in irgendeiner Weise in Verbindung stehen, wobei der Mechanismus unklar ist.

[0029] Zur Untersuchung der obenstehenden Hypothese wurde an allen Exonen sowohl von CDK1 als auch von CDK4 in den 20 menschlichen Zelllinien, in denen eine starke Beziehung zwischen der Expression der beiden Proteine nachgewiesen wurde, eine DNA-Sequenzierung durchgeführt. In den 20 menschlichen in vitro-Zelllinien, die sequenziert wurden, gab es keinerlei Mutationen in den Exonen der CDK1- und CDK4-Gene. Dieses Erkenntnis ist äußerst überraschend, da wohl bekannt ist, dass Krebszellen in den entscheidenden, die Zellteilung steuernden Genen zunehmend Mutationen anhäufen, und dies wird von vielen auf diesem Gebiet wissenschaftlich Tätigen bei menschlichen in vitro-Zelllinien, wie z. B. den untersuchten, als am ausgeprägtesten eingeschätzt.

Materialien und Verfahren

Zelllinien und klonogene Zellüberlebensanalysen

[0030] Über die klonogenen Analysevorgänge hinsichtlich der Wachstumscharakteristika der menschlichen

in vitro-Zelllinien, die bei dieser Analyse verwendet werden, wurde bereits berichtet (Warenius et al, 1994). Die Zelllinien sind mit ihrer histologischen Klassifizierung in Tabelle 1 aufgelistet. Alle sind gut etabliert; viele wurden mehrere Jahre lang in vitro wachsen gelassen. Die Zelllinien waren entweder Schenkungen oder wurden von unseren Laboratorien erworben. Nach dem Erhalt wurden alle 5 Passagen lang wachsen gelassen, um genügend Zellen für eine chargenweise Lagerung in flüssigem Stickstoff zu ergeben. In dieser Periode wurde die Kontamination durch zumindest eine Passage in einem antibiotisch freien Medium ausgeschlossen, und eine Mycoplasma-Untersuchung wurde mit allen Linien durchgeführt. Für die klonogenen Analysen wurden aus einer bestimmten primären Charge in flüssigem Stickstoff Zellen entnommen und 3–6 Passagen lang wachsen gelassen, bis genügend gut wachsende Zellen existierten. Weitere Chargen von diesen Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Zellen wurden routinemäßig in einem DMEM-Medium aufbewahrt, mit Ausnahme von RT112 und H322, die in RPMI 1640 wachsen gelassen wurden, und von MGHU-1, das in einem Ham-F12-Medium wachsen gelassen wurde. Alle Linien wurden mit 10%igem, durch Hitze deaktiviertem Kälberfötusserum (HITFCS) ergänzt.

Tabelle 1 – p53-Mutationsstatus

	Zelllinie	cDNA-Sequenz	Aminosäure-Veränderung	p53-Protein
I407	Embryonales Darmepithel	normal	keine	Wildtyp
HEP 2	Schuppenförmiges Karzinom des Kehlkopfs	normal	keine	Wildtyp
MGHU 1	Übergangskarzinom der Blase	normal	keine	Wildtyp
HRT 18	Adenokarzinom des Mastdarms	normal	keine	Wildtyp
2780	Eierstockkarzinom	normal	keine	Wildtyp
OAW 42	Eierstockkarzinom	CGA-CGG-Codon 213	keine	Wildtyp
HT 29/5	Adenokarzinom des Kolons	CGT-CAT-Codon 273	Arg-His	mutiert
COLO 320	Adenokarzinom des Kolons	CGG-TGG-Codon 245	Arg-Tryp	mutiert
H 322	Kleinzellen-Lungenkarzinom	CGG-TGG-Codon 245	Arg-Tryp	mutiert
H 417	Kleinzellen-Lungenkarzinom	GAG-TAG-Codon 298	Glu-Stop	abgestumpft
RPMI 7951	Melanom	TCA-TTA-Codon 166	Ser-Stop	abgestumpft
RT 112	Übergangskarzinom der Blase	CCG-CAG-Codon 248	Arg-Gly	mutiert
MOR	Adenokarzinom der Lunge	C-Deletionscodon 152	Frameshift 178aa	abgestumpft
MEL 2	Melanom	CGC-AGC-Codon 245	Gly-Ser	mutiert

Identifizierung von Mutationen im p53-Gen mittels PCR und DNA-Sequenzierung

[0031] Aus denselben Chargen in flüssigem Stickstoff, die zur Bereitstellung von Zellen für die klonogenen Zellüberlebensdaten verwendet wurden, wurde Material für eine PCR und eine DNA-Sequenzierung von p53 gewonnen. Die Zellen wurden bis zu drei Passagen langwachsen gelassen, bevor sie den folgenden Vorgängen unterzogen wurden:

Nucleinsäure-Isoiierung

[0032] Eine RNA und eine genomische DNA wurden aus den hier beschriebenen Zelllinien mittels des Guanidinium-Isothiocyanat-CsCl-Gradientenverfahrens hergestellt (Chirgwin et al, 1979, Barraclough et al, 1987). Kurz gesagt, die Zellen wurden in einer eiskalten Phosphat- gepufferten Salzlösung (PBS) gesammelt und in einem Guanidinium-Isothiocyanat-Puffer (4 M Guanidinium-Isothiocyanat, 50 mM Tris pH 7,5, 25 mM EDTA pH 8,0, 0,5 (Gew.%) Natriumlaurylsarcosin und 8 (Gew.%) 2-Mercaptoethanol, unmittelbar vor der Verwendung beigelegt) homogenisiert. Das Homogenat wurde durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 8.000 rpm und 4°C gereinigt (SS34-Rotor, Sorvall-RC-5B-Zentrifuge), und die RNA wurde durch eine 20-stündige Zentrifugierung des Homogenats durch einen Polster aus 5,7 M Cäsiumchlorid/0,1 M EDTA bei 32.000 rpm und 20bC pelletiert (TST 41.14-Rotor, Kontron Centrikon T20 60-Ultrazentrifuge). Das RNA-Pellet wurde in 0,1 (Gew.%) SDS wiederum gelöst und vor der Quantisierung über Nacht bei -20°C mit Ethanol ausgefällt.

Polymerase-Kettenreaktion, cDNA-Synthese und Nucleotid-Sequenzierung

[0033] Mit aus den menschlichen Karzinom-Zelllinien extrahierter DNA und RNA wurde eine PCR (für die Exone 2–8 und die Exone 9–11) durchgeführt. Jedes Exon wurde danach durch eine DNA-Sequenzierung untersucht. PCR-Primer wurden konstruiert, die jedes Exon flankierten, und mit einem Applied Biosystems 381A-DNA-Synthetisierer synthetisiert. Jedes Exon wurde getrennt amplifiziert, mit Ausnahme der Exone 2 und 3, die als Einheit amplifiziert wurden, und der Exone 9, 10 und 11, die mittels einer Reverse-Transcription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zusammen amplifiziert wurden. Die folgenden Primer wurden verwendet:

Exon 2/3 Sinn-5'-CCC ACT TTT CCT CTT GCA GC-3'
 Exon 2/3 Antisinn-5'-AGC CCA ACC CTT GTC CTT AC-3'
 Exon 4 Sinn-5'-CTG CTC TTT TCA CCC ATC TA-3'
 Exon 4 Antisinn-5'-GCA TTG AAG TCT CAT GGA AG-3'
 Exon 5 Sinn-5'-TGT TCA CTT GTG CCC TGA CT-3'
 Exon 5 Antisinn-5'-CAG CCC TGT CGT CTC TCC AG-3'
 Exon 6 Sinn-5'-GCC TCT GAT TCC TCA CTG AT-3'
 Exon 6 Antisinn-5'-TTA ACC CCT CCT CCC AGA GA-3'
 Exon 7 Sinn-5'-ACT GGC CTC ATC TTG GGC CT-3'
 Exon 7 Antisinn-5'-TGT GCA GGG TGG CAA GTG GC-3'
 Exon 8 Sinn-5'-T ATC CTG AGT AGT GG-3'
 Exon 8 Antisinn-5'-T GCT TGC TTA CCT CG-3'
 Exon 9/10/11 Sinn-5'-AGA AAG GGG AGC CTC ACC AC-3'
 Exon 9/10/11 Antisinn-5'-CTG ACG CAC ACC TAT TGC AA-3'

[0034] Genomische DNA wurde mit EcoR1 aufgeschlossen und mit Ethanol ausgefällt und in 50 µl Wasser (Sigma) resuspendiert, bevor sie einer PCR-Amplifikation unterzogen wurde. Die DNA (1 µg) wurde in 50 µl-PCR-Reaktionen, die 20 pMol jedes Primers enthielten, amplifiziert. Ein „Heißstart“-PCR-Protokoll wurde verwendet, wobei die dNTPs und das Taq-Enzym anfangs vom Rest der Reaktionskomponenten auf einem Wachspolster getrennt wurden. Die Reaktionen wurden 2 Minuten lang in einen bei 95°C vorgewärmten PCR-Block gegeben, bevor sie dreißig Zyklen einer Denaturierung (30 Sek. bei 95°C), einer Wiederverbindung (30 Sek. bei 60°C für die Exone 2–3, 4 und 6; bei 65°C für die Exone 5 und 8; bei 67°C für Exon 7; und bei 68°C für die Exone 9–11) und einer Verlängerung (1 Min. bei 72°C) durchmachten. Die PCR-Produkte wurden auf einem 0,8 (Gew.%) Agarosegel überprüft, bevor sie unter Verwendung einer Wizard-Minisäule (Promega) gereinigt wurden, und wurden direkt bei Sequenzierungsreaktionen eingesetzt.

cDNA-Synthese und RT-PCR

[0035] Unter Verwendung von Oligo (dT) als Primer wurde aus ungefähr 5 µg Gesamt-RNA eine komplementäre DNA synthetisiert. Gesamt-RNA (5 µg), aus menschlicher Plazenta gewonnener Ribonuclease-Hemmstoff (HPRI) 20 U und 1 µg Oligo (dT) wurden 10 Minuten lang bei 70°C erhitzt, auf Eis erkalten gelassen, einem 1x erststrängigen Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM Kaliumchlorid und 3 mM Magnesiumchlorid), 0,01 M DTT, dNTPs (0,5 mM für jedes Desoxyribonucleosid-Triphosphat), 400 U Superscript Reverse Transcriptase (Gibco) beigelegt und 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Eine PCR wurde für die Exone 9 bis 11 unter Verwendung von 5 µl der obenstehenden Inkubation in 50 µl PCR-Reaktion durchgeführt, wie im vorhergehenden, Abschnitt beschrieben.

Nucleotid-Sequenzierung

[0036] 30 Minuten lang wurden Sequenzierungsprimer (10 pMol) bei 37°C an ihren 5'-Enden mit ³²P-ATP (45 µCi) radioaktiv markiert, und zwar in einer Reaktion, die T4 Polynucleotid-Kinase (PNK) (9,7 U, Pharmacia) und 1x T4 PNK-Puffer (10 mM Trisacetat, 10 mM Magnesiumacetat und 50 mM Kaliumacetat) enthielt. Die verwendeten Primer waren mit jenen identisch, die bei den PCR-Reaktionen eingesetzt wurden, mit Ausnahme von Exon 5, für das ein eigener Sinn-Sequenzierungsprimer wie folgt konstruiert wurde: 5'-TAC TCC CCT GCC CTC-3'. Die Sequenzierung wurde durch das enzymatische Didesoxynucleotid-Verfahren (Sanger et al, 1977) durchgeführt, wobei das fmol DNA-Sequenzierungssystem (Promega) verwendet wurde. Alle identifizierten vermeintlichen Sequenzmutationen wurden durch eine zusätzliche Sequenzierung des Exons in Antisinn-Richtung sowie durch die Durchführung einer Wiederholungs-PCR und eine Sequenzierung der Zelllinie bestätigt.

Ergebnisse

[0037] In einer Reihe von Zelllinien wurden in einer aus dem p53-Gen exprimierten mRNA Mutationen vorgefunden (siehe Tabelle 1). Die in den hier beschriebenen Zelllinien identifizierten Mutationen lagen in den Exonen 5–8, von denen bekannt ist, dass sie den Großteil der p53-Mutationen enthalten (Hollstein et al, 1991). All diese Mutationen wurden zuvor beschrieben, abgesehen von der im Codon 166 der RPMI7951-Linie identifizierten Nicht-Sinn-Mutation. Dies, zusammen mit der Transversion von G zu T im Codon 298 von H417, lag nicht im am höchsten konservierten Bereich des p53-Gens. In der OAW42-Eierstockkrebs-Zelllinie war die Einzelbasen-Fehlsinn-Mutation von CGA zu CGG stumm, so dass das mutierte Triplet noch immer dieselbe Aminosäure (Arg), wie sie im Wildtyp p53 (wtp53)-Protein vorhanden ist, codierte. Ein normales p53-Protein wurde so in der Hälfte der Zelllinien exprimiert. Die mRNA der anderen Hälfte der Zelllinien codierte das abnorme p53-Protein. RPMI7951 und H417 hatten Stop-Mutationen, was zu 165 bzw., 297 Aminosäure-abgestumpften Proteinen führte. COLO320 und H322 wiesen an der gleichen Stelle unabhängig voneinander eine Fehlsinn-Mutation von G:C zu A:T auf, was zu einer Aminosäure-Substitution von Arg zu Trp führte. RT112 und HT29/5 hatten auch Mutationen, die Veränderungen in Arg (zu Gly bzw. His) codierten. COLO320, H322 und RT112 waren für p53-Mutationen homozygot. Die anderen mutierten Linien zeigten Hinweise auf eine Beibehaltung der Heterozygotität. HT29/5 und RPMI7951 exprimierten beide kleine Mengen einer Wildtyp-p53-mRNA, obwohl H417 relativ hohe Anteile exprimierte.

Western-Blotting für CDK1 und CDK4

[0038] Zwei unabhängige Western-Blottings wurden mit Lysaten für jede Zelllinie durchgeführt, wobei diese paarweise auf jedem Gel aufgetragen waren. 10⁷ Zellen wurden in 162 cm² großen Gewebekultivierungskolben (Costar Ltd., High Wycombe, Bucks) gezüchtet, bis sie präkonfluent waren, jedoch immer noch exponentiell wuchsen. Die Zellen wurden daraufhin mittels Trypsinisation abgetrennt, in einem vollständigen Medium +10% FCS resuspendiert und 3mal durch Serienzentrifugation und Resuspension in PBS ohne Serum gewaschen. 1–3 × 10⁸ lebensfähige Zellen wurden danach durch Zentrifugation pelletiert und bei 3 × 10⁷ Zellen pro ml Lysatpuffer resuspendiert (Stammlösung: 10%iges SDS 10 ml, 0,5 M Tris pH 6,8, Glycerin 10 ml, doppelt destilliertes Wasser 62 ml. 100 ml von 10 mM Leupeptin + 10 ml von 100 mM PMSF wurden zu 10 ml Stammlösung hinzugefügt.) Proteinabschätzungen wurden durchgeführt, und die endgültige Konzentration der Lysate wurde auf 300 mg Gesamtzellprotein pro 100 ml eingestrichen. Zur Messung der CDK1- und CDK4-Proteine wurden pro Bahnquelle 150 µg Gesamtzellprotein in 50 µl Lysatpuffer einem 7,5%igen Laemmli-Trenngel hinzugefügt und wurde bei 16°C unter 16-stündiger Anwendung von 60 V sowie eines konstanten Stroms von 500 mA eine Elektrophorese durchgeführt. Unter Verwendung eines Halbtrocken-Blotting-Apparats (Biorad, Richmond, CA) wurden 16 Stunden lang bei 22°C Blots auf Nitrocellulose übertragen. Zur Bestimmung der CDK1-Proteinexpressionsstärken wurde der Blot mit dem monoklonalen sc-054-Maus-Antikörper gegen menschliches CDK1 (Santa Cruz Biotechnology, CA) inkubiert und danach mit Anti-Maus-konjugierten Kaninchen-Antikörpern (Dako, UK) bei 1/1000 inkubiert und in einem alkalischen Phosphatasepuffer, der Nitroblue Tetrazolium und 5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat (Sigma, Poole, Dorset, UK) (50 mg/ml in Dimethylformamid) enthielt, entwickelt. Zur Bestimmung der CDK4-Proteinexpressionsstärken wurde der Blot mit dem polyklonalen sc-260-Kaninchen-Antikörper gegen menschliches CDK4 (Santa Cruz Biotechnology, CA) inkubiert und danach mit Anti-Maus-konjugierten Kaninchen-Antikörpern (Dako, UK) bei 1/1000 inkubiert und in einem alkalischen Phosphatasepuffer, der Nitroblue Tetrazolium und 5-Brom-4-chlor-3-indoylphosphat (Sigma, Poole, Dorset, UK) (50 mg/ml in Dimethylformamid) enthielt, entwickelt.

[0039] Die Quantisierung des Proteinprodukts des CDK1- und des CDK4-Gens wurde durch Messung der optischen Dichte mit einem Shimadzu-Abtastdensitometer mit Wolframlicht durchgeführt und als O.D.-Einheiten pro 150 µg Gesamtzellprotein ausgedrückt. Die durch Einfüllung verschiedener Mengen von Gesamtzellprotein erhaltenen Titrationskurven hatten zuvor gezeigt, dass lineare Beziehungen hinsichtlich der optischen Dichte

(O.D.) in dem Bereich erhalten werden konnten, der für das CDK1- und CDK4-Protein quer durch die Zelllinien vorgefunden wurde. Um verschiedene CDK1- und CDK4-Proteinpegel zwischen den Zelllinien zu vergleichen, wurde der mittlere O.D.-Wert für all diese Linien berechnet und wurde die relative O.D. für das CDK1- und CDK4-Protein in jeder einzelnen Zelllinie auf die mittlere O.D. normiert und mit einem beliebigen Wert von 5,0 multipliziert.

[0040] Die untersuchten Zelllinien sind untenstehend in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

Zelllinie	Histologie
2780	Eierstockkarzinom
A431	Schuppenförmiges Karzinom der Vulva
A549	Adenokarzinom der Lunge
AT5BIVA	durch Ataxia teleangiectatica umgewandelter Fibroblast
COR L23	Großzellen-Lungenkarzinom
G361	Melanom
H322	Kleinzellen-Lungenkarzinom
HEP2	Schuppenförmiges Karzinom des Kehlkopfs
HRT18	Adenokarzinom des Mastdarms
HT29/5	Adenokarzinom des Kolons
HX142	Neuroblastom
HX34	Hautmelanom
1407	Embryonales Darmepithel
KB	orales Epidermoidkarzinom
MEL2	Melanom
MEL3	Melanom
MGHU-1	Übergangszellkarzinom der Blase
MOR	Adenokarzinom der Lunge
OW42	Eierstockkarzinom
RT112	Übergangszellkarzinom der Blase

[0041] Die Ergebnisse sind in den **Fig. 3** und **4** dargestellt.

[0042] In einer Reihe von menschlichen in-vitro-Krebszelllinien wird eine starke Wechselbeziehung zwischen der Expression des CDK1 und des CDK4 beobachtet. Unter Anwendung von DNA-Sequenzierungsdaten hinsichtlich des p53-Mutationsstatus für eine Reihe dieser Linien wird weiters beobachtet, dass die CDK1/CDK4-Beziehung in Zelllinien mit p53-Mutationen besonders ausgeprägt ist (siehe **Fig. 5** und **Fig. 6**).

[0043] Ebenso wurde überraschenderweise die Wechselbeziehung, die zwischen der Proteinexpression für diese Zelllinien zu sehen war, in Hinblick auf die relevanten mRNAs nicht beobachtet. Noch gab es eine reziproke Wechselbeziehung zwischen der Proteinexpression für ein Gen und der mRNA für das andere. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der gleichzeitige Anstieg des CDK1- und des CDK4-Proteins nicht auf der Stufe einer Transcriptionskontrolle liegt, sondern auf einer translationalen oder posttranslationalen Stufe liegen kann. Das heißt, die Proteine selbst beeinflussen einander in irgendeiner Weise oder werden beide durch einen bisher unbekannten Faktor beeinflusst.

[0044] Die Entdeckungen bezüglich der wechselseitigen Beziehungen zwischen dem CDK1- und dem CDK4-Protein in menschlichen in-vitro-Zelllinien und klinischen Dickdarm-Krebsen werden gestützt durch Studien über die Transfektion in RAMA37, einer normalen Ratten-Myoepithelzelllinie. Pilotstudien mit RAMA37 legen nahe, dass eine Überexpression des CDK4-Proteins als Ergebnis einer erfolgreichen Transfektion von CDK4 unter einer uneingeschränkten Promotor-Kontrolle vom gleichzeitigen Anstieg der konstitutiven Expression von CDK1 begleitet wird.

Referenzliste

- [0045] Barraclough et al, J. Cell Physiol 131: 393–401, 1987.
 Chirgwin et al, Biochemistry 18: 5294–5299, 1979.
 Maskos und Southern, Nucleic Acids Research 21, 2269–2270, 1993.
 Pease et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 91, 5022–5026, 1994.
 Sauger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463–5467, 1977.
 Southern et al, Nucleic Acids Research 22, 1368–1373, 1994.
 Warenus et al., Int. J. Cancer. 67: 224–231, 1996.
 Bristow et al., Oncogene 9: 1527–1536, 1994.

- Bristow et al., Radiotherapy and Oncology 40: 197–223, 1996.
- P. W. G. Browning, "Proto-oncogene expression and intrinsic radiosensitivity, PhD Thesis, University of Liverpool, 1997.
- Deacon et al, Radiotherapy and Oncology 2, 317–323, 1984.
- Fan et al, Cancer Res. 54: 5824–5830, 1994.
- Fertil & Malaise, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 7: 621–629, 1981.
- FitzGerald et al, Radiat. Res. 122: 44–52, 1990.
- Hollstein et al, Science 253: 49–53, 1991.
- Iliakis et al., Cancer Res. 50: 6575–6579, 1990.
- Kasid et al., Cancer Res. 49: 3396–3400, 1989.
- Kastan et al, Cancer Res. 51: 6304–6311, 1991.
- Kawashima et al., Int. J. Cancer 61: 76–79, 1995.
- Kelland et al, Radiat. Res. 116: 526–538, 1988.
- Lee und Bernstein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5742–5746, 1993.
- McIlwrath et al., Cancer Res. 54: 3718–3722, 1994.
- McKenna et al., Cancer Res. 50: 97–102, 1990.
- McKenna et al., Radiat. Res. 125: 283–287, 1991
- Nunez et al, Br. J. Cancer 71: 311–316, 1995
- Pardo et al., Radiat. Res. 140: 180–185, 1994
- Pirollo et al., Int. J. Radiat. Biol. 55: 783–796, 1984
- Pirollo et al., Radiat. Res. 135: 234–243, 1993.
- Powell & McMillan, Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys., 29: 1035–1040, 1994.
- Radford, Int. J. Radiat. Biol. 66: 557–560, 1994.
- Sanger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463–5467, 1977.
- Schwartz et al., Int. J. Radiat. Biol. 59: 1314–1352, 1991.
- Shimm et al., Radiat. Res. 129: 149–156, 1992.
- Siles et al., Br. J. Cancer 73: 581–588, 1996.
- Su & Little, Int. J. Radiat. Biol. 62: 461–468, 1992.
- Su & Little, Radiat. Res. 133: 73–79, 1993.
- Suzuki et al., Radiat. Res. 129: 157–162, 1992.
- Warenius et al., Eur. J. Cancer 30, 369–375, 1994.
- Warenius et al., Rad. Research 14b, 485–443, 1996.
- Whitaker et al., Int. J. Radiat. Biol. 67: 7–18, 1995.
- Xia et al., Cancer Res. 55: 12–15, 1995.
- Zhen et al., Mut. Res. 346, 85–92, 1995.

Patentansprüche

1. In vitro-Verfahren zur Diagnose eines kanzerösen oder präkanzerösen Zustands bei einer Testperson, umfassend die Untersuchung einer mutierten p53-Zellen umfassenden Probe oder eines Extrakts davon hinsichtlich des gleichzeitigen Anstiegs von CDK1 und CDK4.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Probe einer Testperson entnommen wurde.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Untersuchung das In-Kontakt-Bringen der Probe mit einem markierten Antikörper gegen CDK1 und/oder einem markierten Antikörper gegen CDK4 umfasst.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei der Antikörper gegen CDK1 sc-54 ist und/oder der Antikörper gegen CDK4 sc-260 ist.
5. Verfahren gemäß jedem vorhergehenden Anspruch, wobei mutierte p53-Zellen durch das In-Kontakt-Bringen der Probe mit einem markierten Antikörper gegen mutiertes p53 identifiziert werden.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3–5, wobei zumindest ein Antikörper mit einer Fluoreszenzmarkierung versehen wird.
7. Verfahren gemäß jedem vorhergehenden Anspruch, wobei die Untersuchung unter Anwendung von Western-Blotting durchgeführt wird.

8. Verfahren gemäß jedem vorhergehenden Anspruch, wobei die Probe eine Zellprobe ist.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8, wobei die Untersuchung mittels Durchführung einer Zellzählung bewerkstelligt wird.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei die Zellzählung unter Anwendung einer Multiparameter-Durchflussszytometrie durchgeführt wird.
11. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei die Zellzählung unter Anwendung der konfokalen Rastermikroskopie durchgeführt wird.
12. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei die Zellzählung unter Anwendung der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung durchgeführt wird.
13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 9–12, wobei die Zellprobe vor der Durchführung der Zellzählung unter dem Mikroskop zerlegt wird, um normales Gewebe von Tumorgewebe zu trennen.
14. Verfahren gemäß Anspruch 13, wobei normales Gewebe von Tumorgewebe getrennt wird, indem die Zellprobe mit einem DNA-bindenden Farbstoff zur Markierung von Aneuploidzellen in Kontakt gebracht wird und markierte Zellen von nicht markierten Zellen getrennt werden.
15. Verfahren gemäß Anspruch 14, wobei der DNA-bindende Farbstoff der Hoechst 33258- oder Chromomycin A₃-Farbstoff ist.
16. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 9–15, wobei vor der Durchführung der Zellzählung die intrazelluläre Adhäsion in der Zellprobe zerstört wird, um eine Einzelzellen-Suspension zu bilden.
17. Verfahren gemäß jedem vorhergehenden Anspruch, wobei CDK1 und CDK4 Wildtyp-CDK1 und CDK4 sind.
18. Ausstattung zur Diagnose eines kanzerösen oder präkanzerösen Zustands bei einer Testperson, umfassend:
 - (i) ein Mittel zum Untersuchen des Anstiegs von CDK1;
 - (ii) ein Mittel zum Untersuchen des Anstiegs von CDK4; und
 - (iii) ein Mittel zum Identifizieren von mutierten p53-Zellen.
19. Ausstattung gemäß Anspruch 18, wobei das Mittel zum Untersuchen des Anstiegs von CDK1 einen markierten Antikörper gegen CDK1 umfasst und das Mittel zum Untersuchen des Anstiegs von CDK4 einen markierten Antikörper gegen CDK4 umfasst.
20. Ausstattung gemäß Anspruch 20, wobei der Antikörper gegen CDK1 sc-54 ist und der Antikörper gegen CDK4 sc-260 ist.
21. Ausstattung gemäß einem der Ansprüche 18–20, wobei das Mittel zum Identifizieren von mutierten p53-Zellen einen markierten Antikörper gegen mutiertes p53 umfasst.
22. Ausstattung gemäß einem der Ansprüche 19–21, wobei zumindest ein Antikörper mit einer Fluoreszenzmarkierung versehen ist.
23. Ausstattung gemäß einem der Ansprüche 18–22, weiters umfassend einen DNAbindenden Farbstoff zur Markierung von Aneuploidzellen.
24. Ausstattung gemäß Anspruch 23, wobei der DNA-bindende Farbstoff der Hoechst 33258- oder Chromomycin A₃-Farbstoff ist.
25. Ausstattung gemäß einem der Ansprüche 18–24, wobei CDK1 und CDK4 Wildtyp-CDK1 und CDK4 sind.
26. Verwendung eines Mittels zum Untersuchen des Anstiegs von CDK1, eines Mittels zum Untersuchen des Anstiegs von CDK4 und eines Mittels zum Identifizieren von mutierten p53-Zellen zur Krebsdiagnose in

DE 699 07 155 T2 2004.02.05

einem Verfahren gemäß Anspruch 1.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Fig.1.

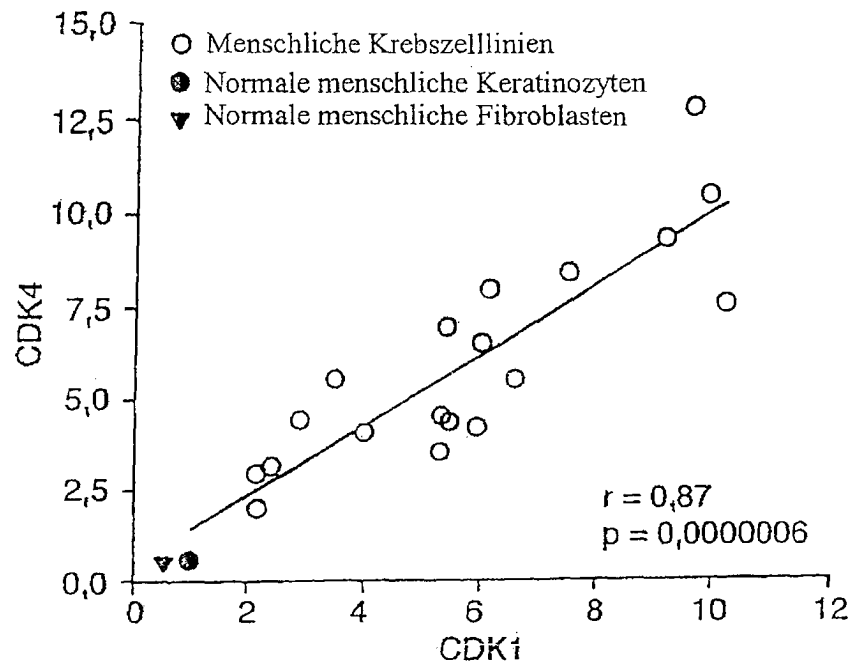


Fig.2.

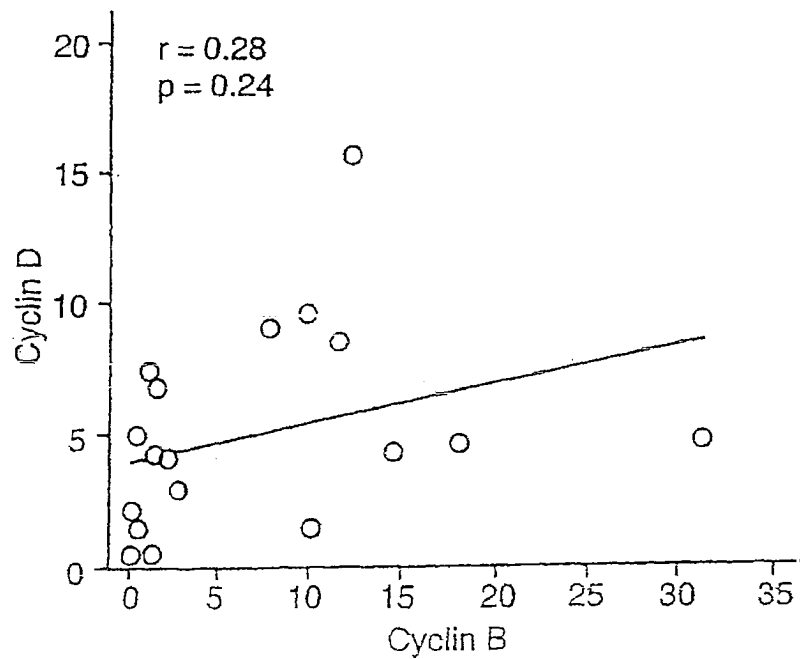


Fig.3.

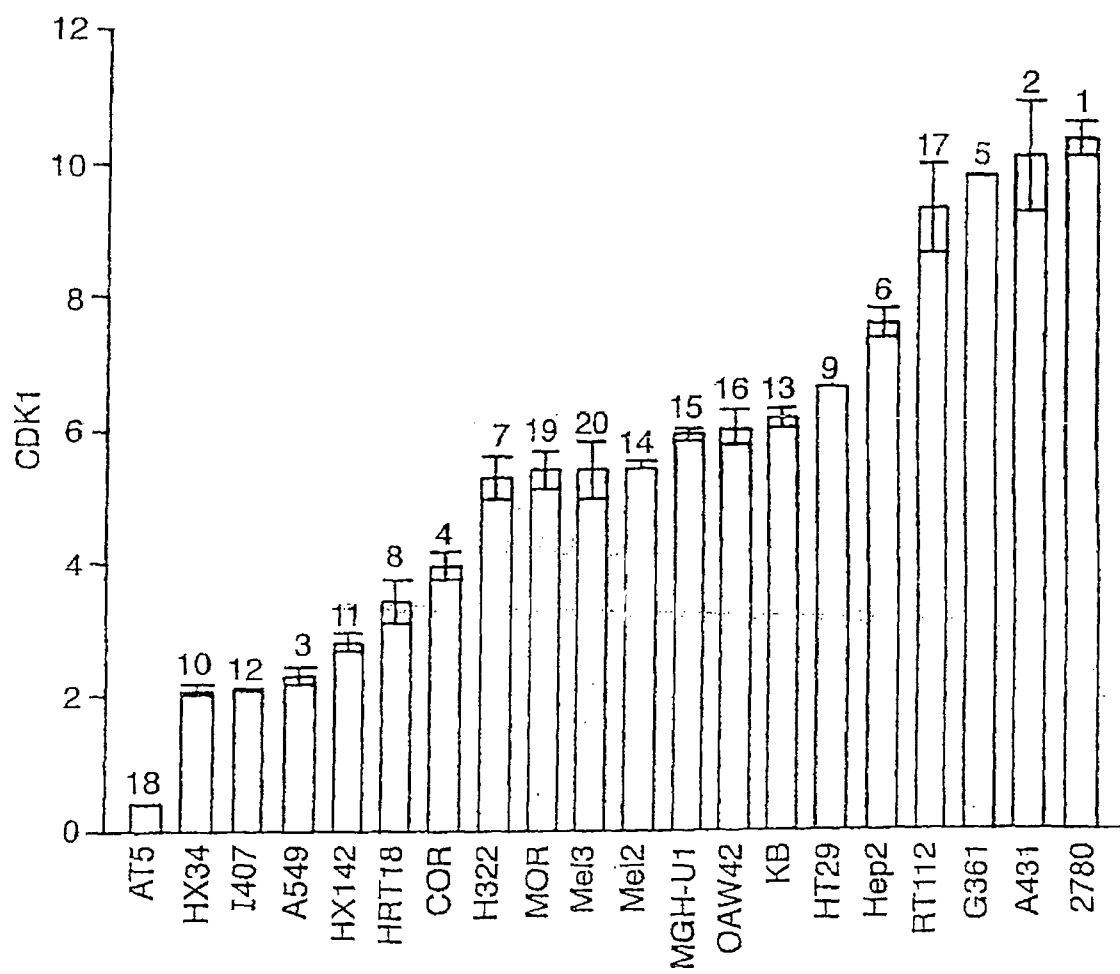


Fig.4.

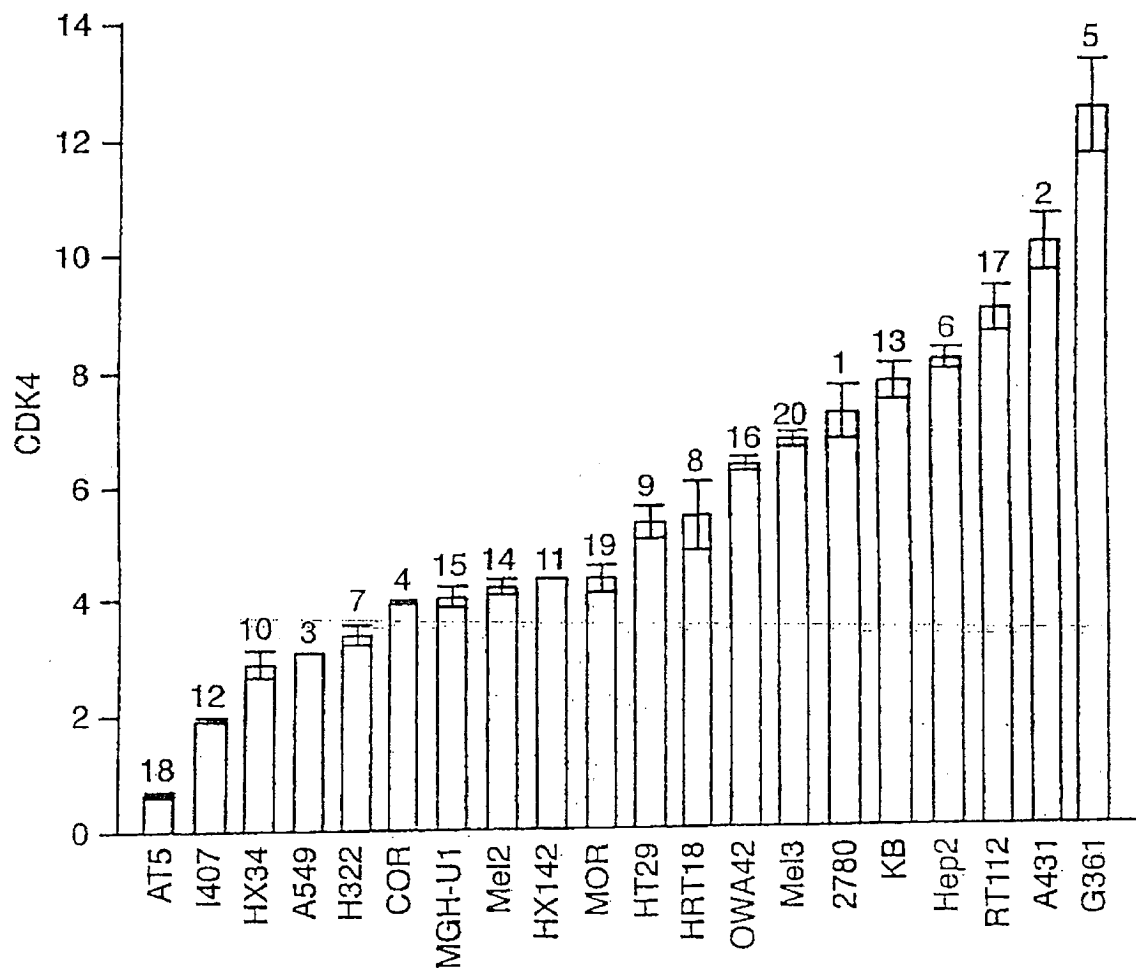


Fig.5.

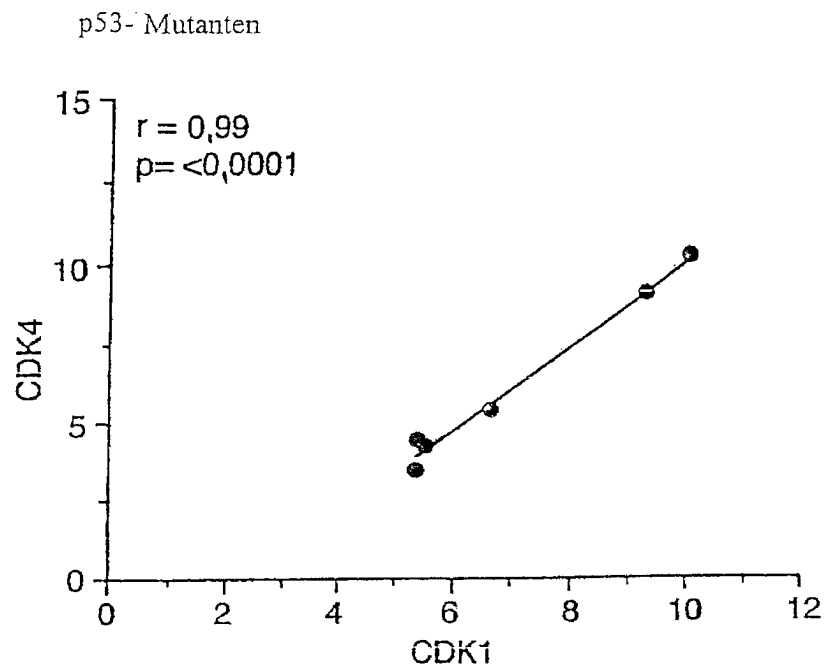


Fig.6.

